

**REGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2019/1390****2020/EES/73/11****frá 31. júlí 2019**

**um breytingu á viðaukanum við reglugerð (EB) nr. 440/2008 þar sem mælt er fyrir um prófunaraðferðir samkvæmt reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1907/2006 um skráningu, mat, leyfisveitingu og takmarkanir, að því er varðar efni, í því skyni að laga hann að tækniframförum (efnareglurnar (REACH)) (\*)**

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1907/2006 frá 18. desember 2006 um skráningu, mat, leyfisveitingu og takmarkanir, að því er varðar efni (efnareglurnar (REACH)), um stofnun Efnastofnunar Evrópu, um breytingu á tilskipun 1999/45/EB og um niðurfellingu á reglugerð ráðsins (EBE) nr. 793/93 og reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1488/94, sem og tilskipun ráðsins 76/769/EBE og tilskipunum framkvæmdastjórnarinnar 91/155/EBE, 93/67/EBE, 93/105/EB og 2000/21/EB <sup>(1)</sup>, einkum 2. mgr. 13. gr.,

*og að teknu tilliti til eftirfarandi:*

- 1) Í reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 440/2008 <sup>(2)</sup> er að finna þær prófunaraðferðir sem skal beitt í þeim tilgangi að ákvarða eðlisefnafræðilega eiginleika, eiturhrif og visteiturhrif íðefna að því er varðar reglugerð (EB) nr. 1907/2006.
- 2) Efnahags- og framfarastofnunin þróar samræmdar og alþjóðlega samþykktar viðmiðunarreglur um prófanir að því er varðar prófanir á íðefnum í eftirlitsskyni. Efnahags- og framfarastofnunin birtir reglulega nýjar og endurskoðaðar viðmiðunarreglur um prófanir að teknu tilliti til framfara í vísindum á því sviði.
- 3) Til að taka tillit til tækniframfara og, þegar unnt er, til að fækka dýrum sem eru notuð í tilraunaskyni í samræmi við 2. mgr. 13. gr. reglugerðar (EB) nr. 1907/2006 ætti, í kjölfar samþykktar á viðeigandi OECD-viðmiðunarreglum um prófanir, að mæla fyrir um tvær nýjar prófunaraðferðir til að meta visteiturhrif og níu nýjar prófunaraðferðir til að ákvarða eiturhrif á heilbrigði manna og uppæra ætti sjö prófunaraðferðir. Ellefu þessara prófunaraðferða tengjast prófunum í glasi á húðætingu/-ertingu og augnætingu/-ertingu, húðnæmingu, erfðaeiturhrifum og áhrifum á innkirtla. Haft var samráð við hagsmunaaðila um breytingartillöguna.

(\*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjttíð. ESB L 247, 26.9.2019, bls. 1. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 10/2020 frá 7. febrúar 2020 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn (bíður birtingar).

<sup>(1)</sup> Stjttíð. ESB L 396, 30.12.2006, bls. 1.

<sup>(2)</sup> Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 440/2008 frá 30. maí 2008 þar sem mælt er fyrir um prófunaraðferðir samkvæmt reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1907/2006 um skráningu, mat, leyfisveitingu og takmarkanir að því er varðar efni (efnareglurnar (REACH)) (Stjttíð. ESB L 142, 31.5.2008, bls.1).

- 4) Því ætti að breyta reglugerð (EB) nr. 440/2008 til samræmis við það.
- 5) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari reglugerð, eru í samræmi við álit nefndarinnar sem komið var á fót skv. 133. gr. reglugerðar (EB) nr. 1907/2006.

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

*1. gr.*

Viðaukanum við reglugerð (EB) nr. 440/2008 er breytt í samræmi við viðaukann við þessa reglugerð.

*2. gr.*

Reglugerð þessi öðlast gildi á tuttugasta degi eftir að hún birtist í *Stjórnartíðindum Evrópusambandsins*.

Reglugerð þessi er bindandi í heild sinni og gildir í öllum aðildarríkjunum án frekari lögfestingar.

Gjört í Brussel 31. júlí 2019.

*Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,*

Jean-Claude JUNCKER

*forseti.*

\_\_\_\_\_

## VIÐAUKI

Viðaukanum við reglugerð (EB) nr. 440/2008 er breytt sem hér segir:

1) Í stað kafla B.4 í B-hluta kemur eftirfarandi:

**„B.4 BRÁÐ HÚÐERTING/ÆTING**

## INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 404 um prófanir (2015). OECD-viðmiðunarreglur um prófanir á íðefnum eru endurskoðaðar reglulega til að tryggja að þær endurspegli bestu fyrirliggjandi vísindi. Við endurskoðun á OECD-viðmiðunarreglu 404 um prófanir var sérstaklega hugað að hugsanlegum endurbótum með tilliti til velferðar dýra og að mati á öllum fyrirliggjandi upplýsingum um prófunariðefnið til að komast hjá ónauðsynlegum prófunum á tilraunadýrum. Í uppfærðri útgáfu af OECD-viðmiðunarreglu 404 um prófanir (upphaflega samþykkt árið 1981, endurskoðuð árin 1992, 2002 og 2015) er tilvísun í leiðbeiningarskjalið um samþættar aðferðir við prófun og mat (IATA) á húðertingu/ætingu (1. heimild) þar sem lögð er til nálgun í einingum fyrir prófanir á húðertingu og húðætingu. Í leiðbeiningarskjalinu um samþættar aðferðir við prófun og mat er lýst nokkrum einingum sem samflokka upplýsingaveitur og greiningartæki, og i. veittar leiðbeiningar um hvernig skal samþætta og nota fyrirliggjandi prófunargögn og önnur gögn til að meta húðertingar- og ætingarmátt íðefna, og ii. lagðar til nálganir þegar þörf er á frekari prófunum (1. heimild). Að auki er í þeim leiðbeiningum mælt með því, ef þörf er á, að prófunarplástrarnir þrjú í fyrstu prófuninni *í lífi* séu ekki settir samtímis á dýrið heldur hver á eftir öðrum.
2. Skilgreiningar á húðertingu og -ætingu eru settar fram í viðbætinum við þessa prófunaraðferð.

## ATRÍÐI SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

3. Til að stuðla jafnt að vísindalegum gæðum sem velferð dýra skal ekki gera prófun *í lífi* fyrr en búíð er að meta öll fyrirliggjandi gögn sem varða hugsanleg ætandi eða ertandi áhrif prófunariðefnisins á húð og er það gert með greiningu á vægi rökstuddra vísbendinga, eins og sett er fram í leiðbeiningarskjalinu um samþættar aðferðir við prófun og mat á húðætingu og -ertingu, þ.e. í þremur hlutum leiðbeiningaskjalsins og samsvarandi einingum þeirra (1. heimild). Í 1. hluta er í sjö einingum fjallað um fyrirliggjandi gögn sem ná yfir gögn um menn, gögn um rannsóknir *í lífi*, gögn um rannsóknir *í glasi*, gögn um eðlisefnafræðilega eiginleika (t.d. sýrustig, einkum hátt sýruinnihald eða mikil basavirkni) og aðferðir án prófana. Í 2. hluta er gerð greining á vægi rökstuddra vísbendinga. Ef þessi greining á vægi rökstuddra vísbendinga er enn ófullnægjandi ætti að framkvæma 3. hluta með viðbótarprófunum, þar sem byrjað er á prófunum *í glasi* og prófanir *í lífi* eru aðeins notaðar sem síðasta úrræði. Þessi greining ætti því að draga úr þörfinni fyrir prófanir *í lífi* á ætandi eða ertandi áhrifum prófunariðefna ef þegar liggja fyrir fullnægjandi vísbendingar úr öðrum rannsóknum viðvíkjandi þessum tveimur endapunktum.

## MEGINREGLA PRÓFUNAR Í LÍFI

4. Prófunariðefnið, sem prófa á, er borið í einum skammti á húð tilraunadýrs og eru ómeðhöndluð svæði á húð dýrsins notuð til samanburðar. Umfang ertingar eða ætingar er ákvarðað og gefið stig eftir ákveðnum kvarða og lýst frekar til að unnt sé að meta áhrifin til fulls. Rannsóknin þarf að ná yfir nógu langan tíma til að unnt sé að meta hvort áhrifin, sem vart verður, geti gengið til baka eða séu varanleg.
5. Dýr, sem sýna viðvarandi merki um mikla þjáningu og/eða sársauka á einhverju stigi prófunarinnar, skulu aflífuð á mannúðlegan hátt og prófunariðefnið metið í samræmi við þetta. Viðmiðanir fyrir ákvörðun um mannúðlega aflífun dauðvona og sárþjáðra dýra eru viðfangsefni sérstaks leiðbeiningarskjals (2. heimild).

## UNDIRBÚNINGUR FYRIR PRÓFUN Í LÍFI

**Val á dýrategund**

6. Kanínuhvítungjar eru ákjósanlegustu tilraunadýrin og skal nota heilbrigðar, ungar, fullvaxnar kanínur. Ef notuð er önnur dýrategund skal það rökstutt.

**Undirbúningur dýranna**

7. Um það bil 24 klukkustundum fyrir prófun skal feldurinn á hrygg dýranna snöggekklipptur. Gæta skal þess að skaða ekki húðina og skal einungis nota dýr með heilbrigða og óskaddaða húð.
8. Á sumum kanínustofnum er feldurinn þéttastur á afmörkuðum blettum sem eru mest áberandi á ákveðnum tímum árs. Ekki skal nota þessa bletti við prófun.

**Aðbúnaður og fóðrun**

9. Dýrin skulu höfð hvert í sínu búi. Hiti í vistarverum tilraunadýranna skal vera 20 °C ( $\pm$  3 °C) fyrir kanínur. Þótt rakastig eigi að vera minnst 30% og helst ekki yfir 70%, nema við þrif á vistarverunum, er kjörraki 50–60%. Nota skal gervilýsingu og hafa til skiptis birtu í 12 klukkustundir og myrkur í 12 klukkustundir. Nota má hefðbundið rannsóknarstofufóður ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni.

## PRÓFUNARAÐFERÐ

**Prófunaríðefnið borið á**

10. Prófunaríðefnið skal borið á lítið húðsvæði (um það bil 6 cm<sup>2</sup>) og hulið með grisju sem haldið er fastri með plástri sem veldur engri ertingu. Ef ekki er unnt að bera efnið beint á (t.d. ef prófunaríðefnið er fljótandi eða maukkennt) skal setja prófunaríðefnið á grisjuna og leggja hana síðan á húðina. Grisjunni skal haldið í lauslegri snertingu við húðina með hentugum, hálfloftþéttum umbúðum allan váhrifatímann. Ef prófunaríðefnið er sett á grisjuna skal festa hana við húðina þannig að prófunaríðefnið sé í náinni snertingu við húðina og dreifist jafnt á hana. Koma skal í veg fyrir að dýrið nái til grisjunnar og innbyrði prófunaríðefnið eða andi því að sér.
11. Fljótandi prófunaríðefni eru yfirleitt notuð óþynnt. Ef prófuð eru föst efni (sem má dyfta ef það er talið nauðsynlegt) er prófunaríðefnið vætt með minnsta magni af vatni (eða öðru heppilegu burðarefni ef þess er þörf) sem nægir til að tryggja góða snertingu við húðina. Ef notuð eru önnur burðarefni en vatn mega þau aðeins hafa lágmarksáhrif á húðertingarmátt prófunaríðefnisins.
12. Í lok váhrifatímabilsins, sem er venjulega fjórar klukkustundir, skal fjarlægja leifar af prófunaríðefninu, eftir því sem unnt er, með vatni eða hentugu leysiefni og varast að breyta framkallaðri svörun eða skaða húðþekjuna.

**Skammtastærð**

13. Borinn er skammtur, sem nemur 0,5 ml af vökva eða 0,5 g af föstu eða maukkenndu efni, á prófunarstaðinn.

**Upphafsprófun (húðertingar-/húðætingarprófun í lífi á einu dýri)**

14. Hafi prófunaríðefni verið dæmt ætandi, ertandi eða óflokkað á grundvelli greiningar á vægi rökstuddra vísbendinga eða fyrri prófunar í *glasi* er yfirleitt ekki þörf á frekari prófun í *lífi*. Í þeim tilvikum þar sem talin er þörf á frekari gögnum vegna ófullnægjandi niðurstaðna er þó gerð prófun í *lífi* fyrst með einu dýri með eftirfarandi aðferð. Allt að þrjár prófunargrisjur eru settar, hver á eftir annarri, á dýrið. Fyrsta grisjan er fjarlægð eftir þrjár mínútur. Verði ekki vart ákafrar svörunar í húðinni er önnur grisja sett á annað svæði og fjarlægð að klukkustund liðinni. Ef athuganir á þessu stigi benda til þess að mannúðarsjónarmið leyfi að váhrifatíminn sé allt að fjórar klukkustundir skal þriðja grisjan sett á og fjarlægð að fjórum klukkustundum liðnum og svörunin flokkuð.
15. Ef ætandi áhrifa verður vart eftir einhverja þessara þriggja grisja, sem settar voru á hver á eftir annarri, skal prófun hætt tafarlaust. Verði ekki vart ætandi áhrifa þegar síðasta grisjan er fjarlægð er fylgst með dýrinu í 14 daga nema æting komi fram fyrr.
16. Ef talið er að prófunaríðefnið hafi ekki ætandi áhrif en kunnir að vera ertandi skal hafa eina grisju á einu dýri í fjórar klukkustundir.

**Staðfestingarprófun (húðertingarprófun í lífi á fleiri dýrum til viðbótar)**

17. Verði ekki vart ætandi áhrifa í upphafsprófuninni skal staðfesta ertingarsvörun eða neikvæða svörun með allt að tveimur dýrum til viðbótar og skal ein grisja sett á hvort dýr og váhrifatímabilið vera fjórar klukkustundir. Verði vart ertingaráhrifa í upphafsprófuninni má gera staðfestingarprófun með raðbundinni aðferð eða með því að láta tvö dýr til viðbótar verða samtímis fyrir váhrifum. Í því undantekningartilvikum að ekki sé framkvæmd upphafsprófun má meðhöndla tvö eða þrjú dýr með einni grisju á hvert dýr sem er svo fjarlægð eftir fjórar klukkustundir. Ef tvö dýr eru notuð og bæði sýna sömu svörun er frekari prófunar ekki þörf. Að öðrum kosti er þriðja dýrið prófað. Nauðsynlegt getur reynst að nota fleiri dýr ef svörunin er tvíræð.

**Athugunartímabil**

18. Athugunartímabilið þarf að vera nógu langt til að unnt sé að meta til fulls hvort áhrifin, sem vart verður, geti gengið til baka. Tilrauninni skal þó hætt um leið og dýrið sýnir viðvarandi merki um mikinn sársauka eða þjáningu. Fylgst skal með dýrunum í allt að 14 daga eftir að grisjurnar hafa verið fjarlægðar til að ákvarða hvort áhrifin gangi til baka. Komi í ljós, áður en liðnir eru 14 dagar, að áhrifin ganga til baka skal tilrauninni strax hætt.

**Klínískar athuganir og flokkun húðviðbragða**

19. Dýrin skulu skoðuð með tilliti til merkja um hörundsroða og bjúg og gefin stig fyrir svörun eftir 60 mínútur og síðan 24, 48 og 72 klukkustundum eftir að grisjan hefur verið fjarlægð. Við upphafsprófun á einu dýri er prófunarstaðurinn einnig skoðaður um leið og grisjan hefur verið fjarlægð. Húðviðbrögð eru flokkuð og skráð samkvæmt stigagjöfni í töflunni hér á eftir. Ef húðin hefur orðið fyrir skaða sem hvorki er hægt að flokka sem ertingu eða ætingu eftir 72 klukkustundir kann að vera nauðsynlegt að halda athugun áfram fram að 14. degi til að ákvarða hvort áhrifin ganga til baka. Til viðbótar við athugun á ertingu skal lýsa til fulls og skrá öll staðbundin eiturrif, s.s. að húðfitan minnki, og öll altæk, skaðleg áhrif (t.d. klínísk merki um eiturrif og áhrif á líkamsþyngd). Til greina kemur að gera vefjameinafræðilega rannsókn til að skera úr um tvíræða svörun.
20. Flokkun húðsvörunar er í eðli sínu huglæg. Til að stuðla að samræmingu á flokkun húðsvörunar, og til að aðstoða prófunarstofur og aðra hlutaðeigandi aðila við athuganir sínar og túlkun niðurstaðna úr þeim, þarf að kenna starfsfólkinu, sem vinnur við þessar athuganir, nægilega vel á stigakerfið sem er notað (sjá töfluna hér á eftir). Myndskreyttur leiðarvísir um flokkun húðertingar og annarra vefjaskemmda gæti komið að góðum notum (3. heimild).

## GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

21. Rannsóknarniðurstöðurnar skulu teknar saman í töflu í lokaskýrslu prófunar og skal þar getið allra atriða sem talin eru upp í lið 24.

**Mat á niðurstöðum**

22. Meta skal húðertinguna til stiga í tengslum við eðli og alvarleika vefjaskemmda og hvort skemmdirnar geti gengið til baka eða ekki. Stigafjöldinn í hverju einstöku tilviki er ekki algild viðmiðun fyrir ertingareiginleika prófunarefnis þar eð önnur áhrif efnisins eru einnig metin. Í stað þess ber að líta á stigagjöfina í hverju einstöku tilviki sem viðmiðunargildi sem þarf að meta í samhengi við allar aðrar athuganir sem gerðar voru í rannsókninni.
23. Við mat á ertingarsvörun skal líta til þess hvort vefjaskemmdir í húð geti gengið til baka. Ef svörunar á borð við hármessi (á takmörkuðu svæði), siggmein, vefjaauka og hrúðurmyndun gætir enn í lok 14 daga athugunartímabilsins ber að líta á prófunaríðefnið sem ertandi.

**Prófunarskýrsla**

24. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

*Rökstuðningur fyrir prófun í lífi:*

- greining á vægi rökstuddra vísbendinga í gögnum sem lágu fyrir áður en prófun hófst, þ.m.t. niðurstöður úr raðprófunaráætlun,
- lýsing á viðeigandi gögnum sem liggja fyrir úr fyrri prófunum,
- gögn úr einstökum áföngum prófunaráætlunarinnar,
- lýsing á þeim prófunum í *glasi* sem fram fóru, þ.m.t. ítarleg lýsing á þeim verkferlum, sem voru notuð, og niðurstöðum sem fengust með prófunar- og viðmiðunarefnum,
- greiningin á vægi rökstuddra vísbendinga sem lá til grundvallar rannsókninni í lífi.

*Prófunaríðefni:*

- efni með einum efnisþætti: efnafraðileg sanngreining, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.,
- fjölþáttaefni, blöndur og UVCB-efni: lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafraðilegum eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli,
- útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafraðilegir eiginleikar sem skipta máli,
- uppruni, lotunúmer, ef það liggur fyrir,
- meðhöndlun prófunaríðefnisins/samanburðarefnisins fyrir prófunina, ef við á (t.d. hitun og mölun),

- stöðugleiki prófunaríðfnisins, síðasti notkunardagur eða dagsetning endurgreiningar, ef hún er þekkt,
- geymsluskilyrði.

*Burðarefni:*

- auðkenni, styrkur (ef við á) og rúmmál efnis sem er notað,
- rök fyrir vali á burðarefni.

*Tilraunadýr:*

- tegund/stofn sem eru notuð og ef notuð eru önnur dýr en kanínuhvítingjar skal það rökstutt,
- fjöldi dýra af hvoru kyni,
- þyngd hvers dýrs í upphafi og lok prófunar,
- aldur í upphafi rannsóknar,
- uppruni dýranna, aðbúnaður, fóður o.s.frv.

*Prófunarskilyrði:*

- aðferð við undirbúning svæðis fyrir grisjuplástra,
- upplýsingar um grisjuefnin og aðferð við plástrun,
- upplýsingar um undirbúning prófunaríðfnisins og hvernig það er borið á og fjarlæggt.

*Niðurstöður:*

- töflusetning stigagjafar fyrir ertingar- eða ætingarsvörun fyrir hvert dýr á hverjum athugunartíma,
- lýsing á öllum vefjaskemmdum sem komu fram,
- lýsing í samfelldu máli á eðli og umfangi þeirrar ertingar eða ætingar, sem kom fram, og vefmeinafræðilegar niðurstöður,
- lýsing á öðrum skaðlegum, staðbundnum áhrifum (s.s. minnkun húðfitu) og altækum áhrifum til viðbótar við húðertingu eða húðætingu.

*Umfjöllun um niðurstöður**Ályktanir***HEIMILDIR**

- 1) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28<sup>th</sup> Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998.
- 3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.



*Tafla***Flokkun húðviðbragða****Hörundsroði og brunaskorpumyndun**

Enginn hörundsroði .....	0
Örlítil hörundsroði (vart sjáanlegur) .....	1
Greinilegur hörundsroði .....	2
Hörundsroði í meðallagi eða mikill .....	3
Mikill hörundsroði (purpuraroði) allt að brunaskorpumyndun sem hindrar flokkun hörundsroða .....	4

Hámarksgildi: 4

**Bjúgmyndun**

Enginn bjúgur .....	0
Örlítil bjúgur (vart sjáanlegur) .....	1
Lítill bjúgur (vel afmarkað svæði með greinilegri lyftingu) .....	2
Bjúgur í meðallagi (lyfting nemur u.þ.b. 1 mm) .....	3
Mikill bjúgur (lyfting er yfir 1 mm og nær út fyrir váhrifasvæðið) .....	4

Hámarksgildi: 4

Gera má vefjameinafræðilega rannsókn til að skera úr um tvíræða svörun.

*Viðbætur*

## SKILGREININGAR

Íðefni: efni eða blanda.

Húðerting: skemmd í húð sem kemur fram eftir að prófunariðefni hefur verið á húðinni í allt að 4 klukkustundir og getur gengið til baka.

Húðæting: varanleg skemmd í húð sem kemur fram eftir að prófunariðefni hefur verið á húðinni í allt að fjórar klukkustundir, þ.e. sýnilegt drep sem nær í gegnum húðþekjuna og niður í leðurhúðina. Ætandi svörun einkennist af sárum, blæðingu, blæðandi hrúðri og, í lok 14 daga athugunartímabilsins, upplitun þegar húðin fölnar, hárlausum blettum og örum. Til greina kemur að gera vefjameinafræðilegar athuganir til að meta vefjaskemmdir sem vafi leikur á um.

Prófunariðefni: sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

- 2) Í stað kafla B.17 í B-hluta kemur eftirfarandi:

„B.17 **PRÓFUN Í GLASI Á GENASTÖKKBREYTINGUM Í SPENDÝRAFRUMUM MEÐ HPRT- OG XPRT-GENUM**

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 476 um prófanir (2016). Prófunaraðferðir eru endurskoðaðar reglulega í ljósi framfara á sviði vísinda, þörfum á nýrri löggjöf og velferð dýra. Þessi núgildandi endurskoðaða útgáfa af prófunaraðferð B.17 endurspeglar næstum þrjátíu ára reynslu af þeirri prófun og einnig niðurstöður úr þróun á sérstakri nýrri aðferð fyrir prófun *í glasi* á genastökkbreytingum í spendýrafrumum með týmidínkínasa-geninu. Prófunaraðferð B.17 er hluti af röð aðferða við erfðafræðilegar eiturefnafræðiprófanir. Efnahags- og framfarastofnunin hefur þróað skjal sem veitir gagnorðar upplýsingar um prófanir varðandi erfðafræðilega eiturefnafræði og yfirlit yfir nýlegar breytingar sem voru gerðar á viðmiðunarreglunum um prófanir varðandi erfðafræðilega eiturefnafræði (1. heimild).
2. Tilgangur prófunar *í glasi* á genastökkbreytingum í spendýrafrumum er að greina stökkbreytingar sem iðefni kalla fram. Frumúlúnurnar sem eru notaðar í þessum prófunum mæla frumstökkbreytingar í vísigenum, einkum í innræna hýpóxantín-gúanínfosfóribósýltransferasageninu (Hprt í frumum úr nagdýrum, HPRT í frumum úr mönnum, sem vísað er til í heild sinni sem Hprt-genið og HPRT-prófunin í þessari prófunaraðferð), og aðflutt gen fyrir xantín-gúanínfosfóribósýltransferasa (gpt) (sem vísað er til sem XPRT-prófun). HPRT- og XPRT-stökkbreytingaprófanirnar greina mismunandi róf erfðafræðilegra atburða. Auk stökkbreytingar sem HPRT-prófunin greinir (t.d. basaparaskipti, fasabreytingar, litlar úrfellingar og innskot) getur staðsetning aðflutta gensins fyrir gpt á A-litningi gert kleift að greina stökkbreytingar sem stafa af miklum úrfellingum og hugsanlegri endurröðun í jafnskiptingu sem greinist ekki með HPRT-prófuninni því Hprt-genið er staðsett á X-litningnum (2.–7. heimild). Sem stendur er XPRT-prófunin minna notuð en HPRT-prófunin í eftirlitsskyni.
3. Skilgreiningar, sem eru notaðar, eru gefnar upp í 1. viðbæti.

ATRIÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

4. Prófanir, sem eru gerðar *í glasi*, útheimta að jafnaði útræna efnaskiptavirkjun. Útrænt kerfi efnaskiptavirkjunar getur ekki líkt fullkomlega eftir þeim aðstæðum sem ríkja *í lffi*.
5. Þess skal gætt að ekki komi upp aðstæður sem myndu leiða til niðurstaðna sem eru jákvæðar vegna gervinga, (þ.e. hugsanleg víxlverkun við prófunarkerfið) sem eru ekki vegna beinna verkana milli prófunariðefnanna og erfðafnis frumunnar; meðal slíkra aðstæðna eru breytingar á sýrustigi eða osmólalstyrk (8.–10. heimild), verkanir milli efnisþátta í ætinu (11. og 12. heimild) eða of mikil frumueiturhrif (13. heimild). Frumueiturhrif sem fara yfir ráðlögðu hæstu frumueiturhrifagildin, eins og þau eru skilgreind í 19. lið, teljast of mikil fyrir HPRT-prófunina.
6. Áður en þessi aðferð til prófunar á blöndu, sem er framkvæmd til að fá gögn sem fyrirhugað er að nota í eftirlitsskyni, er notuð skal skoðað hvort, og þá af hverju, hún gæti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi. Ekki er þörf á slíkri skoðun ef prófun á blöndunni er krafa af hálfu eftirlitsyrivalda.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

7. Stökkbreyttar frumur sem skortir Hprt-ensímvirgni í HPRT-prófuninni eða xpirt-ensímvirgni í XPRT-prófuninni eru þólnar gagnvart frumuhemjandi áhrifum púrínhliðstæðunnar 6-þiógúaníns (TG). Frumur með Hprt (í HPRT-prófuninni) eða gpt (í XPRT-prófuninni) eru nærmar gagnvart TG sem hindrar efnaskipti frumna og stöðvar frekari frumuskiptingu. Stökkbreyttar frumur eru því færar um að fjölga sér ef TG er í umhverfi þeirra en það geta eðlilegar frumur ekki sem eru með Hprt-ensím (í HPRT-prófuninni) eða gpt-ensím (í XPRT-prófuninni).

8. Frumur í svifblöndu- eða einlagsrækt eru láttnar verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu í hæfilegan tíma (3–6 klst), bæði með og án útrænnar efnaskiptavirkjunar (sjá 14. lið), og síðan afræktaðar til þess að ákvarða frumueiturhrif og láta svipfarstjáníngu koma fram áður en stökkbrigðin eru valin (14.–17. heimild). Frumueiturhrif eru ákvörðuð með hlutfallslegri lifun (RS), þ.e. klónunarhæfni sem mæld er strax eftir meðhöndlun og leiðrétt með öllu frumutapi í meðhöndlun borið saman við neikvæðan samanburð (18. liður og 2. viðbætur). Meðhöndluðu ræktirnar eru láttnar vera í vaxtarætinu í hæfilegan tíma, sem er miðaður við frumugerðina, þannig að svipfarstjáníning framkallaðra stökkbreytinga verði því sem næst í hámarki (yfirleitt minnst í 7–9 daga). Eftir að svipfarstjáníning er komin fram er tíðni stökkbrigða ákvörðuð með því að sá þekktum fjölda frumna á æti, sem inniheldur valvísa efnid, í því skyni að finna stökkbreyttar þyrpingar og á æti, sem er án valvísa efnisins, til að ákvarða klónunarhæfnina (lífvænleikann). Eftir ræktun í hæfilega langan tíma eru þyrpingarnar taldar. Tíðni stökkbrigða er reiknuð út frá fjölda stökkbreyttra þyrpinga sem er leiðrétt með klónunarhæfni þegar stökkbrigðin eru valin.

#### LÝSING Á AÐFERÐINNI

#### Undirbúningur

##### *Frumur*

9. Fyrir skal liggja staðfesting á því að frumugerðirnar, sem notaðar eru í HPRT- og XPRT-prófunum, séu nærmar gagnvart efnasfræðilegum stökkbreytivöldum, þær hafi mikla klónunarhæfni, stöðuga kjarngerð og hlutfall sjálfsprottinnna stökkbrigða sé stöðugt. Frumurnar sem algengast er að nota í HPRT-prófun eru frumulínurnar CHO, CHL og V79 úr kínahamstri, eitolæxlisfrumur músa, L5178Y, og TK6 sem eru eitlakímfrumur úr mönnum (18. og 19. heimild). AS52-frumur með uppruna í CHO-frumulínu og innihalda aðflutta gpt-genid (og þar sem Hprt-genid hefur verið fjarlægð) eru notaðar í XPRT-prófunina (20. og 21. heimild); ekki er hægt að gera HPRT-prófunin á AS52-frumum því hprt-genid hefur verið fjarlægð. Notkun á öðrum frumulínum skal rökstyðja og fullgilda.
10. Fylgjast skal að staðaldri með frumulínum til að ganga úr skugga um að dæmigerður litningafjöldi sé stöðugur og að ekki sé um berfrymingasmit að ræða (22. og 23. heimild) og ekki skal nota frumur ef þær eru smitaðar eða ef dæmigerður litningafjöldi hefur breyst. Nauðsynlegt er að vita hver er eðlileg lengd frumuhings sem er notaður í prófunarstofunni og hún skal vera í samræmi við útgefnu frumueiginleikana. Einnig skal athuga tíðni sjálfsprottinnna stökkbrigða í viðmiðunarfrumustofninum og ekki skal nota stofninn ef tíðni stökkbrigða er óásættanlegt.
11. Áður en ræktirnar eru notaðar í þessa prófun kann að vera nauðsynlegt að fjarlægja stökkbreyttar frumur sem eru þegar til staðar í ræktunum, t.d. með ræktun í HAT-æti fyrir HPRT-prófun og MPA-æti fyrir XPRT-prófun (5. og 24. heimild) (sjá 1. viðbæti). Hægt er að geyma hreinsuðu frumurnar í frosti og síðan afþíða þær og nota sem vinnslustofna. Hægt er að nota vinnslustofninn, sem hefur nýlega verið afþíddur, í prófunina eftir að venjulegum tvöföldunartímum er náð. Þegar XPRT-prófunin er gerð skal venjubundin ræktun AS52-frumna vera við skilyrði sem tryggja að aðflutta gpt-geninu verði viðhaldið (20. heimild).

#### Æti og ræktunarskilyrði

12. Nota skal viðeigandi ræktunaræti og ræktunarskilyrði (ræktunarflát, rakabætt andrúmsloft með 5% CO<sub>2</sub> og ræktunarhitastig við 37 °C) til að viðhalda frumum í rækt. Frumuræktum skal ávallt viðhaldið við skilyrði sem tryggja að þær vaxi í veldisvaxtarfasa. Sérstaklega er mikilvægt að æti og ræktunarskilyrðin séu valin þannig að vöxtur frumna á tjánungartímanum og ákjósanleg klónunarhæfni, bæði stökkbreyttra og óbreyttra frumna, verði í hámarki.

#### Undirbúningur rækta

13. Frumulínum úr stofnræktum er fjölgað, sáð í ræktunaræti í hæfilegum þéttleika til að frumur í sviflausnum eða einlögum haldi áfram í veldisvexti á meðhöndlunar- og tjánungartímanum (t.d. ætti að forðast samrennsli frumna sem vaxa í einlögum).

### Efnaskiptavirkjun

- Nota skal útræn efnaskiptakerfi þegar notaðar eru frumur sem hafa ófullnægjandi getu til útrænna efnaskipta. Kerfið sem algengast er að nota, sem ráðlagt er að nota sem sjálfgefið nema rök séu færð fyrir öðru, er með hvatberasneyddum frumusafa (hér á eftir „S9“), með viðbættum hjálparþætti, sem er unninn úr nagdýralifur (yfirleitt úr rottum) og meðhöndlaður með ensímörvandi efnum, s.s. Aroclor 1254 (25.–28. heimild) eða blöndu fenóbarbítals og  $\beta$ -naptóflavóns (29.–32. heimild). Síðarnefnda samsetningin stríðir ekki gegn Stokkhólmssamningnum um þrávirk lífræn efni (33. heimild) og sýnt hefur verið fram á að hún sé jafn árangursrík og Aroclor 1254 til að framkalla oxídasa sem gegna mismunandi hlutverki (29. og 31. heimild). S9-þátturinn er venjulega notaður í styrkleika sem er frá 1 til 2% að rúmmálshlutfalli en má auka upp í 10% í síðasta prófunarætinu. Flokkur efnanna sem verið er að prófa getur haft áhrif á valið á tegund og styrk útræna efnaskiptavirkjunarkerfisins eða efnaskiptavakans sem er notaður (34.–36. heimild).

### Tilreiðsla prófunaríðefnis

- Prófunaríðefni í föstu formi skulu tilreidd í viðeigandi leysum og þynnt, ef við á, áður en frumurnar eru meðhöndlaðar (sjá 16. lið). Fljótandi prófunaríðefni má setja beint út í prófunarkerfið og/eða þynna þau fyrir meðferðina í prófunarkerfinu. Loftkennd eða rokgjörn prófunaríðefni skulu prófuð með viðeigandi breytingum á stöðluðu aðferðarlýsingunum, s.s. meðhöndlun í innsigliðum ræktunarílátum (37. og 38. heimild). Blöndur af prófunaríðefni skulu gerðar rétt fyrir meðhöndlun nema gögn um stöðugleika staðfesti að efnið þoli geymslu.

### PRÓFUNARSKILYRÐI

### Leysar

- Leysirinn skal valinn til að besta leysni prófunaríðefna án þess að hafa neikvæð áhrif á framkvæmd prófunarinnar, t.d. að breyta frumuvexti, hafa áhrif á heilleika prófunaríðefnisins, hvarfast við ræktunarílát, hindra efnaskiptavirkjunarkerfið. Mælst er til þess, verði því við komið, að fyrst sé kannað hvort nota megi vatnskenndan leysi (eða ræktunaræti). Vel þekktir leysar eru t.d. vatn og dímetýlsúlfoxíð. Almennt skulu lífrænir leysar ekki fara yfir 1% rúmmálshlutfall og vatnskenndir leysar (saltlausn eða vatn) ekki fara yfir 10% rúmmálshlutfall í endanlega meðhöndlunarmiðlinum. Ef leysarnir sem eru notaðir eru ekki vel þekktir (t.d. etanól eða asetón) skal notkun þeirra studd gögnum sem sýna að þeir séu samrýmanlegir við prófunaríðefnin og prófunarkerfið og hafi ekki erfðaeiturhrif við styrkleikann sem er notaður. Ef þessi gögn til stuðnings liggja ekki fyrir er mikilvægt að bæta við ómeðhöndluðum samanburði (sjá 1. viðbæti) til að sýna fram á að leysirinn, sem valinn hefur verið, valdi hvorki skaðlegum né stökkbreytandi áhrifum.

### Mælingar á frumueiturhrifum og val á styrk váhrifa

- Þegar hæsti styrkur íðefnis í prófun er ákvarðaður skal forðast styrk sem getur valdið svörun sem er jákvæð vegna gervinga, s.s. styrk sem veldur óhóflegum frumueiturhrifum (sjá 20. lið), útfellingu í ræktunarætinu (sjá 21. lið) eða greinilegum breytingum á sýrustigi eða osmólalstyrk (sjá 5. lið). Ef prófunaríðefni veldur greinilegri breytingu á sýrustigi í ætinu þegar því er bætt í það skal stilla sýrustigið með því að jafna endanlega meðhöndlunarætið þannig að það komi í veg fyrir niðurstöðu sem er jákvæð vegna gervinga og til að viðhalda viðeigandi ræktunarskilyrðum.
- Val á styrk byggir á frumueiturhrifum og öðrum atriðum (sjá 20.–22. lið). Ekki er krafist upphafsprófunar en þó getur mat á frumueiturhrifum í upphafsprófun verið gagnlegt til að skilgreina betur styrkleikana sem á að nota í aðaltilrauninni. Þótt frummat á frumueiturhrifum sé gert er enn krafist mælingar á frumueiturhrifum fyrir hverja ræktun í aðaltilrauninni. Meta skal frumueiturhrif með því að nota RS, þ.e. klónunarhæfni (CE) frumna sem er sáð strax að lokinni meðhöndlun, leiðrétt m.t.t. frumutaps í meðhöndlun, byggt á frumufjölda, samanborið við leiðrétt klónunarhæfni í neikvæðum samanburðum (með 100% lifun) (sjá formúlur í 2. viðbæti).

19. Meta skal a.m.k. fjóra prófunarstyrkleika (fyrir utan leysinn og jákvæðu samanburðina) sem uppfylla viðmiðanirnar fyrir ásættanleika (viðeigandi frumueiturhrif, frumufjölda o.s.frv.). Þótt ráðlagt sé að nota tvíteknar ræktir er hægt að nota annað hvort stakar meðhöndlaðar ræktir eða margar samhliða fyrir hvern styrkleika sem er prófaður. Niðurstöður, sem fást úr óháðum samhliða ræktunum við tiltekinn styrkleika, skulu tilkynntar sérstaklega en þær er hægt að hópa fyrir gagnagreininguna (17. heimild). Yfirleitt er hæfilegt að tvö- til þrefalda styrkbilin fyrir prófunaríðefni sem sýna lítil eða engin frumueiturhrif. Ef frumueiturhrif verða skal prófunarstyrkurinn, sem er valinn, ná frá sviði sem veldur frumueiturhrifum og til styrkleika sem valda miðlungi til lítilla eða engra frumueiturhrifa. Mörg prófunaríðefni sýna brattan feril styrkháðrar svörunar og til að ná yfir allt svið frumueiturhrifa, eða til að rannsaka styrkháða svörun ítarlega, getur verið nauðsynlegt að hafa minna bil á milli styrkleika og fleiri en fjóra styrkleika, einkum við þau skilyrði að endurtekin rannsókn er nauðsynleg (sjá 43. lið). Ef ein rækt er notuð getur verið sérstaklega mikilvægt að nota fleiri en fjóra styrkleika.
20. Ef hámarksstyrkur grundvallast á frumueiturhrifum ætti hæsti styrkurinn að miða að því að ná milli 20 og 10% RS. Fara skal gætilega við túlkun á jákvæðum niðurstöðum sem koma aðeins fram í 10% RS eða undir (sjá 43. lið).
21. Hæsti greindi styrkleiki torleysanlegra prófunaríðefna, sem hafa ekki frumueiturhrif í styrkleika sem er undir lægstu leysanleikamörkum, á að framkalla grugg eða botnfall sem er greinilegt með berum augum, eða með að nota umhverfða smásjá, við lok meðhöndlunarinnar með prófunaríðefninu. Þótt frumueiturhrif komi fram í styrkleika sem er hærri en lægstu leysanleikamörk er ráðlagt að prófa við einungis einn styrkleika sem framkallar grugg, eða sýnilegt botnfall, þar eð fellingin getur valdið niðurstöðum sem eru jákvæðar vegna gervinga. Við styrkleikann sem framkallar fellinguna skal gætt að því að fellingin trufla ekki framkvæmd prófunarinnar. Það getur verið gagnlegt að ákvarða leysnina í ræktunartíðinu fyrir tilraunina.
22. Ef hvorki koma fram felling né takmarkandi frumueiturhrif skal hæsti prófunarstyrkur samsvara 10 mM, 2 mg/ml eða 2 µl/ml, eftir því hvort er lægra (39. og 40. heimild). Ef prófunaríðefnið hefur óskilgreinda samsetningu, t.d. efni með óþekktu eða breytilega samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni (þ.e. efni af óþekktu eða breytilegri samsetningu (UVCB-efni)) (41. heimild), útdráttarefni úr umhverfinu o.s.frv., gæti hæsti styrkleikinn þurft að vera hærri (t.d. 5 mg/ml), ef frumueiturhrifin eru ónóg, til að auka styrk hvers og eins af efnisþáttunum. Þó skal þess getið að þessar kröfur geta verið frábrugðnar fyrir lyf handa mönnum (42. heimild).

### Samanburðir

23. Fyrir hvert tilraunaskilyrði skal hafa með samskeiða neikvæðan samanburð (sjá 16. lið), sem byggist á því að meðhöndlunarmiðillinn er eingöngu leysir sem fær sömu meðhöndlun og meðhöndluðu ræktirnar.
24. Samskeiða jákvæðir samanburðir eru nauðsynlegir til að sýna fram á getu rannsóknarstofunnar til að greina stökkbreytivalda, við þau skilyrði sem tiltekin eru í aðferðarlýsingu prófunarinnar sem er notuð, og skilvirkni útræna efnaskiptavirkjunarkerfisins, ef það á við. Dæmi um jákvæða samanburði eru gefin í töflu 1 hér á eftir. Hægt er að nota önnur jákvæð samanburðarefni ef það er stutt rökum. Þar eð prófanir í *glasi* á erfðaeiturhrifum á spendýrafrumum eru nægilega staðlaðar má gera prófanir þar sem notuð er meðhöndlun með og án efnaskiptavirkjunar með eingöngu jákvæðum samanburði sem krefst efnaskiptavirkjunar. Í því tilviki sýnir þessi eina svörun með jákvæðri samanburðarprófun fram á bæði virkni efnaskiptavirkjunarkerfisins og svörunargetu prófunarkerfisins. Í hverjum jákvæðum samanburði skal nota einn eða fleiri styrkleika sem vænst er að valdi samanburðarnákvæmri og greinanlegri aukningu miðað við bakgrunnsgildið til að sýna fram á næmi prófunarkerfisins og svöruninni skal ekki stefnt í hættu með frumueiturhrifum sem fara yfir mörkin sem eru tilgreind í þessari prófunaraðferð (sjá 20. lið).

Tafla 1

## Viðmiðunarefni sem er mælt með til mats á hæfni rannsóknarstofu og við val á jákvæðum samanburði

Skilyrði við efnaskiptavirkjun	Genasæti	Efni og CAS-nr.
Engin útræn efnaskiptavirkjun	<i>Hprt</i>	Etýlmetansúlfónat [CAS-nr. 62-50-0] Etýlnítrósóúrea [CAS-nr. 759-73-9] 4-nítrókínólín-1-oxíð [CAS-nr. 56-57-5]
	<i>xprt</i>	Streptónígrín [CAS-nr. 3930-19-6] Mítómýsín C [CAS-nr. 50-07-7]
Útræn efnaskiptavirkjun	<i>Hprt</i>	3-metýlkólantren [CAS-nr. 56-49-5] 7,12-dímetýlbensantrasen [CAS-nr. 57-97-6] Bensó[a]pýren [CAS-nr. 50-32-8]
	<i>xprt</i>	Bensó[a]pýren [CAS-nr. 50-32-8]

## VERKFERLI

## Meðhöndlun með prófunariðefni

25. Frumur, sem eru í fjölgunarferli, eru meðhöndlaðar með prófunariðefninu, bæði með efnaskiptavirkjunarkerfi og án þess. Beita skal váhrifum í hæfilegan tíma (venjulega eru þrjár til sex klukkustundir fullnægjandi).
26. Lágmarksfjöldi frumna sem er notaður fyrir hverja prófunarræktun (samanburður og meðhöndlun) á hverju stigi prófunarinnar, er ákveðinn með tilliti til tíðni sjálfsprottinna stökkbrigða. Almenna viðmiðunarreglan er að fjöldi meðhöndlaðra frumna og umsáninga sé nógu mikill til að viðhalda 10 sjálfsprottum stökkbrigðum í hverri rækt á öllum stigum prófunarinnar (17. heimild). Tíðni sjálfsprottinna stökkbrigða er að jafnaði milli 5 og  $20 \times 10^{-6}$ . Til að tíðni sjálfsprottinna stökkbrigða sé  $5 \times 10^{-6}$  og til að viðhalda nægilegum fjölda sjálfsprottinna stökkbrigða (10 eða fleiri), jafnvel fyrir ræktir sem eru meðhöndlaðar með styrkleika sem valda 90% frumueiturhrifum á meðan á meðhöndlun stendur (10% RS), er nauðsynlegt að meðhöndla a.m.k.  $20 \times 10^6$  frumur. Auk þess þarf að rækta nægilegan fjölda frumna (aldrei færri en 2 milljón) á tjáningartímanum og sá fyrir val á stökkbrigðum.

## Svipfarstjáníningartími og mæling á tíðni stökkbrigða

27. Eftir meðhöndlunartímann eru frumurnar ræktaðar til að gera þeim kleift að tjá svipfar stökkbrigðisins. Að jafnaði nægja minnst 7 til 9 dagar til þess að svipfarstjáníning nýlega framkallaðra *Hprt*- og *xprt*-stökkbrigða verði því sem næst í hámarki. Á þessu tímabili eru frumur reglulega afræktaðar til að viðhalda veldisvexti þeirra. Eftir svipfarstjáníningu er frumum endursáð í æti með og án valvísa efnisins (6-þiógúanín) til að annars vegar ákvarða fjölda stökkbrigða og hins vegar klónunarhæfni þegar stökkbrigðin eru valin. Hægt er að framkvæma sánunguna í skálum fyrir einlaga ræktir eða örtítrunarbökkum fyrir frumur í svíflausn. Fyrir val á stökkbrigðum skal sá frumum þétt til að tryggja bestu endurheimt stökkbrigða (þ.e. forðast efnaskiptasamvinnu) (17. heimild). Bakkarnir eru hafðir í ræktun hæfilega lengi (t.d. í 7–12 daga) fyrir hámarksvöxt þyrpinga, og þyrpingar taldar. Tíðni stökkbrigða er reiknuð út frá fjölda stökkbreyttra þyrpinga sem er leiðréttur með klónunarhæfni þegar stökkbrigðin eru valin (sjá formúlur í 2. viðbæti).

**Hæfni rannsóknarstofunnar**

28. Rannsóknarstofan skal framkvæma röð tilrauna með jákvæðum viðmiðunarefnum í mismunandi gangvirkjum (að lágmarki eitt virkt með og eitt virkt án efnaskiptavirkjunar sem eru valin úr efnunum sem eru skráð í töflu 1) og mismunandi neikvæðum samanburðum (með mismunandi leysum/burðarefnum) til að staðfesta að nægileg reynsla sé af prófuninni áður en hún er notuð í venjubundnar prófanir. Svaranirnar í þessum jákvæðu og neikvæðu samanburðum skulu vera í samræmi við heimildir. Þetta á ekki við um rannsóknarstofur sem þegar hafa reynslu, þ.e. hafa tiltækan grunn með rannsóknarsögulegum gögnum eins og skilgreint er í 30.–33. lið.
29. Kanna skal nokkur valin jákvæð samanburðarefni (sjá töflu 1 í 25. lið) án og með efnaskiptavirkjun til að sýna fram á hæfni við greiningu á stökkbreytandi íðefnum, ákvarða skilvirkni efnaskiptavirkjunarkerfisins og sýna fram á hversu viðeigandi skilyrðin til frumvaxtar eru meðan á meðhöndlun stendur, við svipfarstjáningu og við val á stökkbrigðum og hversu viðeigandi talningaraðferðirnar eru. Velja skal styrksvið völdu efnanna þannig að það fáiast samanburðarnákvæmar og styrktengdar aukningar sem eru hærri en bakgrunnsgildið til að sýna fram á næmi og styrksvið prófunarkerfisins.

**Rannsóknarsöguleg samanburðargögn**

30. Rannsóknarstofan skal ákvarða:
- svið og dreifingu jákvæðs samanburðar samkvæmt rannsóknarsögu,
  - svið og dreifingu neikvæðs samanburðar (ómeðhöndlað, leysir) samkvæmt rannsóknarsögu.
31. Þegar gagna er fyrst aflað um rannsóknarsögulega dreifingu neikvæða samanburðarins skulu samskeiða, neikvæðir samanburðir vera í samræmi við birt viðmiðunargögn (22. heimild). Þegar fer að bætast við af tilraunagögnum um dreifingu samanburðarins skal samskeiða neikvæði samanburðurinn helst haldast innan 95% stýrimarka þeirrar samanburðadreifingar (17., 45. og 46. heimild).
32. Rannsóknarsögulegur gagnagrunnur rannsóknarstofunnar um neikvæðan samanburð ætti í upphafi að byggjast á 10 tilraunum að lágmarki en æskilegra væri að hann samanstæði af a.m.k. 20 tilraunum sem eru gerðar við sambærileg tilraunaskilyrði. Rannsóknarstofur skulu nota gæðastýringaraðferðir s.s. stýririt (t.d. „C-charts, X-bar charts“ (47. heimild)) til að greina hversu breytileg viðmiðunargögn þeirra um jákvæða og neikvæða samanburði eru og til að sýna að stjórnun aðferðanna á rannsóknarstofunni sé í lagi (46. heimild). Frekari ráðleggingar um uppbyggingu rannsóknarsögulegra gagna og notkun þeirra (þ.e. viðmiðanir fyrir hvaða gögn eru höfð með og hver ekki í rannsóknarsögunni og ásættanleikaviðmiðanir fyrir tiltekna tilraun) er að finna í 45. heimild.
33. Gögn um neikvæða samanburði skulu samstanda af tíðni stökkbrigða úr stakri rækt eða helst samhliða ræktum, eins og lýst er í 23. lið. Samskeiða neikvæðir samanburðir skulu helst haldast innan 95% stýrimarka samanburðadreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gagnagrunni rannsóknarstofunnar um neikvæða samanburði (17., 45. og 46. heimild). Ef gögn um samskeiða neikvæðan samanburð lenda utan 95% stýrimarka fyrir samanburði getur þó verið ásættanlegt að hafa þau með í rannsóknarsögulegri samanburðardreifingu að því tilskildu að gögnin séu ekki mjög miklir einfatar og að það séu sannanir fyrir því að stjórnun prófunarkerfisins sé í lagi (sjá hér að framan) og engin merki um tæknileg eða mannleg mistök.
34. Allar breytingar á aðferðarlýsingu tilraunar skulu gerðar með tilliti til samræmis þeirra við fyrirbyggjandi rannsóknarsögulegan gagnagrunn rannsóknarstofunnar um samanburði. Allt verulegt ósamræmi skal hafa í för með sér stofnun nýs rannsóknarsögulegs gagnagrunns um samanburði.



## GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

**Framsetning niðurstaðna**

35. Framsetning niðurstaðna skal innihalda öll þau gögn sem þarf til að reikna út frumueiturhrif (gefin upp sem RS). Gögnin fyrir bæði meðhöndlaðar ræktir og samanburðarræktir skulu innihalda fjölda frumna í lok meðhöndlunar, fjölda frumna sem er sáð strax að meðhöndlun lokinni og fjölda þyrpinga (eða fjölda hola án þyrpinga ef um er að ræða örtítrunaraðferðina). RS fyrir hverja rækt skal gefið upp sem hlutfall samskeiða samanburða með leysi (sjá skilgreiningar í I. viðbæti).
36. Framsetning niðurstaðna skal einnig innihalda öll þau gögn sem þarf til að reikna út tíðni stökkbrigða. Gögn fyrir bæði meðhöndlaðar ræktir og samanburðarræktir skulu innihalda: 1) fjölda frumna sem sáð er með og án valvísa efnisins (þegar frumunum er sáð fyrir val á stökkbrigðum) og 2) fjölda þyrpinga sem taldar eru (eða fjölda hola án þyrpinga ef um er að ræða örtítrunaraðferð) af bökkunum með og án valvísa efnisins. Tíðni stökkbrigða er reiknuð út frá fjölda stökkbreyttra þyrpinga (á bökkunum með valvísa efninu) sem er leiðréttur með klónunarhæfni (af bökkunum án valvísa efnisins). Tíðni stökkbrigða skal gefin upp sem fjöldi stökkbreyttra frumna á hverja milljón lífvænlegra frumna (sjá skilgreiningar í 1. viðbæti).
37. Skrá skal gögn um hverja rækt fyrir sig. Auk þess skal taka öll gögn saman í töflu.

**Viðmiðanir fyrir ásættanleika**

38. Samþykki fyrir prófun byggist á eftirfarandi viðmiðunum:
- Samskeiða neikvæði samanburðurinn er talinn ásættanleg viðbót við rannsóknarsögulegan gagnagrunn rannsóknarstofunnar um neikvæðan samanburð, eins og lýst er í 33. lið.
  - Samskeiða jákvæðir samanburðir (sjá 24. lið) skulu vekja svananir sem eru sambærilegar við þær sem er aflað í rannsóknarsögulega gagnagrunninum um jákvæðan samanburð og valda tölfræðilega marktækri aukningu miðað við samskeiða neikvæða samanburðinn.
  - Tvenn tilraunaskilyrði (þ.e. með og án efnaskiptavirkjunar) voru prófuð nema eitt þeirra hafi gefið jákvæðar niðurstöður (sjá 25. lið).
  - Nægilegur fjöldi frumna og styrkleika er greinanlegur (25., 26. og 19. liður).
  - Viðmiðanirnar fyrir valinu á hæsta styrkleika eru í samræmi við það sem lýst er í 20., 21. og 22. lið.

**Mat og túlkun á niðurstöðum**

39. Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefnið talið valda greinilegri jákvæðri svörun, við einhver af tilraunaskilyrðunum sem eru skoðuð, ef:
- að minnsta kosti einn prófunarstyrkleikanna sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,
  - aukningin er styrktengd í mati með viðeigandi leitniþrófun,

- einhver niðurstaðnanna lendir utan dreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gögnum um neikvæða samanburði (t.d. 95% stýrimörk fyrir samanburð byggð á Poisson; sjá 33. lið).

Ef allar þessar viðmiðanir eru uppfylltar er litið svo á að prófunaríðefnið geti vakið genastökkbreytingar í ræktuðum spendýrafrumum í þessu prófunarkerfi. Ráðleggingar um hvaða tölfræðiaðferðir eiga best við er að finna í 46. og 48. heimild.

40. Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefnið talið valda greinilegri neikvæðri svörun, við einhver af tilraunaskilyrðunum sem eru skoðuð, ef:

- enginn prófunarstyrkleikanna sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,

- það er engin styrktengd aukning í mati með viðeigandi leitniprofun,

- allar niðurstöðurnar lenda innan dreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gögnum um neikvæða samanburði (t.d. 95% stýrimörk fyrir samanburð byggð á Poisson; sjá 33. lið).

Þá er litið svo á að prófunaríðefnið geti ekki vakið genastökkbreytingar í ræktuðum spendýrafrumum í þessu prófunarkerfi.

41. Ekki er gerð krafa um sannprófun á skýrri, jákvæðri eða neikvæðri svörun.

42. Ef svörunin er hvorki greinilega neikvæð né greinilega jákvæð, eins og lýst er hér á undan, eða til að auðvelda ákvörðun á líffræðilegu mikilvægi niðurstöðu, skulu gögnin metin samkvæmt sérfræðialíti og/eða frekari rannsóknir gerðar. Það getur verið gagnlegt að gera endurtekna tilraun, mögulega með því að nota breytt tilraunaskilyrði (t.d. styrkleikabil, önnur skilyrði við efnaskiptavirkjun [þ.e. styrk eða uppruna S9]).

43. Í örfáum tilvikum gefa gögnin ekki kost á ályktunum um jákvæðar eða neikvæðar niðurstöður, jafnvel eftir frekari rannsóknir. Því er ályktað að svörun prófunaríðfnisins sé tvíræð (túlkuð þannig að hún er jafnlíkleg til að vera jákvæð eða neikvæð).

### **Prófunarskýrsla**

44. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

#### *Prófunaríðefni:*

- uppruni, lotunúmer, síðasti notkunardagur, ef hann liggur fyrir,

- stöðugleiki prófunaríðfnisins, ef hann er þekktur,

- leysni og stöðugleiki prófunaríðfnisins í leysinum, ef þekkt,

- mæling á sýrustigi, osmóalstyrk og botnfellingu í ræktunarrætinu sem prófunaríðefninu var bætt í, eins og við á.

Efni með einum efnisþætti:

- útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,
- efnafræðileg sanngreining, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.

Fjölþáttaefni, UVCB-efni og blöndur:

- lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.

*Leysir:*

- rök fyrir vali á leysi,
- hundraðshluti leysis í lokaræktunarætinu.

*Frumur:*

Fyrir móðurræktir á rannsóknarstofu:

- gerð, uppruni frumulna,
- fjöldi umsáninga, ef hann liggur fyrir, og rannsóknarstofusaga,
- einkenni kjarngerðarinnar og/eða eðlilegur fjöldi litninga
- aðferðir til að viðhalda frumuræktum,
- upplýsingar um að frumurnar séu ekki smitaðar berfrymingum,
- tvöföldunartími frumna.

*Prófunarskilyrði:*

- rök fyrir vali á þeim styrkleikum og fjölda rækta sem eru notuð, t.d. gögn um frumueiturhrif og takmarkanir á leysni,
- samsetning ræktunarætis, styrkur CO<sub>2</sub>, rakastig,
- styrkleiki prófunaríðefnisins, gefinn upp sem lokastyrkur í ræktunarætinu (t.d. í µg eða mg/ml eða mM af ræktunaræti),

- styrkleiki (og/eða rúmmál) leysis og prófunaríðfnis sem er bætt í ræktunarætið,
- ræktunarhiti,
- ræktunartími,
- lengd meðhöndlunar,
- þéttleiki frumna við meðferð,
- gerð og samsetning efnaskiptavirkjunarkerfisins (uppruni S9, tilreiðsluaðferð S9-blöndunnar, styrkleiki eða rúmmál S9-blöndunnar og S9 í lokaræktunarætinu, gæðaeftirlit með S9),
- jákvæð og neikvæð samanburðarefni, lokastyrkleiki við öll meðhöndlunarskilyrði,
- lengd tjáningartíma (m.a. fjöldi frumna sem er sáð, undirréktir og áætlanir um næringargjöf, ef við á),
- auðkenni valvísu efnisins og styrkleikur þess,
- viðmiðanir fyrir ásættanleika prófana,
- aðferðir sem eru notaðar til að finna fjölda lífvænlegra og stökkbreyttra frumna,
- aðferðir sem eru notaðar við mælingar á frumueiturhrifum,
- allar viðbótarupplýsingar sem skipta máli varðandi frumueiturhrif og aðferðina sem er notuð,
- tímalengd ræktunar eftir sáningu,
- viðmiðanir til að meta hvort niðurstöður rannsókna séu jákvæðar, neikvæðar eða tvíræðar,
- aðferðir sem eru notaðar til að ákvarða sýrustig, osmólalstyrk og útfellingu.

*Niðurstöður:*

- fjöldi frumna í hverri rækt sem eru meðhöndlaðar og fjöldi frumna í hverri rækt sem eru afræktaðar,
- mælingar á frumueiturhrifum og aðrar athuganir ef þær eru gerðar,
- merki um útfellingu og hvenær hún er ákvörðuð,

- fjöldi frumna sem er sáð í æti með valvísa efninu og í æti sem er ekki með valvísa efninu,
- fjöldi þyrpinga í ætinu með valvísa efninu og fjöldi þyrpinga í ætinu sem er ekki með valvísa efninu, og tengd tíðni stökkbrigða,
- tengsl milli styrks og svörunar, ef unnt er,
- gögn um samskeiða, neikvæðan (leysir) og jákvæðan samanburð (styrkleikar og leysar),
- rannsóknarsöguleg gögn um neikvæðan (leysir) og jákvæðan samanburð, ásamt sviðum, meðaltölum og staðalfrávikum og öryggisbili (t.d. 95%), sem og fjöldi gagna,
- tölfræðilegar greiningar (fyrir stakar ræktir og safnsýni samhliða prófunar, ef við á) og p-gildi ef þau liggja fyrir.

*Umfiöllun um niðurstöðurnar.*

*Niðurstaða*

#### **HEIMILDIR**

- 1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.
- 2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.
- 3) Chu E.H.Y. and Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306-1312.
- 4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. and Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. *Mutagen. Res.*, 4, 394-403.
- 5) Aaron C.S. and Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. *Mutation Res.*, 223, 121-128.
- 6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. and Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.*, 312, 235-239.
- 7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. and Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program. *Mutation Res.*, 196, 17-36.
- 8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. and Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257, 147-204.

- 9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. and Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268, 297-305.
- 10) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, *Environ. Mutagen.*, 8, 789-886.
- 11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. and Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitritotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutation Res.*, 49, 439-452.
- 12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. and Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, *Mutation Res.*, 634, 177-183.
- 13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., and Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. *Mutation Res.*, 5841-256.
- 14) Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. and Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. *Mutation Res.*, 189, 135-141.
- 15) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. *Mutation Res.*, 216, 9-17.
- 16) Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. and Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. *Mutation Res.*, 160, 133-147.
- 17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. and Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. Í: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (Eds.), Cambridge University Press, bls. 66-101.
- 18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., and Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 86, 193-214.
- 19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, *Mutation Res.*, 85, 165-175.
- 20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., and Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2gpt-Transformed Cells, *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1411-1415.
- 21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., and Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. *Proc Natl Acad Sci.*, 83(24): 9616-9620.

- 22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Handrit í vinnslu).
- 23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. and Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, 33, 261-287.
- 24) Rosen M.P., San R.H.C. and Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299-305.
- 25) Natarajan A.T., Tate A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. and de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, 83-90.
- 26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. and Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.
- 27) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347-364.
- 28) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173, 215.
- 29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. and Wolf R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen. 7, 175-177.
- 30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. and Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. Í: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. and Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, bls. 85-88.
- 31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. and Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. Pathol. Toxicol., 4, 55-65.
- 32) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28, 51-59.
- 33) UNEP. (2001). Stokkhólmssamningur um þrávirk lífræn efni, Umhverfisstofnun Sameinuðu þjóðanna. Aðgengilegt á: [<http://www.pops.int.html>].
- 34) Tan E.-L. and Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina  $C\gamma$  Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. Mutation Res., 84, 147-156.

- 35) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Camalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. *Environ. Mol. Mutation.*, 4, 7-18.
- 36) Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. *Environ. Mol. Mutation*, 4, 7-18.
- 37) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. Í: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, bls. 91-103.
- 38) Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. and Brooks A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environ. Mutagen.*,5, 795-801.
- 39) OECD (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Viðmiðunarreglur 473, 476 og 487 um prófanir). Aðgengilegt samkvæmt beiðni hjá Efnahags- og framfarastofnuninni.
- 40) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, *Environ. Mol. Mutation*, 54, 36-43.
- 41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances,
- 42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Aðgengilegt á: [<https://federalregister.gov/a/2012-13774>].
- 43) O'Neill J.P. and Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguanine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), *Mutation, Res.*, 59, 109-118.
- 44) Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., and Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. *Mutation, Res.*, 1335(2):121-8.
- 45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., and Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, *Mutation, Res.*, 723, 87-90.
- 46) OECD (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No 199), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., and Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. Í: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, bls. 141-154.
- 48) Fleiss J. L., Levin B., and Paik M. C. (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, Third Edition, New York: John Wiley & Sons



*I. viðbætur*

## SKILGREININGAR

Stökkbreytivaldur sem veldur basaskiptum: íðefni sem valda því að skipti verða á basapörum í DNA-sameindinni.

Íðefni: efni eða blanda.

Klónunarhæfni: Hlutfall frumna sem er sáð í litlum þéttleika og geta vaxið til að mynda þyrpingu sem hægt er að telja.

Styrkleiki: vísar til lokastyrkleika prófunaríðefnisins í ræktunarætinu.

Frumueiturhrif: Að því er varðar rannsóknir sem þessi prófunaraðferð nær yfir eru frumueiturhrif greind sem minnkun hlutfallslegrar lifunar hjá meðhöndluðu frumunum borið saman við neikvæða samanburðinn (sjá viðeigandi lið).

Frumstökkbreyting: genastökkbreyting frá foreldragerð í stökkbrigði sem veldur því að ensímvirgni eða hlutverk táknaða prótínsins breytist eða glatast.

Fasabreytandi efni: íðefni sem valda því að eitt eða nokkur basapör bætast við í DNA-sameindinni eða falla brott úr henni.

Erfðaeiturhrif: almennt hugtak sem nær yfir allar gerðir skaða á DNA eða litningum, þ.m.t. DNA-rof, viðbætur, endurröðun, stökkbreytingar, litningabreytingar og mislitnun. Erfðaeiturhrif hafa ekki öll í för með sér stökkbreytingar eða stöðugar litningaskemmdir

HAT-æti: æti sem inniheldur hýpóxantín, amínópterín og týmidín, notað til að hreinsa Hprrt-stökkbrigði.

Endurröðun í jafnskiptingu: endurröðun milli samstæðra litningsþráða meðan á mítósu stendur, leiðir hugsanlega til vakningar á rofi DNA-tvíþátta eða til taps á arfblendni.

MPA-æti: æti sem inniheldur xantín, adenín, týmidín, amínópterín og mýkófénólsýru, notað til að hreinsa Xprrt-stökkbrigði.

Stökkbreyting: veldur arfgengri breytingu á röð eða röðum DNA-basapara í litningum eða breytingu á byggingu litninga (litningabreytingum).

Tíðni stökkbrigða: fjöldi stökkbreyttra þyrpinga sem greinast deilt með fjölda frumna sem er sáð í ætið með valvísá efninu, leiðrétt með klónunarhæfni (eða lífvænleika) þegar stökkbrigði eru valin.

Svipfarstjáníngartími: Tíminn sem er liðinn frá meðhöndlun þegar erfðafræðilega breytingin er fest í genamenginu og allar genaafurðir sem fyrir eru hverfa þannig að svipfarseinkennin breytast.

Hlutfallsleg lifun (RS): RS er notuð sem mælikvarði á meðhöndlunartengd frumueiturhrif. RS er klónunarhæfni (CE) frumna sem er sáð strax að meðhöndlun lokinni, leiðrétt m.t.t. frumutaps í meðhöndlun samanborið við klónunarhæfni í neikvæðum samanburðum (með 100% lifun).

S9-lifrarþættir: flot af lifrarjafningi eftir skiljun við 9000 g, þ.e. útdráttur úr hrárrí lifur.

S9-blanda: blanda af S9-lifrarþættinum og hjálparþáttunum sem eru nauðsynlegir fyrir virkni efnaskiptaensíma.

Samanburður með leysi: almennt hugtak til útskýringar á samanburðarræktum sem í er eingöngu settur leysirinn sem er notaður til að leysa upp prófunaríðefnið.

Prófunaríðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

Ómeðhöndlaður samanburður: ræktir sem eru ekki meðhöndlaðar (þ.e. hvorki með prófunaríðefni né leysi) en eru unnar samtímis og á sama hátt og ræktirnar sem prófunaríðefnið er sett í.

UVCB-efni: Efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni og líffræðileg efni

## 2. viðbætur

## FORMÚLUR FYRIR MAT Á FRUMEITURHRIFUM OG TÍÐNI STÖKKBRIGÐA

Frumueiturhrif eru metin með hlutfallslegri lifun, þ.e. klónunarhæfni (CE) frumna sem er sáð strax að lokinni meðhöndlun, leiðrétt m.t.t. frumutaps í meðhöndlun samanborið við leiðrétt klónunarhæfni í neikvæðum samanburðum (með 100% lifun) (sjá formúluna fyrir hlutfallslega lifun hér á eftir)

Leiðrétt CE fyrir rækt sem er meðhöndluð með prófunaríðefni er reiknuð út sem:

$$\text{Leiðrétt CE} = \frac{\text{Fjöldi frumna í lok meðhöndlunar}}{\text{Fjöldi frumna við upphaf meðhöndlunar}}$$

RS fyrir rækt sem er meðhöndluð með prófunaríðefni er reiknuð út sem:

$$\text{RS} = \frac{\text{Leiðrétt CE í meðhöndlaðri rækt}}{\text{Leiðrétt CE í samanburði með leysi}} \times 100$$

Tíðni stökkbrigða er klónunarhæfni þyrpinga með stökkbreyttum frumum í ætinu með valvísu efninu deilt með klónunarhæfni í ætinu sem er ekki með valvísu efninu, mælt fyrir sömu rækt þegar stökkbrigði eru valin.

$$\text{Tíðni stökkbrigða} = \frac{\text{Klónunarhæfni þyrpinga með stökkbreyttum frumum í ætinu með valvísu efninu}}{\text{Klónunarhæfni í ætinu sem er ekki með valvísu efninu}}$$

Þegar bakkar eru notaðir fyrir klónunarhæfni:

CE = fjöldi þyrpinga / fjöldi frumna sem sáð er

Þegar örtítrunarbakkar eru notaðir fyrir klónunarhæfni:

Fjöldi þyrpinga í hverri holu á örtítrunarbökkum fylgir Poisson-dreifingu.

Klónunarhæfni =  $\text{LnP}(0)$  / fjöldi frumna sem er sáð í hverja holu

Ef  $-\text{LnP}(0)$  er hugsanlegur fjöldi tómrar hola af þeim holum sem sáð var í og er lýst með eftirfarandi formúlu:

$\text{LnP}(0) = -\text{Ln}(\text{fjöldi tómrar hola} / \text{fjöldi hola sem sáð var í})$

- 3) Í stað kafla B.22 í B-hluta kemur eftirfarandi:

„B.22 PRÓFUN Á RÍKJANDI BANAGENUM HJÁ NAGDÝRUM

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 478 um prófanir (2016). Prófunaraðferðir eru endurskoðaðar reglulega í ljósi framfara á sviði vísinda, þarfa á nýrri löggjöf og sjónarmiða er varða velferð dýra. Þessi breytta útgáfa af prófunaraðferðinni endurspeglar rúmlega þrjátíu ára reynslu af þeirri prófun og möguleikann á að samþætta þessa prófun eða sameina hana öðrum eiturhrifaprófunum s.s. rannsóknum á þroska, eiturhrifum á æxlun eða erfðaeiturhrifum; vegna takmarkana prófunarinnar og notkunar á miklum fjölda dýra er þessi greining þó ekki ætluð sem megináðferð heldur frekar sem viðbótarprófunaraðferð sem skal aðeins nota ef enginn annar staðgöngukostur er fyrir hendi m.t.t. krafna samkvæmt reglum. Með því að sameina eiturhrifaprófanir er hægt að hlífa miklum fjölda dýra við notkun í eiturhrifaprófunum. Efnahags- og framfarastofnunin hefur þróað skjal sem veitir gagnorðar upplýsingar um prófanir varðandi erfðafræðilega eiturefnafræði og yfirlit yfir nýlegar breytingar sem voru gerðar á OECD-viðmiðunarreglunum um prófanir varðandi erfðafræðilega eiturefnafræði (1. heimild).
2. Tilgangurinn með prófun á ríkjandi banagenum er að rannsaka hvort íðefni kalla fram stökkbreytingar sem verða vegna litningabreytinga í kímfrumum. Auk þess hentar prófun á ríkjandi banagenum til að meta erfðaeiturhrif þar sem þættir í efnaskiptum, lyfjahvörfum og viðgerðarferli DNA eru virk *í lífi* og stuðla að svörun, þótt þessir þættir séu hugsanlega breytilegir eftir dýrategundum. Ef ríkjandi banvæn stökkbreyting kemur fram eftir váhrif frá prófunariðefni bendir það til þess að íðefnið hafi haft áhrif á kímvef tilraunadýrsins.
3. Ríkjandi banvænar stökkbreytingar leiða til dauða fósturvísis eða fósturs. Ef ríkjandi banvæn stökkbreyting kemur fram eftir váhrif frá prófunariðefni bendir það til þess að íðefnið hafi haft áhrif á kímfrumur tilraunadýrsins.
4. Greining á ríkjandi banagenum er gagnleg til staðfestingar á jákvæðum niðurstöðum úr prófunum þar sem notaðir eru líkamsendapunktur *í lífi* og er mikilvægur endapunktur til að spá fyrir um áhættu fyrir menn og áhættu á erfðasjúkdómum sem berast gegnum kímlínuna. Þessi greining krefst þó mikils fjölda dýra og mikillar vinnu og er þar af leiðandi afar kostnaðarsöm og tímafrek í framkvæmd. Þar eð tíðni sjálfsprottinna ríkjandi banvænna stökkbreytinga er mjög há er næmi greiningarinnar til að greina litla aukningu í tíðni stökkbreytinga almennt takmörkuð.
5. Skilgreiningar á lykilhugtökum eru settar fram í 1. viðbæti.

ATRIÐI SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

6. Prófunin er oftast gerð á músum (2.–4. heimild) en í sumum tilvikum gæti átt við að nota aðrar tegundir s.s. rottur (5.–8. heimild) ef fyrir því eru vísindaleg rök. Ríkjandi banagen koma yfirleitt til vegna mikilla litningabreytinga (breytinga á byggingu og fjölda litninga) (9.–11. heimild), en ekki er hægt að útiloka genastökkbreytingar. Ríkjandi banvæn stökkbreyting er stökkbreyting sem verður í kímfrumunni sem slíkri, eða í ungum fósturvísi eftir frjóvgun, sem veldur ekki truflun á starfsemi kynfrumanna en er banvæn fyrir frjóvguð egg eða fósturvísi sem er að þroskast.
7. Karldýrin eru þöruð raðbundið hvert fyrir sig með kvendýrum, sem hafa aldrei fengið fang (e. *virgin female*), með hæfilegum millibilum. Fjöldi parana eftir meðferð fer eftir endanlegum tilgangi rannsóknarinnar á ríkjandi banagenum (23. liður) og skal tryggja að öll stig þroskunar kímfrumna karldýra séu metin að því er varðar ríkjandi banagen (12. heimild).
8. Þessi prófun hentar ekki ef sannanir eru fyrir því að prófunariðefnið eða umbrotsefni þess nái ekki út í eistu.

## MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

9. Venjulega eru karldýr látin verða fyrir váhrifum frá prófunariðefninu eftir viðeigandi váhrifaleið og þöruð við ómeðhöndluð kvendýr sem hafa aldrei fengið fang. Hægt er að prófa ólík kímfrumustig með því að nota raðbundin þörunartímabil. Kvendýrin eru aflífuð að hæfilegum tíma liðnum eftir þörun og leg þeirra rannsökuð til að ákvarða fjölda fanga og lifandi og andvana fósturvísa. Ríkjandi banvæni prófunariðefnis er ákvarðað með því að bera saman lifandi fong á hvert kvendýr í meðferðarhópnum og lifandi fong á hvert kvendýr í samanburðarhópnum sem fær burðarefni eða leysi. Fjölgun dauðra fanga á hvert kvendýr í meðferðarhópnum, miðað við fjölda dauðra fanga á hvert kvendýr í samanburðarhópnum, endurspeglar fanglát eftir hreiðrun af völdum prófunariðefnisins. Fanglát eftir hreiðrun er reiknað út með því að ákvarða hlutfallið milli dauðra fanga og heildarfjölda fanga í meðferðarhópnum miðað við hlutfall dauðra fanga og heildarfjölda fanga í samanburðarhópnum. Hægt er að meta fanglát fyrir hreiðrun með því að bera saman fjölda gulbúa að frádregnum heildarfjölda fanga eða heildarfjölda fanga á hvert kvendýr í meðferðar- og samanburðarhópnum.

## SANNPRÓFUN Á HÆFNI RANNSÓKNARSTOFU

10. Til að staðfesta hæfi til að framkvæma þessa greiningu skal sýna fram á getu til að endurtaka tíðni ríkjandi banagena út frá útgefnum gögnum (t.d. 13.–18. heimild) með jákvæðum samanburðarefnum (þ.m.t. veikar svaranir), s.s. þeim sem eru talin upp í töflu 1, og með samanburði með burðarefni, og fá fram tíðni neikvæðra samanburða sem er í samræmi við viðunandi gagnasvið (sjá tilvísanir hér að framan) eða með rannsóknarsögulegri dreifingu samanburða hjá viðkomandi rannsóknarstofu, ef hún liggur fyrir.

## LÝSING Á AÐFERÐINNI

**Undirbúningur***Val á dýrategund*

11. Nota skal heilbrigð, kynþroska dýr af algengum rannsóknarstofustofnum. Algengt er að nota mýs en einnig getur átt við að nota rottur. Heimilt er að nota aðrar heppilegar tegundir spendýra ef sett eru fram vísindaleg rök í skýrslunni.

*Aðbúnaður dýra og fóðrun*

12. Að því er varðar nagdýr skal hiti í vistarverum dýranna vera 22 °C ( $\pm 3$  °C). Þótt æskilegt rakastig sé 50–60%, skal það að minnsta kosti vera 40% og helst ekki fara yfir 70%, nema við þrif á vistarverunum. Nota skal gervilyngu og hafa til skiptis birtu í 12 klukkustundir og myrkur í 12 klukkustundir. Nota má hefðbundið rannsóknarstofufóður ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni. Val á fóðri kann að ráðast af því að hægt sé að blanda prófunariðefni í fóðrið á viðeigandi hátt þegar það er gefið með þessari aðferð. Fyrir meðferð eða þörun skulu nagdýr vera í búri í litlum hópum (ekki fleiri en fimm saman) af sama kyni ef árásgirni er ekki vænst eða hún kemur ekki fram, helst í traustum búrum með viðeigandi umhverfisfjölbreytni. Dýr mega vera hvert í sínu búri ef fyrir því liggja vísindaleg rök.

*Undirbúningur dýranna*

13. Heilbrigðum og kynþroska fullvöxnum karl- og kvendýrum er slembiráðað í samanburðar- og meðferðarhópnum. Hvert dýr skal auðkennt sérstaklega með mannúðlegri aðferð með lágmarks inngripi (t.d. með merkingu með hring, ífestu spjalda, örflögu eða lífkenni, en ekki afklippingu taa og mörkun eyrna) og það látið laga sig að umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni í minnst fimm daga. Koma skal búrunum þannig fyrir að staðsetning þeirra hafi sem minnst áhrif. Forðast skal víxlmengun af völdum jákvæða samanburðarins og prófunariðefnisins. Við upphaf rannsóknarinnar skal breytileiki í þyngd dýranna, sem eru notuð, að vera í lágmarki og ekki víkja meira en  $\pm 20\%$  frá meðalþyngd hvors kyns um sig.

*Tilreiðsla skammta*

14. Prófunaríðefni í föstu formi skulu leyst upp eða blönduð í sviflausn með viðeigandi leysum eða burðarefnum eða blandað í fóður eða drykkjarvatn áður en þau eru skömmtuð dýrunum. Gefa má dýrunum fljótandi prófunaríðefni óblönduð eða þynnt fyrir skammtagjöf. Ef greina á váhrif við innöndun má gefa prófunaríðefni sem gas, gufu eða sem fast/fljótandi úðafni, allt eftir eðlisefnafræðilegum eiginleikum þeirra. Nota skal ferskar blöndur af prófunaríðefninu nema gögn um stöðugleika staðfesti að efnið þoli geymslu og tiltaki viðeigandi geymsluskilyrði.

**Prófunarskilyrði***Leysir/burðarefni*

15. Leysirinn eða burðarefnið skal ekki valda eiturrifum við þær skammtastærðir sem eru notaðar og vissa skal vera fyrir því að efnin hvarfist ekki við prófunaríðefnið. Ef notaður er lítt þekktur leysir eða burðarefni skal notkunin studd gögnum sem staðfesta samhæfi þeirra. Mælt er til þess, verði því við komið, að fyrst sé kannað hvort nota megi vatnskenndan leysi eða burðarefni. Dæmi um algengan samrýmanlegan leysi/burðarefni er vatn, lífeðlisfræðileg saltlausn, metýlsellulósalausn, saltlausn úr natríumkarboxýmetýlsellulósa, ólífuolía og maísolía.

*Jákvæðir samanburðir*

16. Ávallt skal nota dýr í samskeiða jákvæðum samanburði nema ef rannsóknarstofan hefur sýnt fram á hæfni við framkvæmd prófunarinnar og hefur notað prófunina venjubundið nýlega (t.d. síðastliðin fimm ár). Þó er ekki nauðsynlegt að meðhöndla dýr í jákvæðum samanburði með sömu íkomuleið og dýr sem fá prófunaríðefnið eða að taka sýni á öllum þörunartímabilum. Jákvæðu samanburðarefnin skulu vera þekkt fyrir að framkalla ríkjandi banagen við skilyrðin sem notuð eru í prófuninni. Dýrin í samanburðarhópnum skulu fá nákvæmlega sömu meðhöndlun og dýrin í meðferðarhópnum að öðru leyti en því að þau fá ekki meðferð.
17. Velja skal skammtastærðir jákvæðu samanburðarefnanna með tilliti til þess að framkalla væg eða meðalsterk áhrif sem gera kleift að meta frammistöðu og næmleika greiningarinnar á gagnrýninn hátt, en framkalla stöðugt jákvæð ríkjandi, banvæn áhrif. Dæmi um jákvæð samanburðarefni og viðeigandi skammta er að finna í töflu 1.

*Tafla 1***Dæmi um jákvæð samanburðarefni.**

Efni [CAS-nr.] (tilvísunarnúmer)	Skilvirkt skammtasvið (mg/kg) (nagdýrategund)	Inngjafartímabil (dagar)
Trítýlenmelamín [15-18-3](15. heimild)	0,25 (mýs)	1
Sýklófosfamíð [50-18-0] (19. heimild)	50–150 (mýs)	5
Sýklófosfamíð [50-18-0] (5. heimild)	25–100 (rottur)	1
Etýlmetansúlfónat [62-50-0] (13. heimild)	100–300 (mýs)	5
Einliðuakrýlamíð [79-06-1] (17. heimild)	50 (mýs)	5
Klórambúsíl [305-03-3] (14. heimild)	25 (mýs)	1

*Neikvæðir samanburðir*

18. Í hvert skipti sem sýni eru tekin skal hafa með dýr í neikvæðum samanburði sem eru meðhöndluð einvörðungu með leysi eða burðarefni og að öðru leyti meðhöndluð á sama hátt og meðferðarhóparnir (20. heimild). Ef ekki eru fyrir hendi rannsóknarsöguleg eða útgefin samanburðargögn sem sýna að leysirinn/burðarefnið, sem varð fyrir valinu, framkalli ekki ríkjandi banagen eða önnur skaðleg áhrif skal einnig hafa með ómeðhöndluð samanburðardýr í hvert skipti sem sýni eru tekin, til að byggja upp ásættanleika fyrir burðarefnissamanburðinn.

## VERKFERLI

**Fjöldi dýra**

19. Karldýrin eru þöruð raðbundið hvert fyrir sig, með fyrir fram ákveðnum hæfilegum millibilum (t.d. vikulega, 21. og 23. liður), helst með kvendýri sem hefur aldrei fengið fang. Fjöldi karldýra á hvern hóp skal ákveðinn fyrir fram til að hann sé nægilegur (ásamt fjölda paraðra kvendýra á hverju pörunartímabili) til að tryggja nauðsynlegan tölfræðilegan styrk til að greina minnst tvöföldun í tíðni ríkjandi banagena (44. liður).
20. Fjöldi kvendýra á hverju pörunartímabili skal einnig fyrir fram ákveðinn með útreikningum á tölfræðilegum styrk til að gera kleift að greina minnst tvöföldun í tíðni ríkjandi banagena (þ.e. nógu mörg kvendýr með fangi til að föngin séu a.m.k. 400 í heild) (20.–23. heimild) og búist sé við minnst einu dauðu fangi á hverja greiningareiningu (þ.e. pörunarhópur á hvern skammt) (24. heimild).

**Inngjafartímabil og pörunartímabil**

21. Fjöldi pörunartímabila eftir meðferð stjórnast af meðferðaráætluninni og skal tryggja að öll stig þroskunar kímfrumna karldýra séu metin að því er varðar vakningu ríkjandi banagena (12. og 25. heimild). Fyrir staka meðferð með allt að fimm daglegum skammtagjöfum skal framkvæma 8 (mýs) eða 10 (rottur) paranir með viku millibili eftir síðustu meðferð. Þegar margir skammtar eru gefnir má fækka pörunartímabilum í hlutfalli við lengra skömmtunartímabil, svo fremi sem enn sé unnt að meta öll stig sæðismyndunar (t.d. nægja fjórar vikulegar paranir til að meta öll stig sæðismyndunar í músum eftir 28 daga váhrifatímabil). Allar meðferðar- og pörunaráætlanir skulu studdar vísindalegum rökum.
22. Kvendýr eru höfð hjá karldýrum á tímabili sem svarar til lengdar minnst eins gangferils (t.d. nær ein vika yfir einn gangferil hjá bæði músum og rottum). Kvendýr sem þöruðust ekki á vikutímabili má nota á næsta pörunartímabili. Að öðrum kosti þar til pörun hefur átt sér stað, sem sjá má af sæði í leggöngum eða tilvist leggangatappa.
23. Váhrifa- og pörunaráætlunin fer eftir endanlegum tilgangi rannsóknarinnar á ríkjandi banagenum. Ef markmiðið er að ákvarða hvort iðefni sem er gefið kalli fram ríkjandi banvæna stökkbreytingu eitt og sér væri viðurkennda aðferðin að láta heilan sæðismyndunarferil (t.d. 7 vikur hjá músum, 5–7 meðferðir á viku) verða fyrir váhrifum og pörun ætti að fara fram einu sinni í lokin. Ef markmiðið er hins vegar að greina þá kímfrumugerð sem er næm fyrir ríkjandi banvænum stökkbreytingum eru váhrif í eitt skipti eða í fimm daga og síðan vikulegri pörun ákjósanlegri.

**Skammtastærðir**

24. Ef engin nothæf gögn liggja þegar fyrir, sem gagnast við val á skömmtum, og forprófun til að ákvarða skammtastærðir er framkvæmd skal hún fara fram á sömu rannsóknarstofu og með sömu tegund, stofni, kyni og meðferðaráætlun og á að nota í meginrannsókninni (26. heimild). Markmið rannsóknarinnar skal vera að greina hámarksþolsskammt, sem er skilgreindur sem hæsti þolanlegi skammtur án vísbindinga um rannsóknartakmarkandi eiturhrif, í hlutfalli við lengd rannsóknartímabilsins (framkallar t.d. óeðlilegt atferli eða óeðlileg viðbrögð, minni háttar þyngdartap eða frumueiturhrif í blóðfrumnamyndandi kerfi), en ekki dauða eða merki um sársauka, þjáningar eða hræðslu sem gerir aflífun á mannúðlegan hátt nauðsynlega (27. heimild).

25. Hámarksþolsskammtur má heldur ekki hafa skaðleg áhrif á það hvernig tókst til við þörunina (21. heimild).
26. Gera má undantekningar frá viðmiðunum fyrir ákvörðun skammta þegar um er að ræða prófunaríðefni sem hafa sérhæfða lífvirkni í litlum skömmum sem kalla ekki fram eiturrhif (t.d. hormón og ræsar) og íðefni sem sýna mettun eiturefnahvarfaeiginleika, og þau skulu metin í hverju tilviki fyrir sig.
27. Til að fá fram upplýsingar um skammtasvörun skal í heildstæðri rannsókn taka með neikvæðan samanburðarhóp og minnst þrjár skammtastærðir sem eru almennt aðskildar með stuðli sem nemur 2 en ekki meira en 4. Ef prófunaríðefnið framkallar ekki eiturrhif í skammtastærðarannsókn eða byggt á fyrirliggjandi gögnum skal hæsti skammtur fyrir eina inngjöf vera 2000 mg/kg líkamsþyngdar. Ef prófunaríðefnið veldur eiturrhifum skal hámarksþolsskammtur þó vera hæsti skammtur sem er gefinn og skammtastærðirnar sem eru notaðar skulu helst spanna bilið frá mestu eiturrhifum niður í skammt sem framkallar lítil eða engin eiturrhif. Ef um er að ræða íðefni sem eru ekki eitruð er háskammturinn fyrir inngjafartímabil sem er 14 dagar eða lengra 1000 mg/kg líkamsþyngd/dag og fyrir inngjafartímabil sem er styttra en 14 dagar er háskammturinn 2000 mg/kg líkamsþyngd/dag.

### Gjöf skammta

28. Taka skal tillit til fyrirséðrar váhrifaleiðar fyrir menn við tilhögun mælingar. Því má velja íkomuleiðir váhrifa, s.s. með fæðu, drykkjarvatni, undir húð, í bláæð, staðbundnar, með innöndun, um munn (með magafóðrun) eða með ígræðslu, sem færð eru rök fyrir. Í öllum tilvikum skal velja íkomuleið sem tryggir nægileg váhrif á markvef(i). Alla jafna er ekki mælt með innsprautun í kviðarhol þar eð hún er ekki fyrirhuguð váhrifaleið fyrir menn og aðeins skal nota hana ef sérstök rök styðja það. Ef prófunaríðefninu er blandað í fóður eða drykkjarvatn, einkum ef um er að ræða staka skömmun, skal þess gætt að hlé milli neyslu fóðurs og vatns og þörunar sé nægilegt til að hægt sé að greina áhrifin (31. liður). Hámarksrúmmál vökva sem hægt er að gefa í einu með magafóðrun eða innsprautun ræðst af stærð tilraunadýrsins. Rúmmálið ætti alla jafna ekki að vera meira en 1 ml/100g líkamsþyngdar nema um sé að ræða vatnslausnir en þá má gefa að hámarki 2 ml/100g. Ef meira rúmmál en það er notað (ef löggjöf um velferð dýra heimilar það) skal það rökstutt. Halda skal rúmmálsfrávikum í lágmarki með því að stilla styrkleikann til að tryggja stöðugt rúmmál í hlutfalli við líkamsþyngdina fyrir allar skammtastærðir.

### Athuganir

29. Gera skal almennar, klínískar athuganir á tilraunadýrunum og skrá klínísk einkenni a.m.k. einu sinni á dag, helst á sama tíma eða sömu tímum á hverjum degi og með hliðsjón af því hvenær vænta má hámarksáhrifa af skammtagjöfinni. Öll dýr skulu skoðuð a.m.k. tvisvar á dag á skömmunartímabilinu með tilliti til dánar- og veikindatilvika. Öll dýr skulu vigtuð við upphaf rannsóknarinnar og a.m.k. vikulega meðan á rannsóknum með endurteknum skömmum stendur og við aflifun. Mæla skal fóðurát a.m.k. vikulega. Ef prófunaríðefnið er gefið með drykkjarvatni skal einnig mæla vatnsdrykkju í hvert skipti þegar skipt er um vatn og a.m.k. vikulega. Dýr sem sýna merki um umframeiturrhif sem ekki eru banvæn skulu aflífuð áður en prófunartímabilinu lýkur (27. heimild).

### Vefjasöfnun og vinnsla á vef

30. Kvendýrin eru aflífuð á seinni helmingi meðgöngu á 13. degi meðgöngu að því er varðar mýs og á 14.–15. degi meðgöngu að því er varðar rottur. Leg eru rannsökuð vegna ríkjandi banvænna áhrifa til að ákvarða fjölda fanga, lifandi og andvana fósturvísa og gulbúa.
31. Leghorn og eggjastokkar eru afhjúpuð til að telja gulbú og fóstur eru fjarlægð, talin og vigtuð. Þess skal gætt að rannsaka legið vegna fósturvisnunar, sem lifandi fóstur skyggja á, og tryggja að öll fósturvisnun sé tilgreind. Dánartíðni fóstura skal skráð. Einnig skal skrá fjölda kvendýra með fangi og heildarfjölda hreiðrana, fanglát fyrir hreiðrun og dánarhlutfall eftir hreiðrun (þ.m.t. snemmkomin og síðkomin fósturvisnun). Auk þess er hægt að geyma sjáanleg fóstur í Bouin-festiefni í a.m.k. tvær vikur og síðan rannsaka þau vegna stórvægilegrar ytri vansköpunar (28. heimild) til að fá viðbótarupplýsingar um áhrif prófunarefnis á æxlun og þroskun.



## GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

**Úrvinnsla niðurstaðna**

32. Gögn skal setja fram í töfluformi til að sýna fjölda paraðra karldýra, fjölda kvendýra með fangi og fjölda kvendýra sem eru ekki með fangi. Niðurstöður úr hverri þörun eru skráðar sérstaklega ásamt auðkennum hvers karldýrs og kvendýrs. Þörunartímabil, skammtastærð fyrir meðhöndluð karldýr og fjöldi lifandi fanga og dauðra fanga skulu tilgreind fyrir hvert kvendýr.
33. Fanglát eftir hreiðrun er reiknað út með því að ákvarða hlutfallið milli dauðra fanga og heildarfjölda fanga úr meðferðarhópnum miðað við hlutfall dauðra fanga og heildarfjölda fanga úr samanburðarhópnum sem fær burðarefni eða leysi.
34. Fanglát fyrir hreiðrun er reiknað út sem munurinn á fjölda gulbúa og fjölda hreiðraðra fanga eða sem fækkun á meðalfjölda hreiðraðra fanga á hvert kvendýr í samanburði við samanburðarþarpanir. Ef fanglát fyrir hreiðrun eru metin skal það skráð.
35. Stuðull fyrir ríkjandi banagen er áætlaður sem: (fanglát eftir hreiðrun/heildarfjöldi fanga á hvert kvendýr)  $\times$  100.
36. Greina skal frá gögnum um eiturrhif og klínísk einkenni (skv. 29. lið).

**Viðmiðanir fyrir ásættanleika**

37. Eftirfarandi viðmiðanir ákvarða ásættanleika prófunar.
  - Samskeiða neikvæður samanburður er í samræmi við birtar viðmiðanir fyrir rannsóknarsöguleg gögn um neikvæðan samanburð og rannsóknarsöguleg samanburðargögn rannsóknarstofunnar, ef þau liggja fyrir (sjá 10. og 18. lið).
  - Samskeiða jákvæðir samanburðir vekja svaranir sem eru í samræmi við birtar viðmiðanir fyrir rannsóknarsöguleg gögn um jákvæðan samanburð eða rannsóknarsögulegan gagnagrunn rannsóknarstofunnar um jákvæðan samanburð, ef hann liggur fyrir, og valda tölfræðilega marktækri aukningu í samanburði við neikvæða samanburðinn (sjá 17. og 18. lið).
  - Nægilegur heildarfjöldi fanga og skammta hefur verið greindur (20. liður).
  - Viðmiðanirnar fyrir valinu á hæsta skammti eru í samræmi við það sem lýst er í 24. og 27. lið.

**Mat og túlkun á niðurstöðum**

38. Greina skal a.m.k. þrjá meðhöndlaða skammtahópa til að fá nægjanleg gögn til að framkvæma greiningu á skammtasvörun.
39. Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefnið talið valda greinilegri jákvæðri svörun ef:
  - að minnsta kosti einn prófunarskammtanna sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,
  - aukningin er skammtatengd í a.m.k. einu tilraunaskilyrðanna (t.d. vikulegt þörunartímabil) í mati með viðeigandi prófun, og
  - einhver niðurstaðnanna lendir utan ásættanlegs sviðs gagna um neikvæða samanburði eða utan dreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gögnum rannsóknarstofunnar um neikvæða samanburði (t.d. 95% stýrimörk fyrir samanburð, byggð á Poisson), ef þau liggja fyrir.

Þá er litið svo á að prófunaríðefnið geti vakið ríkjandi banvænar stökkbreytingar í kímfrumum tilraunadýranna. Ráðleggingar um hvaða tölfraeðiaðferðir eiga best við er að finna í 44. lið; aðrar tölfraeðiaðferðir sem eiga best við má einnig finna í 20.– 22., 24. og 29. heimild. Í tölfraeðilegum prófunum sem eru notaðar skal líta á dýrið sem tilraunaeyninguna.

40. Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefnið talið valda greinilegri neikvæðri svörun ef:

— enginn prófunarskammtanna sýnir tölfraeðilega marktæka aukningu í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,

— það er engin skammtatengd aukning í neinum tilraunaskilyrðum, og

— allar niðurstöður lenda innan ásættanlegs sviðs gagna um neikvæða samanburði eða rannsóknarsögulegra gagna rannsóknarstofunnar um neikvæða samanburði (t.d. 95% stýrimörk fyrir samanburð, byggð á Poisson), ef þau liggja fyrir.

Þá er litið svo á að prófunaríðefnið geti ekki vakið ríkjandi banvænar stökkbreytingar í kímfrumum tilraunadýranna.

41. Ekki er gerð krafa um sannprófun á skýrri jákvæðri eða skýrri neikvæðri svörun.
42. Ef svörunin er ekki greinilega neikvæð eða jákvæð og til að auðvelda ákvörðun á líffraeðilegu mikilvægi niðurstöðu (t.d. væg eða óviss aukning) skulu gögnin metin samkvæmt sérfræðiáliti og/eða frekari rannsóknir gerðar með fyrirbyggjandi tilraunargögnum s.s. athugun hvort jákvæð niðurstaða lendir utan ásættanlegs sviðs gagna um neikvæða samanburði eða rannsóknarsöguleg gögn rannsóknarstofunnar um neikvæða samanburði (30. heimild).
43. Í örfáum tilvikum gefa gögnin ekki kost á ályktunum um jákvæðar eða neikvæðar niðurstöður, jafnvel eftir frekari rannsóknir, og því er ályktað að þær séu tvíræðar.
44. Í tölfraeðilegum prófunum sem eru notaðar skal líta á karldýrið sem tilraunaeyninguna. Þó að talningargögn (t.d. fjöldi fanga á hvert kvendýr) geti verið Poisson-dreifð og/eða hlutföll (t.d. hlutfall dauðra fanga) geti haft tvíliða dreifingu eru slík gögn oft of mikið dreifð (31. heimild). Til samræmis við það skal við tölfraeðilega greiningu fyrst nota prófun vegna of lítillar eða of mikillar dreifingar með breytileikaprófunum eins og Cochran-tvíliðubreytileikaprófun (32. heimild) eða  $C(\alpha)$ -prófun Tarones vegna of mikillar tvíliðudreifingar (31. og 33. heimild). Ef ekkert frávik frá tvíliðudreifingu greinist má gera prófun á leitni í hlutföllum fyrir allar skammtastærðir með Cochran-Armitage-leitniþrófun (34. heimild) og á parasamanburði með samanburðarhópnum með nákvæmniþrófun Fishers (35. heimild). Á sama hátt, ef ekkert frávik frá Poisson-dreifingu greinist, má gera prófun á leitni í talningu með Poisson-adhvarfi (36. heimild) og á parasamanburð með samanburðarhópnum innan ramma Poisson-líkansins, með því að nota paraandstæður (36. heimild). Ef of lítil eða of mikil dreifing, sem telst marktæk, greinist er mælt með stikalausum aðferðum (23. og 31. heimild). Þar á meðal eru prófanir sem byggja á röðun, s.s. Jonckheere-Terpstra-leitniþrófun (37. heimild) og Mann-Whitney-prófanir (38. heimild) fyrir parasamanburð með samanburðarhópnum sem fær burðarefni eða leysi, ásamt prófunum með umröðun, endursýnatöku eða handahófsúrtakanálgun fyrir samanburð á leitni og parasamanburð með samanburðarhópnum (31. og 39. heimild).
45. Jákvæð greining á ríkjandi banagenum veitir sönnun á erfðaeiturhrifum prófunaríðefnisins í kímfrumum meðhöndlaðra karldýra af prófunartegundinni.
46. Athugun á því hvort mæld gildi eru innan eða utan rannsóknarsögulegs sviðs fyrir samanburðinn getur verið til leiðbeiningar við mat á líffraeðilegu mikilvægi svörunarinnar (40. heimild).

**Prófunarskýrsla**

47. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

*Samantekt.**Prófunariðefni:*

- uppruni, lotunúmer, síðasti notkunardagur, ef hann liggur fyrir,
- stöðugleiki prófunariðfnisins, ef hann er þekktur,
- leysni og stöðugleiki prófunariðfnisins í leysinum, ef þekkt,
- mæling á sýrustigi, osmólalstyrk og botnfellingu í ræktunarmiðlinum sem prófunariðefninu var bætt í, eins og við á.

*Efni með einum efnisþætti:*

- útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,
- efnafræðileg sanngreining, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.

*Fjölþáttaefni, UVCB-efni og blöndur:*

- lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér að framan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.

*Tilreiðsla prófunariðfnis:*

- rök fyrir vali á burðarefni,
- leysni og stöðugleiki prófunariðfnisins í leysinum/burðarefninu, ef þau liggja fyrir,
- tilreiðsla blandna í fóður, drykkjarvatn eða til innöndunar,
- magngreiningar á samsetningum (t.d. stöðugleiki, einsleitni, nafnstyrkur), fari þær fram.

*Tilraunadýr:*

- tegundir/stofn sem eru notuð og rökstuðningur fyrir því vali,
- fjöldi, aldur og kyn dýra,

- uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,
- aðferð til að auðkenna dýrin hvert um sig,
- að því er varðar skammtímarannsóknir: líkamsþyngd hvers karldýrs við upphaf og lok prófunar; að því er varðar rannsóknir sem standa lengur en eina viku: líkamsþyngd hvers dýrs meðan rannsókn stendur yfir og fóðurát. Hafa skal með dreifisvið líkamsþyngdar, meðalþyngd og staðalfrávik fyrir hvern hóp.

*Prófunarskilyrði:*

- gögn um jákvæðan og neikvæðan samanburð (burðarefni/leysir),
- gögn úr skammtastærðarannsókninni,
- rök fyrir vali á skammtastærð,
- upplýsingar um tilreiðslu prófunariðefnisins,
- upplýsingar um það hvernig prófunariðefnið er gefið,
- rök fyrir vali á íkomuleið,
- aðferðir við mælingar á eiturhrifum í dýrum, þ.m.t. fyrir vefjameinafræði- eða blóðgreiningar og tíðni athugana og vigtnar á dýrum, ef þær liggja fyrir,
- aðferðir við að staðfesta að prófunariðefnið hafi náð til markvefjanna, eða komist í almenna hringrás, ef neikvæðar niðurstöður fást,
- raunskammtastærð (mg/kg líkamsþyngdar/dag) reiknuð út frá styrkleika prófunariðefnisins (í milljónarhlutum) í fóðri/drykkjarvatni og út frá neyslu, ef við á,
- upplýsingar um gæði fóðurs og vatns,
- upplýsingar um umhverfisfjölbreytni í búrum,
- nákvæm lýsing á meðferð og sýnatökuáætlunum og rökstuðningur fyrir valinu,
- aðferð við verkjastillingu,
- aðferð við aflífun,
- verklag við einangrun og varðveislu vefja,
- uppruni og lotunúmer allra setta og hvarfmiðla (ef við á),

- aðferðir við ákvörðun á heildarfjölda ríkjandi banagena,
- pörunaráætlun,
- aðferðir sem eru notaðar til að ákvarða að pörun hafi átt sér stað,
- aflífunartími,
- viðmiðanir til að kvarða áhrif ríkjandi banagena, þ.m.t. gulbú, föng, fósturvisnanir og fanglát fyrir hreiðrun, lifandi föng, dauð föng.

#### *Niðurstöður:*

- ástand dýranna fyrir prófunina og á meðan henni stendur, þ.m.t. merki um eiturrhif,
- líkamsþyngd karldýranna á meðferðar- og pörunartímabilum,
- fjöldi paraðra kvendýra,
- tengsl milli skammts og svörunar, ef unnt er,
- gögn um samskiða neikvæðan samanburð og rannsóknarsöguleg gögn um neikvæðan samanburð, ásamt sviðum, meðaltölum og staðalfrávikum,
- gögn um samskiða jákvæðan samanburð,
- gögn í töflum fyrir hverja móður, þ.m.t.: fjöldi gulbúa á hverja móður, fjöldi fanga á hverja móður, fjöldi fósturvisnanna og fangláta fyrir hreiðrun á hverja móður, fjöldi lifandi fanga á hverja móður, fjöldi dauðra fanga á hverja móður, þyngd fóstura,
- samantekt ofangreindra gagna fyrir hvert pörunartímabil og fyrir hvern skammt ásamt tíðni ríkjandi banagena,
- tölfræðilegar greiningar og aðferðir sem eru notaðar.

#### *Umfiöllun um niðurstöðurnar.*

#### *Ályktun.*

#### **HEIMILDIR**

- 1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.
- 2) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et al.* (Eds.) bls. 235-334, Elsevier, Amsterdam

- 3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Froberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Peh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., and Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group "Dominant" lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol.*, 39, 173-185
- 4) Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. *Mutation Res.*, 352:159-167.
- 5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. and Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. *Mutation Res.*, 48:267-270.
- 6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. and Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. *Mutation Res.*, 397:77-74.
- 7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. and Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol. Lett.* 20:325-329.
- 8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. and Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 3:80-85.
- 9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., and Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, *Mutation Res.*, 33, 239-249.
- 10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. and Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. *Biol. Reprod.*, 70:616-624.
- 11) Marchetti F. and Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. *Birth Defects Res., C* 75:112-129.
- 12) Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. *Mutation Res.*, 352:169-172.
- 13) Favor J., and Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, *Mutation Res.*, 53: 21-27.
- 14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. and Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. *Mutation Res.*, 345:167-180.
- 15) Hastings S.E., Huffman K.W. and Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, *Mutation Res.*, 40:371-378.
- 16) James D.A. and Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, *Mutation Res.*, 99:303-314.
- 17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. and Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. *Mutation Res.*, 173:35-40.

- 18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. and Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice. *Mutation Res.*, 296: 143-156.
- 19) Holstrom L.M., Palmer A.K. and Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. Í Supplementary Mutagenicity Tests. Kirkland D.J. and Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, bls. 129–156.
- 20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, *Mutation Res.*, 417:19–30.
- 21) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. *Mutation Res.*, 312:313-318.
- 22) Generoso W.M. and Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. *Methods, Toxicol.*, 3A:124-141.
- 23) Haseman J.K. and Soares E.R. (1976). The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. *Mutation. Res.*, 41: 277-288.
- 24) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, 1:353 – 360.
- 25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., and Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. *Mutation. Res.*, 85:417-429.
- 26) Fielder R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagen.*, 7:313-319.
- 27) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 28) Barrow M.V., Taylor W.J and Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306.
- 29) Kirkland D.J., (Ed.)(1989). *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Cambridge University Press.
- 30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. and Thybaud V. (2011). “Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data”, *Mutation. Res.*, 723:87-90.
- 31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. and Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. *Mutation. Res.*, 272:35-58.
- 32) Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common  $\chi^2$  Tests. *Biometrics*, 10: 417-451.

- 33) Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585-590.
- 34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. Í *Encyclopedia of Statistical Sciences*, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Eds.), bls. 334-336. John Wiley and Sons, New York.
- 35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).
- 36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, Chapters 14 and 17. McGraw-Hill, Boston
- 37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika*, 41:133-145.
- 38) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York
- 39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.
- 40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.



*1. viðbætur*

## SKILGREININGAR

Íðefni: efni eða blanda.

Gulbú: hormónaseytandi samsetning sem verður til í eggjastokknum þar sem eggbú hefur losað egg. Fjöldi gulbúa í eggjastokkunum samsvarar fjölda eggja sem voru losuð.

Ríkjandi banvæn stökkbreyting: stökkbreyting sem verður í kímfrumu, eða er fest að lokinni frjóvgun, og leiðir til dauða fósturvísis eða fósturs.

Frjósemishlutfall: fjöldi paraðra kvendýra með fangi miðað við heildarfjölda paraðra kvendýra.

Pörunartímabil: tímabilið milli loka váhrifa og pörunar meðhöndlaðra karldýra. Með því að stjórna þessu tímabili er hægt að meta efnafræðileg áhrif á mismunandi kímfrumugerðir. Á pörunartímabili músa, á 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. og 8. viku eftir lok váhrifa, eru mæld áhrif á sæði, þéttar forsæðisfrumur, hringlaga forsæðisfrumur, sáðfrumuvísa á 3. stigi prófasa rýriskiptingar, sáðfrumuvísa á fyrsta stigi, sérhæfðar sáðstofnfrumur, sáðstofnfrumur á sérhæfingarstigi (e. *differentiating*) og frjósmóðurstofnfrumur.

Fanglát fyrir hreiðrun: munurinn á fjölda fanga og fjölda gulbúa. Einnig er hægt að áætla það með því að bera saman heildarfjölda fanga á hvert kvendýr í meðhöndlaða hópnum og samanburðarhópnum.

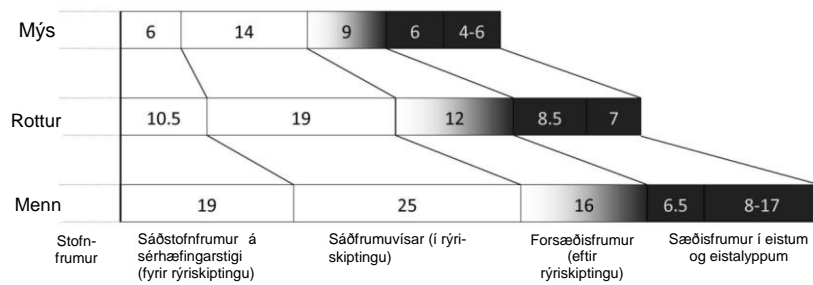
Fanglát eftir hreiðrun: hlutfallið milli dauðra fanga í meðferðarhópnum miðað við hlutfall dauðra fanga og heildarfjölda fanga í samanburðarhópnum.

Prófunaríðefni: sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

UVCB-efni: efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni og líffræðileg efni.

## 2. viðbætur

## TÍMASETNINGAR SÆÐISMYNDUNAR HJÁ SPENDÝRUM



**Mynd 1:** Samanburður á tímalengd (í dögum) þroskunar karlkyns kímfrumna hjá músum, rottum og mönnum. DNA-viðgerð á sér ekki stað á þeim tímabilum sem eru skyggð.

Hér að framan er skýringarmynd af sæðismyndun hjá músum, rottum og mönnum (úr Adler, 1996). Ósérhæfðar sæðstofnfrumur eru m.a.: Sæðstofnfrumur sem eru A-stakar, A-pör og A-runur (Hess og de Franca, 2008). A-stakar sæðstofnfrumur teljast vera stofnfrumur og til að meta áhrif á stofnfrumur skulu þar af leiðandi líða a.m.k. 49 dagar (hjá músum) milli síðustu innsprautunar prófunaríðfnisins og þörunar.

## Tilvísanir

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

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

4) Í stað kafla B.23 í B-hluta kemur eftirfarandi:

„B.23 PRÓFUN Á LITNINGABREYTINGUM Í SÁÐSTOFNFRUMUM SPENDÝRA

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 483 um prófanir (2016). Prófunaraðferðir eru endurskoðaðar reglulega í ljósi framfara á sviði vísinda, þarfa á nýrri löggjöf og sjónarmiða er varða velferð dýra. Þessi breytta útgáfa af prófunaraðferðinni endurspeglar margra ára reynslu af þeirri greiningu og möguleikann á að samþætta þessa prófun eða sameina hana öðrum eiturhrifa- eða erfðaeiturhrifaþrófunum. Með því að sameina eiturhrifarannsóknir er hægt að fækka dýrum sem eru notuð í eiturhrifaþrófunum. Þessi prófunaraðferð er hluti af röð aðferða við erfðafræðilegar eiturefnafræðiþrófanir. Efnahags- og framfarastofnunin hefur þróað skjal sem veitir gagnorðar upplýsingar um prófanir varðandi erfðafræðilega eiturefnafræði og yfirlit yfir nýlegar breytingar sem voru gerðar á OECD-viðmiðunarreglunum um prófanir varðandi erfðafræðilega eiturefnafræði (1. heimild).
2. Tilgangurinn með prófun *í lífi* á litningabreytingum í sáðstofnfrumum er að sanngreina hvort íðefni valdi byggingarlegum litningabreytingum í sáðstofnfrumum spendýra (2., 3. og 4. heimild). Auk þess hentar þessi prófun til að meta erfðaeiturhrif þar sem þættir í efnaskiptum, lyfjahvörfum og viðgerðarferli DNA eru virk *í lífi* og stuðla að svörun, þótt þessir þættir séu hugsanlega breytilegir eftir dýrategundum. Þessi prófunaraðferð er ekki ætluð fyrir mælingu á frávikum á fjölda; þessi greining er að jafnaði ekki notuð í þeim tilgangi.
3. Með þessari prófun er unnt að greina byggingarlegar litningabreytingar (bæði í litningum og litningsþráðum) í sáðstofnfrumum í skiptingu og því er þess vænst að hún geti nýst til að spá fyrir um framköllun arfgengra stökkbreytinga í þessum kímfrumum.
4. Skilgreiningar á lykilhugtökum eru settar fram í viðbætinum.

ATRIÐI SEM ÞARF AÐ Hafa Í HUGA Í UPPHAFI

5. Nagdýr eru venjulega notuð til þessarar prófunar en í sumum tilvikum gæti átt við að nota aðrar tegundir ef fyrir því eru vísindaleg rök. Í stöðluðum frumu-erfðafræðilegum fullbúnum sýnum úr eistum nagdýra myndast miðfasar í jafnskiptingu (sáðstofnfrumur) og rýriskiptingu (sáðfrumuvísar). Miðfasar í jafnskiptingu og rýriskiptingu eru greindir á grundvelli byggingar litninganna (4. heimild). Þessi frumu-erfðafræðilega prófun *í lífi* er notuð til að greina byggingarlegar litningabreytingar í jafnskiptingu sáðstofnfrumna. Þessi prófunaraðferð er ekki notuð fyrir aðrar markfrumur.
6. Til að greina litningsþráðarbreytingar í sáðstofnfrumum skal skoða frumur í fyrstu jafnskiptingunni eftir lok meðhöndlunar áður en þessum breytingum er umbreytt í litningabreytingar í næstu frumuskiptingum á eftir. Unnt er að afla frekari upplýsinga um meðhöndlaða sáðfrumuvísa með litningagreiningu, þar sem byggingarlegra litningabreytinga er leitað, í stigum frá 5. stigi fyrri prófasa til miðfasa I og II í rýriskiptingu.
7. Í eistunum er fjöldi kynslóða sáðstofnfrumna (5. heimild) og þessar mismunandi kímfrumugerðir geta verið mismæmar fyrir meðhöndlun með íðefnum. Litningabreytingarnar sem koma fram sýna því samloðunarsvörun meðhöndlaðra sáðstofnfrumuþýða. Meirihluti frumna í jafnskiptingu í fullbúnum sýnum úr eistum eru B-sáðstofnfrumur með frumuhring sem nemur u.þ.b. 26 klst. (3. heimild).
8. Þessi prófun hentar ekki ef sannanir eru fyrir því að prófunaríðefnið eða umbrotsefni þess nái ekki í eistað.

## MEGINREGLA PRÓFUNARADFERÐARINNAR

9. Alla jafna eru dýrin látin verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu eftir viðeigandi váhrifaleið og eru síðan aflífðu þegar meðferðin hefur staðið hæfilega lengi. Dýrin eru meðhöndluð fyrir aflífun með metafasastöðvandi efni (t.d. kolsísíni eða Colcemid®). Litningasýni eru því næst útbúin úr kímfrumum og lituð og frumur í miðfasa síðan skoðaðar í leit að litningabreytingum.

## SANNPRÓFUN Á HÆFNI RANNSÓKNARSTOFU

10. Til að staðfesta hæfi til að framkvæma greininguna skal sýna fram á getu til að endurtaka þær niðurstöður sem reiknað er með varðandi tíðni byggingarlegra litningabreytinga í sáðstofnfrumum með jákvæðum samanburðaríðefnum (þ.m.t. veikar svaranir), s.s. þeim sem eru talin upp í töflu 1, og til að fá fram tíðni neikvæðra samanburða sem er í samræmi við viðunandi svið samanburðargagna í birtum heimildum (t.d. 2., 3., 6., 7., 8., 9. og 10. heimild) eða með rannsóknarsögulegri dreifingu samanburða hjá viðkomandi rannsóknarstofu, ef hún liggur fyrir.

## LÝSING Á ADFERÐINNI

**Undirbúningur***Val á dýrategund*

11. Nota skal ung, heilbrigð, fullvaxin dýr af algengum rannsóknarstofustofnum. Alla jafna eru notaðar karlkyns mýs en þó er heimilt að nota karldýr af öðrum heppilegum tegundum spendýra ef sett eru fram vísindaleg rök og til að gera það kleift að gera þessa prófun í tengslum við aðra prófunaraðferð. Vísindaleg rök fyrir notkun á öðrum tegundum en nagdýrum skulu sett fram í skýrslunni.

*Aðbúnaður dýra og fóðrun*

12. Að því er varðar nagdýr skal hiti í vistarverum dýranna vera 22 °C ( $\pm 3$  °C). Þótt æskilegt rakastig sé 50–60%, skal það að minnsta kosti vera 40% og helst ekki fara yfir 70%, nema við þrif á vistarverunum. Nota skal gervilyngu og hafa til skiptis birtu í 12 klukkustundir og myrkur í 12 klukkustundir. Nota má hefðbundið rannsóknarstofufóður ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni. Val á fóðri kann að ráðast af því að hægt sé að blanda prófunaríðefni í fóðrið á viðeigandi hátt þegar það er gefið með þessari aðferð. Nagdýr skulu vera í búri í litlum hópum (ekki fleiri en fimm saman) ef árásgirni er ekki vænst, helst í búrum með gegnheilu gólfi með viðeigandi umhverfisfjölbreytni. Dýr mega vera hvert í sínu búri ef fyrir því liggja vísindaleg rök.

*Undirbúningur dýranna*

13. Að jafnaði eru notuð heilbrigð, ung, fullvaxin karldýr (sem eru 8–12 vikna gömul í upphafi meðferðar) og eru valin af handahófi í samanburðar- og meðferðarhópa. Hvert dýr skal auðkennt sérstaklega með mannúðlegri aðferð með lágmarks inngrípi (t.d. með merkingu með hring, ífestu spjaldi, örflögu eða lífkenni, en ekki mörkun eyrna og afklippingu táa) og það látið laga sig að umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni í minnst fimm daga. Koma skal búrunum þannig fyrir að staðsetning þeirra hafi sem minnst áhrif. Forðast skal víxlmengun af völdum jákvæða samanburðarins og prófunaríðefnisins. Við upphaf rannsóknarinnar ætti breytileiki í þyngd hvers dýrs að vera í lágmarki og ekki meiri en  $\pm 20\%$ .

*Tilreiðsla skammta*

14. Prófunaríðefni í föstu formi skulu leyst upp eða blönduð í sviflausn með viðeigandi leysum eða burðarefnum eða blandað í fóður eða drykkjarvatn áður en þau eru skömmtuð dýrunum. Gefa má dýrunum fljótandi prófunaríðefni óblönduð eða þynnt fyrir skammtagjöf. Ef greina á váhrif við innöndun má gefa prófunaríðefni sem gas, gufu eða sem fast/fljótandi úðaefni, allt eftir eðlisefnafræðilegum eiginleikum þeirra. Nota skal ferskar blöndur af prófunaríðefninu nema gögn um stöðugleika staðfesti að efnið þoli geymslu og tiltaki viðeigandi geymsluskilyrði.

**Prófunarskilyrði - leysir/burðarefni**

15. Leysirinn eða burðarefnið skal ekki valda eiturhrifum við þær skammtastærðir sem eru notaðar og skal ekki geta hvarfast við prófunariðefnið. Ef notaður er lítt þekktur leysir eða burðarefni skal notkunin studd gögnum sem staðfesta samhæfi þeirra. Mælt er til þess, verði því við komið, að fyrst sé kannað hvort nota megji vatnskenndan leysi eða burðarefni. Dæmi um algengan samrýmanlegan leysi/burðarefni er vatn, lífeðlisfræðileg saltlausn, metýlsellulósalausn, saltlausn úr natríumkarboxýmetýlsellulósa, ólíffuolía og maísolía. Ef ekki eru fyrir hendi rannsóknarsöguleg gögn eða útgefin samanburðargögn sem sýna að ódæmigerði leysirinn/burðarefnið, sem varð fyrir valinu, framkalli ekki byggingarlegar litningabreytingar og önnur skaðleg áhrif skal gera upphafsrannsókn til að byggja upp ásættanleika fyrir leysis-/burðarefnissamanburðinn.

*Jákvæðir samanburðir*

16. Ávallt skal nota dýr í samskeiða jákvæðum samanburði nema ef rannsóknarstofan hefur sýnt fram á hæfni við framkvæmd prófunarinnar og hefur notað prófunina venjubundið nýlega (t.d. síðastliðin fimm ár). Ef samskeiða jákvæður samanburðarhópur er ekki hafður með skal vera talningarsamanburður (sýnisgler með festum og ólituðum sýnum) í hverri tilraun. Þessu er hægt að ná fram með því að hafa með í talningu rannsóknarinnar viðeigandi viðmiðunarsýni, sem hafa verið tekin og geymd, úr aðskilinni tilraun með jákvæðum samanburði sem fer reglulega fram (t.d. á 6–18 mánaða fresti) á rannsóknarstofunni þar sem prófunin er gerð, t.d. meðan á hæfnisprófun stendur og reglulega eftir það, ef nauðsyn krefur.
17. Jákvæð samanburðarefni skulu framkalla með áreiðanlegum hætti greinanlega aukningu á frumum með byggingarlegar litningabreytingar umfram magn sjálfsprottinnar breytinga. Velja skal skammtastærðir fyrir jákvæðan samanburð sem framkalla skýr áhrif en þó þannig að talningafólk geti ekki strax sanngreint kóðuðu sýnin. Dæmi um jákvæð samanburðarefni er að finna í töflu 1.

*Tafla 1***Dæmi um jákvæð samanburðarefni**

---

Efni [CAS-nr.] (tilvísunarnúmer)

---

Sýklófosfamíð (mónóhýdrat) [CAS-nr. 50-18-0 (CAS-nr. 6055-19-2)] (9. heimild)

---

Sýklóhexýlamín [CAS-nr. 108-91-8] (7. heimild)

---

Mítómýsín C [CAS-nr. 50-07-7] (6. heimild)

---

Einliðuakrýlamíð [CAS-nr. 79-06-1] (10. heimild)

---

Trítýlenmelamín [CAS-nr. 51-18-3] (8. heimild)

---

*Neikvæðir samanburðir*

18. Í hvert skipti sem sýni eru tekin skal hafa með dýr í neikvæðum samanburði sem eru meðhöndluð einvörðungu með leysi eða burðarefni og að öðru leyti meðhöndluð á sama hátt og meðferðarhóparnir. Ef ekki eru fyrir hendi rannsóknarsöguleg eða útgefin samanburðargögn sem sýna að leysirinn/burðarefnið, sem varð fyrir valinu, framkalli ekki litningabreytingar eða önnur skaðleg áhrif skal einnig hafa með ómeðhöndluð samanburðardýr í hvert skipti sem sýni eru tekin, til að byggja upp ásættanleika fyrir burðarefnissamanburðinn.

## VERKFERLI

**Fjöldi dýra**

19. Hópastærðir við upphaf rannsóknarinnar skulu ákvarðaðar með það fyrir augum að með þeim fáiast a.m.k. 5 karldýr á hvern hóp. Þessi fjöldi dýra á hvern hóp telst nægilegur til að veita viðeigandi tölfræðilegan styrk (þ.e. alla jafna er hægt að greina a.m.k. tvöföldun í tíðni litningabreytinga þegar neikvæð samanburðargildi eru 1,0% eða hærrí og líkindin eru 80% og marktækni 0,05) (3. og 11. heimild). Til leiðbeiningar varðandi dæmigerðan hámarksfjölda dýra myndi rannsókn á tveimur sýnatökutímum með þremur skammtahópum og samskeiða neikvæðum og jákvæðum samanburðarhóp (hver þeirra samanstendur af fimm dýrum á hvern hóp), útheimta 45 dýr.

**Meðferðaráætlun**

20. Prófunaríðefnin eru yfirleitt gefin einu sinni (þ.e. í einni meðferð); nota má aðra skömmunaráætlun, að því tilskildu að hún sé vísindalega rökstudd.
21. Hjá þeim hópi sem fær stærsta skammtinn eru sýni tekin tvisvar sinnum eftir meðferð. Þar eð besti tíminn til að greina litningabreytingar er hugsanlega undir því kominn hversu langan tíma upptaka og efnaskipti prófunaríðefnisins eða -efnanna taka, sem og áhrif þess eða þeirra á hraða frumuhringingsins, eru sýni tekin einu sinni snemma og einu sinni seint, u.þ.b. 24 og 48 klukkustundum eftir lok meðferðar. Þegar um er að ræða aðra skammta en stærsta skammtinn skal taka sýni snemma innan 24 klukkustunda (áður en eða þegar frumuhringstíma B-sáðstofnfrumna lýkur til að líkur séu mestar á að geta metið fyrstu miðfasa eftir meðferð) að lokinni meðferð nema vitað sé að annar sýnatökutími henti betur og það rökstutt.
22. Taka má sýni á öðrum tímum. Ef t.d. um er að ræða íðefni sem hafa áhrif sem eru óháð S-fasa getur verið heppilegt að taka sýni fyrr (þ.e. innan 24 klukkustunda).
23. Heimilt er að nota meðferðaráætlun við endurtekna skammta s.s. í tengslum við prófun á öðrum endapunkti þar sem 28-daga inngjafartímabil er notað (t.d. prófunaraðferð B.58) en þó þyrfti fleiri dýrahópa til að taka mið af mismunandi sýnatökutímum. Til samræmis við það þarf að færa vísindaleg rök fyrir því, í hverju tilviki fyrir sig, hvort slík áætlun sé viðeigandi.
24. Áður en dýrin eru aflífuð er hæfilegum skammti af miðfasastöðvandi íðefni (t.d. Colcemid® eða kolsísíni) sprautað í kviðarhol þeirra. Eftir það eru sýni tekin úr dýrunum með hæfilegu millibili. Að því er varðar mýs og rottur er þetta millibil u.þ.b. 3–5 klukkustundir.

**Skammtastærðir**

25. Ef engin nothæf gögn liggja þegar fyrir sem gagnast við val á skömmtum og framkvæmd er forprófun til að ákvarða skammtastærðir skal hún fara fram á sömu rannsóknarstofu og með sömu tegund, stofni, og meðferðaráætlun og á að nota í meginrannsókninni samkvæmt ráðleggingum við framkvæmd skammtastærðarannsóknna (12. heimild). Markmið þessarar rannsóknar skal vera að greina hámarksþolsskammt, skilgreindur sem skammturinn sem vekur smávægileg eiturrhrif í hlutfalli við lengd rannsóknartímabilsins (t.d. óeðlilegt atferli eða viðbrögð, minni háttar þyngdartap eða frumueiturrhrif í blóðfrumnamyndandi kerfi) en ekki dauða eða merki um sársauka, þjáningar eða hræðslu sem gerir aflífun dýranna nauðsynlega (13. heimild).
26. Einnig má skilgreina stærsta skammt sem þann skammt sem kallar fram einhver merki um eiturrhrif í sáðstofnfrumum (t.d. þau að hlutfallið milli jafnskiptinga sáðstofnfrumna og fyrsta og annars miðfasa í rýriskiptingu minnkar). Þessi minnkun má ekki fara yfir 50%.

27. Gera má undantekningar frá viðmiðunum fyrir ákvörðun skammta þegar um er að ræða prófunaríðefni sem hafa sérhæfða lífvirkni í litlum skömnum sem kalla ekki fram eiturrhif (t.d. hormón og ræsar) og íðefni sem sýna mettun eiturefnahvarfaeiginleika, og þau skulu metin í hverju tilviki fyrir sig.
28. Til að fá fram upplýsingar um skammtasvörun skal í heildstæðri rannsókn taka með neikvæðan samanburðarhóp (18. liður) og minnst þrjár skammtastærðir sem eru almennt aðskildar með stuðli sem nemur 2 en ekki meira en 4. Ef prófunaríðefnið framkallar ekki eiturrhif í skammtastærðarannsókn eða byggt á fyrirliggjandi gögnum skal hæsti skammtur fyrir eina inngjöf vera 2000 mg/kg líkamsþyngdar. Ef prófunaríðefnið veldur eiturrhifum skal hámarksþolsskammtur þó vera hæsti skammtur sem er gefinn og skammtastærðirnar sem eru notaðar skulu helst spanna bilið frá mestu eiturrhifum niður í skammt sem framkallar lítil eða engin eiturrhif. Ef eiturrhif í markvefjum (þ.e. eistum) koma fram við allar skammtastærðirnar sem eru prófaðar er ráðlagt að gera frekari rannsóknir á skömmtum sem eru ekki eittraðir. Í rannsóknnum, sem eru ætlaðar til að lýsa megindegum upplýsingum um skammtasvörun á ennþá ítarlegri hátt, getur þurft viðbótarskammtahópa. Þessi mörk geta verið breytileg ef um er að ræða tilteknar gerðir prófunaríðefna (t.d. lyf handa mönnum) sem falla undir sértækar kröfur. Ef prófunaríðefnið framkallar eiturrhif skal velja háskammtinn ásamt tveimur minni skömmtum (eins og lýst er hér að framan). Háskammturinn fyrir inngjafartímabil sem er 14 dagar eða lengra er 1000 mg/kg líkamsþyngd/dag og fyrir inngjafartímabil sem er styttra en 14 dagar er háskammturinn 2000 mg/kg líkamsþyngd/dag.

### Gjöf skammta

29. Taka skal tillit til fyrirséðrar váhrifaleiðar fyrir menn við tilhögun mælingar. Því má velja íkomuleiðir váhrifa, s.s. með fæðu, drykkjarvatni, staðbundnar, undir húð, um munn (með magaslöngu), með innöndun eða með ígræðslu, sem færð eru rök fyrir. Í öllum tilvikum skal velja íkomuleið sem tryggir nægileg váhrif á markvef. Alla jafna er ekki mælt með innsprautun í kviðarhol, nema það sé stutt vísindalegum rökum, þar eð hún er yfirleitt ekki lífeðlisfræðilega viðeigandi váhrifaleið fyrir menn. Ef prófunaríðefninu er blandað í fóður eða drykkjarvatn, einkum ef um er að ræða staka skömmtun, skal þess gætt að hlé milli neyslu fóðurs og vatns og sýnatöku sé nægilegt til að hægt sé að greina áhrifin (sjá 33. lið). Hámarksrúmmál vökva sem hægt er að gefa í einu með magaslöngu eða innsprautun ræðst af stærð tilraunadýrsins. Rúmmálið ætti alla jafna ekki að vera meira en 1 ml/100g líkamsþyngdar nema um sé að ræða vatnslausnir en þá má gefa að hámarki 2 ml/100g líkamsþyngdar. Ef meira rúmmál en það er notað (ef löggjöf um velferð dýra heimilar það) skal það rökstutt. Halda skal rúmmálsfrávikum í lágmarki með því að stilla styrkleikann til að tryggja stöðugt rúmmál í hlutfalli við líkamsþyngdina fyrir allar skammtastærðir.

### Athuganir

30. Gera skal almennar, klínískar athuganir á tilraunadýrunum og skrá klínísk einkenni a.m.k. einu sinni á dag, helst á sama tíma eða sömu tímum á hverjum degi og með hliðsjón af því hvenær vænta má hámarksáhrifa af skammtagjöfinni. Öll dýr skulu skoðuð a.m.k. tvisvar á dag með tilliti til dánar- og veikindatilvika. Öll dýr skulu vigtuð við upphaf rannsóknar, a.m.k. vikulega meðan á rannsóknnum með endurteknum skömmtum stendur og við aflífun. Í rannsóknnum sem vara í a.m.k. eina viku skal mæla fóðurát a.m.k. vikulega. Ef prófunaríðefnið er gefið með drykkjarvatni skal einnig mæla vatnsdrykkju í hvert skipti þegar skipt er um vatn og a.m.k. vikulega. Dýr sem sýna merki um umframeiturrhif sem ekki eru banvæn skulu aflífuð áður en prófunartímabilinu lýkur (13. heimild).

### Undirbúningur litninga

31. Kímfrumusvifblöndur eru fengnar úr öðru eða báðum eistum strax eftir aflífun dýranna, settar í undirþrýsta lausn og festar samkvæmt viðurkenndri aðferðarlýsingu (t.d. 2., 14., 15. heimild). Frumunum er síðan strokið á sýnisgler og þær litaðar (16. og 17. heimild). Öll sýnisglerin skulu kóðuð til þess að auðkenni þeirra sé ekki aðgengilegt talningafólkinu.

### Greining

32. Telja skal a.m.k. 200 vel dreifða miðfasa fyrir hvert dýr (3. og 11. heimild). Ef gildi rannsóknarsögulegra neikvæðra samanburða er < 1% skal telja fleiri en 200 frumur/dýr til að auka tölfræðilegan styrk. Nota skal litunaraðferðir sem gera kleift að sanngreina þráðhaft.

33. Breytingar í litningum og litningsþráðum skulu skráðar aðskilið og þær flokkaðar samkvæmt undirgerðum (rof, víxlun). Skörð skulu skráð en ekki tekin með þegar ákvarðað er hvort íðefni framkalli marktæka aukningu á tíðni frumna með litningabreytingum. Verkferlin sem notuð eru á rannsóknarstofunni skulu tryggja að greiningar á litningabreytingum séu gerðar af vel þjálfuðu talingafólki. Þar eð viðurkennt er að undirbúningur sýnisglerja leiðir oft til þess að hluti frumnanna í miðfasa rofnar sem leiðir til þess að þær tapa við það litningum skal fjöldi þráðhafta í þeim frumum, sem eru taldar, ekki vera innan við  $2n \pm 2$  þar sem  $n$  er fjöldi einlitna litninga fyrir viðkomandi tegund.
34. Þótt tilgangur prófunarinnar sé að greina byggingarlegar breytingar í litningum er mikilvægt að skrá tíðni fjöllitna frumna og tíðni frumna með innræna tvöföldun þegar slíkra breytinga verður vart (sjá 44. lið).

#### GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

#### Úrvinnsla niðurstaðna

35. Gögn fyrir hvert einstakt dýr skulu sett fram í töfluformi. Fyrir hvert dýr skal ákvarða fjölda frumna með byggingarlegri litningabreytingu eða byggingarlegum litningabreytingum og fjölda litningabreytinga fyrir hverja frumu. Breytingar í litningsþráðum og litningum sem eru flokkaðar samkvæmt undirgerðum (rof, víxlun) skulu skráðar aðskilið, með fjölda þeirra og tíðni, fyrir tilrauna- og samanburðarhópa. Skörð eru skráð aðskilið. Tíðni skarða er skráð en er að jafnaði ekki tekin með í greiningunni á heildartíðni byggingarlegu litningabreytinganna. Ef fjöllitnun og frumur með innræna tvöföldun koma fram er greint frá hlutfallinu.
36. Greina skal frá gögnum um eiturrhif og klínísk einkenni (skv. 30. lið).

#### Viðmiðanir fyrir ásættanleika

37. Eftirfarandi viðmiðanir ákvarða ásættanleika prófunar.
- Samskeiða neikvæður samanburður er í samræmi við birtar viðmiðanir fyrir rannsóknarsöguleg gögn um neikvæðan samanburð, sem alla jafna er gert ráð fyrir að sé  $> 0\%$  og  $\leq 1,5\%$  frumna með litningabreytingum, og rannsóknarsöguleg samanburðargögn rannsóknarstofunnar, ef þau liggja fyrir (sjá 10. og 18. lið).
  - Samskeiða jákvæðir samanburðir kalla fram svaranir sem eru í samræmi við birtar viðmiðanir fyrir rannsóknarsöguleg gögn um jákvæðan samanburð eða rannsóknarsögulegan gagnagrunn rannsóknarstofunnar um jákvæðan samanburð, ef hann liggur fyrir, og valda tölfræðilega marktækri aukningu í samanburði við neikvæða samanburðinn (sjá 17. og 18. lið).
  - Nægilegur fjöldi frumna og skammta hefur verið greindur (sjá 28. og 32. lið).
  - Viðmiðanirnar fyrir valinu á hæsta skammti eru í samræmi við það sem lýst er í 25. og 26. lið.
38. Ef bæði jafnskipting og rýriskipting sjást í sýnunum skal ákvarða hlutfallið milli jafnskiptinga í sáðstofnfrumum og miðfasa fyrstu og annarrar rýriskiptingar sem mælikvarða á frumueiturrhif hjá öllum meðferðardýrum og dýrum í neikvæða samanburðinum í heildarsýni með 100 frumum í skiptingu fyrir hvert dýr. Ef aðeins sést jafnskipting í sýnunum skal ákvarða jafnskiptingarhlutfallið í a.m.k. 1000 frumum fyrir hvert dýr.

#### Mat og túlkun á niðurstöðum

39. Greina skal a.m.k. þrjá meðhöndlaða skammtahópa til að fá nægjanleg gögn til að framkvæma greiningu á skammta-svörun.



40. Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefnið talið valda greinilegri jákvæðri svörun ef:

- að minnsta kosti einn prófunarskammtanna sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,
- aukningin er skammtatengd a.m.k. á einum sýnatökutíma og
- einhver niðurstaðnanna lendir utan ásættanlegs sviðs gagna um neikvæða samanburði eða utan dreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gögnum rannsóknarstofunnar um neikvæða samanburði, ef þau liggja fyrir (t.d. 95% stýrimörk fyrir samanburð, byggð á Poisson), ef þau liggja fyrir.

Þá er litið svo á að prófunaríðefnið geti vakið litningabreytingar í sáðstofnfrumum tilraunadýranna. Ráðleggingar um hvaða tölfræðiaðferðir eiga best við má einnig finna í heimildunum (11. og 18. heimild). Í tölfræðilegum prófunum sem eru notaðar skal líta á dýrið sem tilraunaeininguna.

41. Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefnið talið valda greinilegri neikvæðri svörun ef:

- enginn prófunarskammtanna sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,
- það er engin skammtatengd aukning í neinum tilraunaskilyrðum, og
- allar niðurstöður lenda innan ásættanlegs sviðs gagna um neikvæða samanburði eða rannsóknarsögulegra gagna rannsóknarstofunnar um neikvæða samanburði (t.d. 95% stýrimörk fyrir samanburð, byggð á Poisson), ef þau liggja fyrir.

Þá er litið svo á að prófunaríðefnið geti ekki vakið litningabreytingar í sáðstofnfrumum tilraunadýranna. Ráðleggingar um hvaða tölfræðiaðferðir eiga best við má einnig finna í heimildunum (11. og 18. heimild). Neikvæð niðurstaða útilokar ekki möguleikann á að íðefnið geti vakið litningabreytingar á síðari þroskastigum, sem eru ekki rannsökuð, eða genastökkbreytingar.

42. Ekki er gerð krafa um sannprófun á skýrri jákvæðri eða skýrri neikvæðri svörun.

43. Ef svörunin er ekki greinilega neikvæð eða jákvæð og til að auðvelda ákvörðun á líffræðilegu mikilvægi niðurstöðu (t.d. væg eða óviss aukning) skulu gögnin metin samkvæmt sérfræðiáliti og/eða frekari rannsóknir gerðar með fyrirbyggjandi tilraunargögnum s.s. athugun hvort jákvæð niðurstaða lendir utan ásættanlegs sviðs gagna um neikvæða samanburði eða rannsóknarsöguleg gögn rannsóknarstofunnar um neikvæða samanburði (19. heimild).

44. Í örfáum tilvikum gefa gögnin ekki kost á ályktunum um jákvæðar eða neikvæðar niðurstöður, jafnvel eftir frekari rannsóknir, og því er ályktað að þær séu tvíræðar.

45. Ef fjöllitna frumum fjölgar getur það verið vísbending um að prófunaríðefnið geti hamlað jafnskiptingarferlum og stuðlað að breytingum á litningafjölda (20. heimild). Ef frumum með innræna tvöföldun í litningum fjölgar getur það verið vísbending um að prófunaríðefnið geti stöðvað framrás frumuhringsins (21. og 22. heimild), sem er annað gangvirki sem framkallar breytingar á fjölda litninga en það sem hamlar jafnskiptingarferlum (sjá 2. lið). Því skal tíðni fjöllitna frumna og frumna með innræna tvöföldun skráð aðskilið.

**Prófunarskýrsla**

46. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

*Samantekt.**Prófunariðefni:*

- uppruni, lotunúmer, síðasti notkunardagur, ef hann liggur fyrir,
- stöðugleiki prófunariðfnisins, ef hann er þekktur.
- leysni og stöðugleiki prófunariðfnisins í leysinum, ef þekkt,
- mæling á sýrustigi, osmólalstyrk og botnfellingu í ræktunarmiðlinum sem prófunariðefninu var bætt í, eins og við á.

*Efni með einum efnisþætti:*

- útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,
- efnafræðileg samgreining, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.

*Fjölpáttæfni, UVCB-efni og blöndur:*

- lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér að framan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.

*Tilreiðsla prófunariðfnis:*

- rök fyrir vali á burðarefni,
- leysni og stöðugleiki prófunariðfnisins í leysinum eða burðarefninu,
- tilreiðsla blandna í fóður, drykkjarvatn eða til innöndunar,
- magngreiningar á samsetningum (t.d. stöðugleiki, einsleitni, nafnstyrkur), fari þær fram.

*Tilraunadýr:*

- tegund/stofn sem eru notuð og rökstuðningur fyrir notkun,
- fjöldi og aldur dýranna,
- uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,

- aðferð til að auðkenna dýrin hvert um sig
  
- að því er varðar skammtímarannsóknir: þyngd hvers dýrs við upphaf og lok prófunar; að því er varðar rannsóknir sem standa lengur en eina viku: líkamsþyngd hvers dýrs meðan rannsókn stendur yfir og fóðurát. Hafa skal með dreifisvið líkamsþyngdar, meðalþyngd og staðalfrávik fyrir hvern hóp.

*Prófunarskilyrði:*

- gögn um jákvæðan og neikvæðan samanburð (burðarefni/leysir),
  
- gögn úr skammtastærðarrannsókn hafi hún verið gerð,
  
- rök fyrir vali á skammtastærð,
  
- rök fyrir vali á íkomuleið,
  
- upplýsingar um tilreiðslu prófunariðefnisins,
  
- upplýsingar um það hvernig prófunariðefnið er gefið,
  
- rök fyrir vali á aflífunartímum,
  
- aðferðir við mælingar á eiturhrifum í dýrum, þ.m.t. fyrir vefjameinafræði- eða blóðgreiningar og tíðni athugana og vigtunar á dýrum, ef þær liggja fyrir,
  
- aðferðir við að staðfesta að prófunariðefnið hafi náð til markvefjanna, eða komist í almenna hringrás, ef neikvæðar niðurstöður fást,
  
- raunskammtastærð (mg/kg líkamsþyngdar/dag) reiknuð út frá styrkleika prófunariðefnisins (í milljónarhlutum) í fóðri/drykkjarvatni og út frá neyslu, ef við á,
  
- upplýsingar um gæði fóðurs og vatns,
  
- nákvæm lýsing á meðferð og sýnatökuáætlunum og rökstuðningur fyrir valinu,
  
- aðferð við aflífun,
  
- aðferð við verkjastillingu (ef notuð),
  
- verklag við einangrun vefja,
  
- auðkenni miðfasastöðvandi íðefnis, styrkur þess og hversu lengi meðferð stendur,
  
- aðferðir við undirbúning sýnisglerja,

- viðmiðanir fyrir talningu breytinga,
- fjöldi frumna sem er skoðaður úr hverju dýri,
- viðmiðanir til að meta hvort niðurstöður rannsókna séu jákvæðar, neikvæðar eða tvíræðar.

*Niðurstöður:*

- ástand dýranna fyrir prófunina og á meðan henni stendur, þ.m.t. merki um eiturhrif,
- líkamsþyngd og þyngd líffæra við aflifun (ef margar meðferðir eru notaðar skal mæla líkamsþyngd meðan á meðferðum stendur),
- merki um eiturhrif,
- jafnskiptingarhlutfall,
- hlutfall milli jafnskiptinga í sáðstofnfrumum og miðfasa fyrstu og annarrar rýriskiptingar, eða aðrar vísbendingar um váhrif á markvefinn,
- tegund og fjöldi breytinga, tilgreint sérstaklega fyrir hvert dýr,
- heildarfjöldi breytinga fyrir hvern hóp ásamt meðaltali og staðalfrávikum,
- heildarfjöldi frumna með breytingum fyrir hvern hóp ásamt meðaltali og staðalfrávikum,
- tengsl milli skammts og svörunar, ef unnt er,
- tölfræðilegar greiningar og aðferðir sem eru notaðar,
- gögn um samskiða, neikvæðan samanburð,
- rannsóknarsöguleg gögn um neikvæðan samanburð ásamt sviðum, meðaltölum, staðalfrávikum og 95% öryggisbili (ef það liggur fyrir) eða birt rannsóknarsöguleg gögn um neikvæðan samanburð sem eru notuð til að meta hvort niðurstöður úr prófun séu ásættanlegar,
- gögn um samskiða jákvæðan samanburð,
- breytingar á litnun, komi þær fram, þ.m.t. tíðni fjöllitnunar og/eða innræn tvöföldun í frumum.

*Umfjöllun um niðurstöðurnar**Niðurstaða***HEIMILDIR**

- 1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris
- 2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. Í: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, bls. 275–306.
- 3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.
- 4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.
- 5) Hess, R.A. and de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. Í: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, bls. 1–15.
- 6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379. Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. Í: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. and Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, bls. 477–484.
- 7) Cattanaach, B.M., and Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.
- 8) Cattanaach, B.M., and Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.
- 9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.
- 10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313–324.
- 11) Adler I.-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19–30.
- 12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.

- 13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 14) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. *Mutation Res.*, 52, 207-209.
- 15) Hsu, T.C., Elder, F. and Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. *Environ. Mutagen.*, 1, 291-294.
- 16) Evans, E.P., Breckon, G., and Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 3, 289-294.
- 17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, Í: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, bls. 115-141.
- 18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays Í: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, bls. 184-232.
- 19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. *Mutation Res.*, 723, 87-90.
- 20) Warr T.J., Parry E.M. and Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, *Mutation Res.*, 287, 29-46.
- 21) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. *Cancer Res.*, 43, 1362-1364.
- 22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. *Mutation Res.*, 119, 403-413.

*Viðbætur*

## SKILGREININGAR

Mislitnun: öll frávik frá eðlilegum fjölda tvílitna (eða einlitna) litninga sem nema einum eða fleiri litningum en ekki ef um er að ræða heilt sett eða heil sett litninga (fjöllitnun).

Þráðhaft: svæði á litningi þar sem spóluþræðir festast meðan á frumskiptingu stendur og það gerir dótturlitningunum kleift að færast skipulega að skautum dótturfrumnanna.

Íðefni: efni eða blanda.

Fjölbreytni litninga: fjölbreytni í lögun (t.d. miðheftir, endaheftir o.s.frv.) og stærð litninga.

Litningsþráðarbreyting: skemmd á byggingu litnings sem lýsir sér í því að stakir litningsþræðir rofna eða þeir rofna og tengjast síðan aftur öðrum þráðum.

Litningabreyting: skemmd á byggingu litnings sem lýsir sér í því að báðir litningsþræðirnir rofna á sama stað eða þeir rofna báðir á sama stað og tengjast síðan aftur.

Efni sem veldur litningabrenslun: öll íðefni sem valda byggingarlegum litningabreytingum í frumhópum eða lífverum.

Skarð: litlaus skemmd sem er mjórri en sem nemur breidd eins litningsþráðar og þar sem uppröðun litningsþráðanna er nálægt því að vera eðlileg.

Erfðaeiturhrif: almennt hugtak sem nær yfir allar gerðir skaða á DNA eða litningum, þ.m.t. rof, úrfelling, viðbætur, breytingar á nukleótíðum og tengingar þeirra, endurröðun, stökkbreytingar, litningabreytingar og mislitnun. Erfðaeiturhrif hafa ekki öll í för með sér stökkbreytingar eða stöðugar litningaskemmdir.

Jafnskiptingarhlutfall: hlutfallið milli fjölda frumna í miðfasa og mælds heildarfjölda frumna í frumhópi, vísbending um hve ör fjölgunin er í þessum frumhópi.

Jafnskipting: skipting frumkjarnans sem skiptist oftast í forfasa, formiðfasa, miðfasa, síðfasa og lokafasa.

Stökkbreyting: veldur arfgengri breytingu á röð eða röðum DNA-basapara í litningum eða breytingu á byggingu litninga (litningabreytingum).

Breyting á fjölda: breyting á fjölda litninga frá því sem eðlilegt er hjá þeim dýrum sem eru notuð.

Fjöllitnun: margfeldi á fjölda einlitna litninga ( $n$ ), að tvílitnun undanskilinni (þ.e.  $3n$ ,  $4n$  o.s.frv.).

Byggingarleg breyting: breyting á byggingu litnings sem kemur fram við smásjárskoðun á miðfasa frumskiptingar sem úrfellingar og bútar, víxlanir.

Prófunaríðefni: sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

UVCB-efni: efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni og líffræðileg efni.

5) Í stað kafla B.40 í B-hluta kemur eftirfarandi:

„B.40 RANNSÓKN Í GLASI Á HÚÐÆTINGU: PRÓFUNARAÐFERÐ VIÐ MÆLINGAR Á RAFVIÐNÁMI GEGNUM HÚÐ (TER)

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 430 um prófanir (2015). Með húðætingu er átt við varanlega skemmd í húð, sem birtist sem sýnilegt drep sem nær í gegnum húðþekjuna og niður í leðurhúðina, eftir að prófunaríðefni hefur verið borið á hana, samkvæmt skilgreiningu í hnattsamræmdu kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK) (1. heimild) og reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og þökkun (reglugerðin um flokkun, merkingu og þökkun) <sup>(1)</sup>. Þessi uppfærða prófunaraðferð B.40 felur í sér prófun *í glasi* sem gerir kleift að sanngreina óætandi og ætandi efni og blöndur í samræmi við hnattsamræmt kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK-SÞ) (1. heimild) og reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og þökkun.
2. Mat á húðætandi áhrifum hefur oftast falið í sér notkun tilraunadýra (prófunaraðferð B.4, sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 404 um prófanir, upphaflega samþykkt árið 1981 og endurskoðuð árin 1992, 2002 og 2015) (2. heimild). Auk fyrirliggjandi prófunaraðferðar B.40 hafa aðrar aðferðir til prófunar *í glasi*, til prófunar á húðætingarmætti íðefna, verið fullgiltar og samþykktar sem prófunaraðferð B.40a (sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 431 um prófanir) (3. heimild) og prófunaraðferð B.65 (sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 435 um prófanir) (4. heimild), sem geta einnig sanngreint undirundirflokkka ætandi íðefna ef þörf krefur. Nokkrar fullgiltar aðferðir til prófunar *í glasi* hafa verið samþykktar sem prófunaraðferð B.46 (sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 439 um prófanir) (5. heimild) sem nota skal til prófunar á húðertingu. Í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunar um samþættar aðferðir við prófun og mat á húðætingu og húðertingu er lýst nokkrum einingum sem samflokka ýmsar upplýsingaveitur og greiningartæki, og i. veittar leiðbeiningar um hvernig skal samþætta og nota fyrirliggjandi prófunargögn og önnur gögn til að meta húðertingar- og ætingarmátt íðefna, og ii. lagðar til nálganir þegar þörf er á frekari prófunum (6. heimild).
3. Þessi prófunaraðferð varðar húðætingu sem endapunkt með tilliti til heilbrigðis manna. Hún grundvallast á prófunaraðferð við mælingar á rafviðnámi gegnum rottuhúð (TER), þar sem notaðir eru húðflípar til að sanngreina ætandi efni eftir hæfni þeirra til að skaða hornlag húðarinnar og draga úr tálmaþvirkni hennar. Samsvarandi OECD-viðmiðunarreglu um prófanir var upphaflega samþykkt árið 2004 og uppfærð árið 2015 til að vísa til leiðbeiningarskjalsins um samþættar aðferðir við prófun og mat (IATA).
4. Til að meta prófun *í glasi* á húðætingu í eftirlitsskyni voru gerðar forfullgildingarrannsóknir (7. heimild) og fylgt eftir með formlegri fullgildingarrannsókn á prófunaraðferð við mælingar á rafviðnámi gegnum rottuhúð til að meta húðætingu (8.–11. heimild). Niðurstöður þessara rannsókna urðu til þess að mælt var með því að prófunaraðferðin við mælingar á rafviðnámi gegnum húð (einnig nefnd fullgiltu viðmiðunaradferðin (e. *Validated Reference Method – VRM*) yrði notuð í eftirlitsskyni við mat *í lífi* á húðætingu (12.–14. heimild).
5. Áður en hægt er að nota tillagða samsvarandi eða breytta prófunaraðferð *í glasi* við mælingar á rafviðnámi gegnum húð á húðætingu í eftirlitsskyni, aðra en fullgiltu viðmiðunaradferðina, skal ákvarða áreiðanleika hennar, gildi (nákvæmni) og takmarkanir miðað við tillagða notkun til að tryggja að hún sé samsvarandi fullgiltu viðmiðunaradferðinni, í samræmi við kröfurnar í nothæfisstöðlunum (15. heimild). Gagnkvæma samþykkt gagna, samkvæmt samkomulagi Efnahags- og framfarastofnunarinnar, er aðeins hægt að tryggja eftir að búið er að endurskoða og fella inn í samsvarandi OECD-viðmiðunarreglu um prófanir allar tillagðar, nýjar eða uppfærðar prófunaraðferðir samkvæmt nothæfisstöðlunum.

SKILGREININGAR

6. Skilgreiningar, sem eru notaðar, eru gefnar upp í viðbætinum.

ATRÍÐI SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

7. Fullgildingarrannsókn (10. heimild) og aðrar birtar rannsóknir (16. og 17. heimild) hafa sýnt að með prófunaraðferð við mælingar á rafviðnámi gegnum rottuhúð er hægt að greina á milli þekktra húðætandi efna og óætandi efna með heildarnæmi sem nemur 94% (51/54) og sértæki sem nemur 71% (48/68) fyrir gagnagrunn með 122 efnun.

<sup>(1)</sup> Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1272/2008 frá 16. desember 2008 um flokkun, merkingu og þökkun efna og blandna, um breytingu og niðurfellingu á tilskipunum 67/548/EBE og 1999/45/EB og um breytingu á reglugerð (EB) nr. 1907/2006 (Stjtúð. ESB L 353, 31.12.2008, bls. 1).



8. Þessi prófunaraðferð varðar húðætingu í *glasi*. Hún gerir kleift að sanngreina óætandi og ætandi prófunaríðefni í samræmi við HSK SP/reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og þökkun. Sú takmörkun er á þessari prófunaraðferð, eins og sýnt er fram á í fullgildingarrannsóknunum (8.–11. heimild), að hún gefur ekki færi á undirflokkun ætandi efna og blandna í samræmi við HSK SP/reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og þökkun. Notkun þessarar prófunaraðferðar ákvarðast af gildandi regluramma. Þó að þessi prófunaraðferð veiti ekki fullnægjandi upplýsingar um húðertingu skal það tekið fram að prófunaraðferð B.46 varðar sérstaklega rannsókn í *glasi* á áhrifum húðertingar á heilbrigði (5. heimild). Fyrir fullt mat á staðbundnum áhrifum á húð eftir váhrif á húð í eitt skipti er mælt með því að fletta upp í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um samþætтар aðferðir við prófun og mat (6. heimild).
9. Margvísleg íðefni, sem eru aðallega efni, hafa verið prófuð við fullgildinguna sem liggur til grundvallar þessari prófunaraðferð og gagnasafn fullgildingarrannsóknarinnar, byggt á athugunum, náði yfir 60 efni sem ná yfir margs konar íðefnaflokka (8. og 9. heimild). Á grundvelli fyrirbyggjandi heildargagna hentar prófunaraðferðin fyrir margs konar íðefnaflokka og eðlisástand, þ.m.t. vökva, hálföst efni, föst efni og vaxkennd efni. Þar eð prófunarefni með viðeigandi tilvísunargögnum eru ekki auðveldlega aðgengileg fyrir tiltekið eðlisástand skal bent á að frekar lítill fjöldi vaxkenndra efna og ætandi fastra efna voru metin í fullgildingunni. Vökvarnir mega vera vatnskenndir eða ekki vatnskenndir og föstu efnin mega vera uppleysanleg eða óleysanleg í vatni. Í tilvikum þar sem unnt er að sýna fram á að prófunaraðferðin sé ekki nothæf fyrir tiltekinn flokk efna skal ekki nota prófunaraðferðina fyrir þann tiltekna flokk efna. Þar sem þessi prófunaraðferð hentar efnum telst hún að auki henta blöndum. Þar eð blöndur ná yfir breitt svið flokka og samsetninga og sem stendur eru aðeins takmarkaðar upplýsingar fyrirbyggjandi um prófanir á blöndum skal þó, í þeim tilvikum þar sem unnt er að sýna fram á ónothæfi prófunaraðferðarinnar varðandi tiltekinn flokk af blöndum (t.d. áætlun fylgt eins og mælt er með í Eskes *et. al.* 2012) (18. heimild), ekki nota prófunaraðferðina fyrir þann tiltekna flokk blandna. Áður en þessi aðferð til prófunar á blöndu, sem er framkvæmd til að fá gögn sem fyrirhugað er að nota í eftirlitsskyni, er notuð skal skoðað hvort, og þá af hverju, hún gæti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi. Ekki er þörf á slíkri skoðun ef prófun á blöndunni er krafa af hálfu eftirlitsyfirvalda. Ekki er enn búið að meta lofttegundir og úðaefni í fullgildingarrannsóknunum (8. og 9. heimild). Þó að það sé hugsanlegt að hægt sé að prófa lofttegundir og úðaefni með prófunaraðferðinni við mælingar á rafviðnámi gegnum húð er ekki hægt að prófa þau með núverandi prófunaraðferð.

#### MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

10. Prófunaríðefnið er látið liggja í allt að 24 klukkustundir á yfirborði húðþekju húðflipa í tveggja hólfa prófunarkerfi þar sem húðflipinn gegnir hlutverki skilrúma milli hólfanna. Húðfliparnir eru teknir af 28–30 daga gömlum rottum sem hafa verið aflífaðar á mannúðlegan hátt. Ætandi íðefni eru sanngreind eftir hæfni þeirra til að skaða hornlag húðarinnar og draga úr tálmaþvirkni hennar en þetta mælist sem lækkan á rafviðnámi húðar niður fyrir viðmiðunarmörk (16. heimild) (sjá 32. lið). Fyrir rafviðnám gegnum húð hjá rottum hefur þröskuldsgildið 5 k verið valið á grundvelli umfangsmikilla gagna fyrir vítt svið efna þar sem mikill meirihluti gildanna var ýmist vel yfir (oft > 10 kΩ) eða vel undir (oft < 3 kΩ) þessu gildi (16. heimild). Prófunaríðefni, sem eru óætandi í dýrum en eru ertandi eða óertandi, lækka að jafnaði ekki rafviðnámið gegnum húð niður fyrir þetta þröskuldsgildi. Enn fremur getur notkun annarra húðhluta eða annars búnaðar breytt þröskuldsgildinu og þar með gert frekari fullgildinguna nauðsynlega.
11. Liður í prófunarferlinu er áfangi með leysilítarbindingu sem er staðfestingarprófun á jákvæðum niðurstöðum varðandi rafviðnám gegnum húð, þ.m.t. á gildum í kringum 5 kΩ. Áfanginn með leysilítarbindingu sýnir hvort aukning á jónalekt er vegna efnislegrar eyðileggingar á hornlagi húðarinnar. Mæling á rafviðnámi gegnum húð hefur sýnt sig að vera áreiðanleg aðferð (*í lífi*) til að segja fyrir um ætandi eiginleika hjá kanínum sem metnir eru með prófunaraðferð B.4 (2. heimild).

#### SÝNT FRAM Á HÆFNI

12. Áður en prófunaraðferðin við mælingar á rafviðnámi gegnum rottuhúð, sem fylgir þessari prófunaraðferð, er tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur sýna fram á tæknilega hæfni sína með því að flokka með réttum hætti hæfnisefnin tólf sem mælt er með í töflu 1. Ef efni á skránni er ekki tiltækt, eða þegar slíkt er réttlæt看legt, er heimilt að nota annað efni ef fullnægjandi tilvísunargögn *í lífi* og *í glasi* liggja fyrir um þau (t.d. af skránni yfir viðmiðunaráðefni (16. heimild)) að því tilskildu að sömu valviðmiðunum, eins og lýst er í töflu 1, sé beitt.

Tafla 1

Skrá yfir hæfnisefni <sup>(1)</sup>

Efni	CAS-númer	Íðefnaflokkur <sup>(2)</sup>	Undirflokkur HSK SP eða reglugerðar (EB) nr. 1272/2008 byggt á niðurstöðum úr prófun í lífi <sup>(3)</sup>	Undirflokkur fullgiltar viðmiðunaraðferðar byggt á niðurstöðum úr prófun í glasi	Eðlis-ástand	pH <sup>(4)</sup>
<i>Ætandi efni í lífi</i>						
N,N'-dímetýldíprópylentríamín	10563-29-8	lífrænn basi	1A	6 × C	Vökvi	8,3
1,2-díamínóprópan	78-90-0	lífrænn basi	1A	6 × C	Vökvi	8,3
Brennisteinssýra (10%)	7664-93-9	ólífræn sýra	(1A/)1B/1C	5 × C 1 × NC	Vökvi	1,2
Kálfumhýdroxíð (10% vatnslausn)	1310-58-3	ólífrænn basi	(1A/)1B/1C	6 × C	Vökvi	13,2
Oktan- (kaprýl-)sýra	124-07-2	lífræn sýra	1B/1C	4 × C 2 × NC	Vökvi	3,6
2-tert-bútýlfenól	88-18-6	fenól	1B/1C	4 × C 2 × NC	Vökvi	3,9
<i>Óætandi efni í lífi</i>						
Ísósterínsýra	2724-58-5	lífræn sýra	NC	6 × NC	Vökvi	3,6
4-amínó-1,2,4-tríasól	584-13-4	lífrænn basi	NC	6 × NC	Fast efni	5,5
Fenetylbrómíð	103-63-9	rafsækin	NC	6 × NC	Vökvi	3,6
4-(metýlþrío)-bensaldehýð	3446-89-7	rafsækin	NC	6 × NC	Vökvi	6,8
1,9-dekadíen	1647-16-1	hlutlaus lífræn	NC	6 × NC	Vökvi	3,9
Tetraklóretýlen	127-18-4	hlutlaus lífræn	NC	6 × NC	Vökvi	4,5

Skammstafanir: aq = vatnskenndur, CASRN = CAS-númer, VRM = fullgild viðmiðunaraðferð, C = ætandi, NC = óætandi.

- (1) Hæfnisefnin, sem voru fyrst flokkuð í annars vegar ætandi og hins vegar óætandi, síðan eftir ætandi undirundirflokki og loks íðefnaflokki, voru valin úr efnunum sem voru notuð í fullgildingarrannsókn Evrópumíðstöðvarinnar um fullgildingu staðgönguáðferða á prófunaraðferð við mælingar á rafviðnámi gegnum rottuhúð (8. og 9. heimild). Nema annað sé tekið fram voru efnin prófuð á því hreinleikastigi sem þau höfðu þegar þau voru keypt á almennum markaði (8. heimild). Valið innihélt, að því marki sem hægt var, efni sem: i. eru dæmigerð fyrir svörunarsvið ætingar (t.d. óætandi; frá lítilli til mikillar ætingar) sem fullgilta viðmiðunaraðferðin getur mælt eða spáð fyrir um, ii. eru dæmigerð fyrir íðefnaflokkana sem eru notaðir í fullgildingarrannsókninni, iii. endurspeglar nothæfiseiginleika fullgiltu viðmiðunaraðferðarinnar, iv. hafa vel skilgreinda efnafræðilega byggingu, v. kalla fram endanlegar niðurstöður í viðmiðunarpöfunaraðferðinni í lífi, vi. eru fáanleg á markaði og vii. þeim fylgir ekki óásættanlegur förgunarkostnaður.
- (2) Íðefnaflokkur, samkvæmt Barratt *et al.* (8. heimild).
- (3) Samsvarandi þökkunarflokkar SP eru I, II og III, eftir því sem við á, fyrir undirflokkana 1A, 1B og 1C samkvæmt HSK SP/reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og þökkun.
- (4) pH-gildin eru fengin úr Fentem *et al.* (9. heimild) og Barratt *et al.* (8. heimild).

## VERKFERLI

13. Staðlaðar verklagsreglur eru tiltækar fyrir prófunaraðferðina við mælingar á rafviðnámi gegnum rottuhúð að því er varðar húðætingu (19. heimild). Prófunaraðferðirnar við mælingar á rafviðnámi gegnum rottuhúð, sem þessi prófunaraðferð nær yfir, skulu uppfylla eftirfarandi skilyrði:

**Dýr**

14. Nota skal rottur þar eð áður hefur verið sýnt fram á næmi húðar þeirra fyrir efnum í þessari prófunaraðferð (12. heimild) og þar eð rottuhúð er eina húðin sem hefur verið formlega fullgilt (8. og 9. heimild). Aldur rottanna (þegar húðin er tekin) og stofn eru sérstaklega mikilvægir þættir til að tryggja að háarsekkir þeirra séu í hvíld áður en vöxtur á fullorðinshárum hefst.
15. Hár á baki og síðum á ungum, u.þ.b. 22 daga gömlum, karl- eða kvenrottum (af Wistar-stofni eða sambærilegum stofni) er fjarlægt gætilega með litlum hárlippum. Dýrin eru síðan þvegin vandlega með rökum klút meðan klippta svæðið er baðað í sýklalyfjalausn (sem inniheldur t.d. streptómýsín, penisillín, klóramfeníkól og amfóterísín í styrkleikum sem nægja til að hindra bakteríuvöxt). Dýrin eru þvegin aftur með sýklalyfjalausn á þriðja eða fjórða degi eftir fyrsta þvottinn og eru notuð innan þriggja daga frá öðrum þvotti þegar hornlag húðarinnar hefur jafnað sig eftir að hárin voru fjarlægð.

**Undirbúningur húðflipa**

16. Dýrin eru aflífuð á mannúðlegan hátt þegar þau eru 28–30 daga gömul, þessi aldur er mikilvægur. Því næst er húðin flegin af baki og síðum hvers dýrs og öll umframfita fjarlægð af undirhúðinni með því að kroppa hana gætilega af húðinni. Fjarlægðir eru húðflipar, hver um sig u.þ.b. 20 mm í þvermál. Húðina má geyma áður en fliparnir eru notaðir þar sem sýnt er að jákvæð og neikvæð samanburðargögn eru jafngild þeim sem fást með nýrri húð.
17. Hver húðflipi er settur yfir annan endann á röri úr PTFE (pólýtetraflúoretýleni) þannig að öruggt sé að yfirborð húðþekjunnar sé í snertingu við rörið. Til að húðin haldist á sínum stað er O-laga gúmmíhring þrýst þétt yfir endann á rörinu og umframvefur skorinn burt. Síðan er þétt með vaselíni á milli O-gúmmíhringsins og endans á PTFE-rörinu. Rörinu er haldið uppi með fjaðurklemmu inni í viðtakahólfi sem inniheldur magnesíumsúlfatlausn (154 mM) (mynd 1). Dýfa skal húðflipanum á kaf í magnesíumsúlfatlausnina. Hægt er að ná 10–15 húðflipum úr einni rottuhúð. Mál rörsins og O-hringsins eru gefin á mynd 2.
18. Áður en prófunin hefst er rafviðnám gegnum húð mælt á tveimur húðflipum til að gæðaprófa húðina af hverju dýri. Báðir fliparnir ættu að gefa hærra rafviðnámsgildi en 10 kΩ ef hægt á að vera að nota afganginn af flipunum fyrir prófunaraðferðina. Ef viðnámsgildið er minna en 10 kΩ skal farga flipunum sem eftir eru af þeirri húð.

**Notkun prófunariðfnisins og samanburðarefna**

19. Nota skal samskeiða jákvæðan og neikvæðan samanburð fyrir hverja keyrslu (tilraun) til að tryggja fullnægjandi frammistöðu tilraunalíkansins. Nota skal húðflipa frá einu dýri í hverri keyrslu (tilraun). Ráðlögð jákvæð og neikvæð samanburðarprófunariðefni eru 10 M saltsýra og eimað vatn, í þeirri röð.
20. Fljótandi prófunariðefnum (150 µl) er dreift jafnt á yfirborð húðþekjunnar inni í rörinu. Þegar efni í föstu formi eru prófuð er nægilegt magn af fasta efninu sett jafnt á flipann til að tryggja að allt yfirborð húðþekjunnar sé þakið. Afjónuðu vatni (150 µl) er síðan hellt ofan á fasta efnið og rörið hrist varlega. Til að ná hámarksnertingu við húðina getur þurft að hita föst efni upp í 30 °C til að bræða eða mykja prófunariðefnið eða mala þau til að mynda korn eða duft.

21. Þrír húðflípar eru notaðir fyrir hvert prófunar- og samanburðaríðefni í hverri prófunarkeyrslu (rannsókn). Prófunaríðefnin eru látin liggja á í 24 klukkustundir við 20–23 °C. Prófunaríðefnið er fjarlæggt með því að skola það af undir kranavatnsbunu við allt að stofuhita þar til búið er að fjarlægja allt efni sem hægt er.

#### Mælingar á rafviðnámi gegnum húð

22. Samviðnám húðar er mælt á sama hátt og rafviðnám gegnum húð með því að nota Wheatstone-brú með lágspennntum riðstraumi (18. heimild). Almennar forskriftir fyrir brúna eru 1–3 volta vinnsluspenna, 50–1000 Hz, sínuslaga eða ferhyrndur riðstraumur og a.m.k. 0,1–30 kΩ mælivið. Brúin, sem er notuð í fullgildingarrannsókninni, mælir span, rýmd og viðnám í gildum upp í 2000 H, 2000 μF og 2 MΩ, í þessari röð, við tíðnirnar 100 Hz eða 1 kHz, með notkun raðtengdra eða hliðtengdra gilda. Að því er varðar rafviðnám gegnum húð eru mælingar á ætandi áhrifum skráðir í viðnámi, við tíðnina 100 rið og með því að nota raðgildi. Fyrir mælingu á rafviðnámi er yfirborðsspenna húðarinnar minnkuð með því að þekja húðþekjuna með nægilegu magni af 70% etanóli. Eftir nokkrar sekúndur er etanólið fjarlæggt úr rörinu og vefurinn er síðan vatnaður með því að bæta við 3 ml af magnesíumsúlfatlausn (154 mM). Rafskaut brúarinnar eru sett hvort sínum megin á húðflípan til að mæla viðnámið sem kΩ/húðflípa (mynd 1). Á mynd 2 má sjá mál rafskautanna og lengd þess hluta rafskautsins sem er undir krókóðflaklemmunum. Klemman á innra rafskautinu er látin hvíla á toppi PTFE-rörsins meðan á viðnámsmælingunni stendur til að tryggja að lengd þess hluta rafskautsins, sem er ofan í magnesíumsúlfatlausninni, haldist óbreytt. Ytra rafskautinu er komið fyrir inni í viðtakahólfinu þannig að það hvíli á botni hólsins. Fjarlægðinni milli neðsta hluta fjaðurklemmunnar og botns PTFE-rörsins skal haldið stöðugri (mynd 2) þar eð þessi fjarlægð hefur áhrif á mæligildi viðnámsins. Af sömu ástæðu skal halda fjarlægðinni milli innra rafskautsins og húðflípan stöðugri og sem minnstri (1–2 mm).
23. Ef mælda viðnámsgildið er hærra en 20 kΩ getur ástæðan verið sú að leifar af prófunaríðefninu þekja yfirborðið á húðþekju húðflípan. Reyna má að fjarlægja þetta þekjandi efni, t.d. með því að halda fyrir PTFE-rörið með hanskaklæddum þumalfingri og hrista það í u.þ.b. 10 sekúndur; magnesíumsúlfatlausninni er síðan fleygt og viðnámsmælingin endurtekin með nýju magnesíumsúlfati.
24. Eiginleikar og mál prófunarbúnaðarins og tilraunaaðferðin, sem er notuð, geta haft áhrif á gildin sem fást fyrir rafviðnám gegnum húð. Viðmiðunarmörkin 5 kΩ fyrir ætandi áhrif voru ákvörðuð út frá gögnum sem aflað var með þeim tiltekna búnaði og verkferli sem er lýst í þessari prófunaraðferð. Mismunandi viðmiðunarmörk og samanburðargildi kunna að eiga við ef aðstæðum við prófun er breytt eða öðruvísi búnaður notaður. Því er nauðsynlegt að kvarða aðferðina og viðmiðunargildin fyrir viðnámið með því að gera prófanir á röð hæfnisefna, sem valin eru úr efnunum sem notuð eru í fullgildingarrannsókninni (8. og 9. heimild), eða úr íðefnaflokkum sem líkjast efnunum sem verið er að rannsaka. Nokkur viðeigandi hæfnisefni eru tilgreind í töflu 1.

#### Aðferðir við bindingu leysilítar

25. Váhrif frá tilteknum óætandi efnum geta orðið til þess að viðnámið lækkar niður fyrir þröskuldsgildið 5 kΩ svo að jónir geta farið í gegnum hornlag húðarinnar og lækkað þannig rafviðnámið (9. heimild). Til dæmis geta hlutlaus, lífræn efni og efni með yfirborðsvirka eiginleika (s.s. þvotta- og hreinsiefni, ýruefni og önnur yfirborðsvirk efni) fjarlæggt húðlípið og aukið jónalekt gegnum tálmann. Ef gildin fyrir rafviðnám gegnum húð, sem slík íðefni kalla fram, eru undir eða í kringum 5 kΩ og engar skemmdir er að sjá á húðflípunum skal meta hversu djúpt leysilíturinn þrengir sér í samanburðar- og meðferðarvefina til að ákvarða hvort mældu gildin fyrir rafviðnám gegnum húð voru vegna aukins gegndræpis húðarinnar eða vegna húðættingar (7. og 9. heimild). Í síðarnefnda tilvikinu, þar sem hornlag húðarinnar er rofið, smýgur leysilíturinn súlforhódamín-B hratt í gegnum húðyfirborðið, þegar hann er borinn á það, og lítar undirliggjandi vef. Þessi tiltekni leysilítur er stöðugur gagnvart margs konar efnum og útdráttaraðferðin, sem lýst er hér á eftir, hefur ekki áhrif á hann.

#### Leysilíturinn súlforhódamín B settur á og fjarlægður

26. Að loknu mati á rafviðnámi gegnum húð er magnesíumsúlfatinu úr túpunni hent og húðin skoðuð vandlega með tilliti til greinilegra skemmda. Ef engar greinilegar skemmdir eru (t.d. götun) eru 150 μl af 10% (þyngd miðað við rúmmál) lausn leysilítarins súlforhódamíns-B (Acid Red 52, C.I. 45100, CAS-nr. 3520-42-1) í eimuðu vatni látnir liggja á yfirborði húðþekju hvers húðflípa í tvær klukkustundir. Þessir húðflípar eru síðan skolaðir undir kranavatnsbunu við allt að stofuhita í u.þ.b. 10 sekúndur til að fjarlægja umframmagn leysilítar eða óbundinn leysilít. Hver húðflípi er tekinn gætilega af PTFE-rörinu og settur í hettuglas (t.d. 20 ml glas til sindurmælinga) sem inniheldur afjónað vatn (8 ml). Hettuglösín eru hrist varlega í 5 mínútur til að fjarlægja allar leifar af óbundnum leysilít.

Þetta skolonarferli er síðan endurtekið og húðfliparnir því næst fjarlægðir og settir í hettuglös með 5 ml af 30% (massi miðað við rúmmál) natríumdódekýlsúlfati í eimuðu vatni, og hafðir í hitaskáp yfir nótt við 60 °C.

27. Eftir þetta er hver húðflipi fjarlægður og honum fleygt og lausnir, sem eftir er, skilin í skilvindu í 8 mínútur við 21 °C (hlutfallslegur miðflóttakraftur ~ 175 × g). Þá er 1 ml sýnis af flotinu þynntur í rúmmálshlutfallinu 1 á móti 5 (þ.e. 1 ml + 4 ml) með 30% (massi miðað við rúmmál) natríumdódekýlsúlfats í eimuðu vatni. Ljósþéttni lausnarinnar er mæld við 565 nm.

#### Útreikningur á leysilitarinnihaldi

28. Innihald leysilitarins súlforhódamíns-B í hverjum flipa er reiknað út frá ljósþéttignigildunum (9. heimild) (móleðlisgleyfnistuðullinn fyrir leysilitinn súlforhódamín-B við 565 nm =  $8,7 \times 10^4$ , sameindþyngd = 580). Leysilitarinnihaldið er ákvarðað fyrir hvern húðflipa með því að nota viðeigandi kvörðunarferil og meðalleysilitarinnihaldið er síðan reiknað út fyrir alla húðflipana.

#### Viðmiðanir fyrir ásættanleika

29. Meðalgildi niðurstaðna úr mælingum á rafviðnámi gegnum húð er tekið gilt ef samskeiða, jákvæðu og neikvæðu samanburðargildin falla innan viðurkenndra marka fyrir aðferðina sem er notuð á prófunarstofunni. Viðurkennd viðnámssvið fyrir aðferðina og búnaðinn, sem lýst er hér að framan, eru gefin í eftirfarandi töflu:

Samanburður	Efni	Viðnámssvið (kΩ)
Jákvæður	10 M saltsýra	0,5–1,0
Neikvæður	Eimað vatn	10–25

30. Meðaltal niðurstaðna fyrir bindingu leysilitar er tekið gilt með því skilyrði að gildi úr samskeiða samanburðinum séu innan viðurkenndra marka fyrir aðferðina. Tillögur að ásættanlegum dreifisviðum leysilitarinnihalds fyrir samanburðarefni, aðferðina og búnaðinn, sem er lýst hér að framan, eru settar fram í eftirfarandi töflu:

Samanburður	Efni	Dreifisvið leysilitarinnihalds (µg/flipa)
Jákvæður	10 M saltsýra	40–100
Neikvæður	Eimað vatn	15–35

#### Túlkun niðurstaðna

31. Þröskuldsgildi fyrir rafviðnám gegnum húð, sem greinir ætandi frá óætandi prófunaríðefnum, var ákvarðað við bestun prófunaraðferðarinnar, prófað á forfullgildingarstigi og staðfest með formlegri fullgildingarrannsókn.
32. Spálíkan fyrir prófunaraðferð við mælingar á rafviðnámi gegnum rottuhúð (9. og 19. heimild), sem tengist flokkunarkerfi HSK/SP/reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun, er sett fram hér fyrir neðan:

Prófunaríðefnið telst ekki vera húðættandi:

- i. ef meðalgildið fyrir rafviðnám gegnum húð, sem fæst fyrir prófunaríðefnið, er hærra en ( $>$ ) 5 k $\Omega$  eða
- ii. ef meðalgildið fyrir rafviðnám gegnum húð, sem fæst fyrir prófunaríðefnið, er minna en eða jafnt og ( $\leq$ ) 5 k $\Omega$  og
  - húðflíparnir eru ekki með neinar greinilegar skemmdir (t.d. götun) og
  - ef meðalleysilitarinnihald flípans er minna en ( $<$ ) meðalleysilitarinnihald flípans í samskeiða jákvæða samanburðinum með 10 M HCl (sjá 30. lið fyrir gildi jákvæðar samanburðarins).

Prófunaríðefnið telst vera húðættandi:

- i. ef meðalgildið fyrir rafviðnám gegnum húð, sem fæst fyrir prófunaríðefnið, er minna en eða jafnt og ( $\leq$ ) 5 k $\Omega$  og húðflíparnir eru greinilega skaddaðir (t.d. gataðir) eða
  - ii. ef meðalgildið fyrir rafviðnám gegnum húð, sem fæst fyrir prófunaríðefnið, er minna en eða jafnt og ( $\leq$ ) 5 k $\Omega$  og
    - húðflíparnir eru ekki með neinar greinilegar skemmdir (t.d. götun) en
    - meðalleysilitarinnihald flípans er meira en eða jafnt og ( $\geq$ ) meðalleysilitarinnihald flípans í samskeiða jákvæða samanburðinum með 10 M HCl (sjá 30. lið fyrir gildi jákvæða samanburðarins).
33. Prófunarkeyrsla (tilraun) á a.m.k. þremur samhlíða húðflípum ætti að nægja ef flokkun prófunarefnisins er ótvíræð. Ef niðurstöður eru óvissar, t.d. ef ósamsvörun er í samhlíða mælingum og/eða meðalgildi rafviðnáms gegnum húð er jafnt og  $5 \pm 0,5$  k $\Omega$ , skal tekið til athugunar að gera aðra óháða prófunarkeyrslu (tilraun), sem og þá þriðju ef ósamræmi er á milli niðurstaðna úr fyrstu keyrslunum (tilraununum) tveimur.

#### GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

#### Gögn

34. Viðnámsgildi (k $\Omega$ ) og gildi fyrir leysilitarinnihald ( $\mu$ g/flípa), eftir því sem við á, skulu sett fram í töfluformi fyrir prófunaríðefnið og jákvæð og neikvæð samanburðarefni, þ.m.t. gögn fyrir hvern einstakan samhlíða húðflípa í hverri prófunarkeyrslu (tilraun) og meðalgildi  $\pm$  staðalfrávik. Greina skal frá öllum endurteknum tilraunum. Greina skal frá skemmdum á húðflípum fyrir hvert prófunaríðefni.

#### Prófunarskýrsla

35. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

*Prófunaríðefni og samanburðarefni:*

- efni með einum efnisþætti: efnafraeðileg sanngreining, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.,

- fjölþáttaefni, UVCB-efni og blanda: lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli,
- útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,
- uppruni, lotunúmer, ef það liggur fyrir,
- meðhöndlun prófunaríðefnisins/samanburðarefnisins fyrir prófunina, ef við á (t.d. hitun og mölun),
- stöðugleiki prófunaríðefnisins, síðasti notkunardagur eða dagsetning endurgreiningar, ef hún er þekkt,
- geymsluskilyrði.

*Tilraunadýr:*

- stofn og kyn,
- aldur dýranna þegar þau eru notuð sem gjafadýr,
- uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,
- lýsing á undirbúningi húðhlutans.

*Prófunarskilyrði:*

- kvörðunarferlar fyrir prófunarbúnað,
- kvörðunarferlar fyrir framkvæmd prófunar á bindingu leysilítar, bandsía til mælingar á ljóspéttigildum og línuleikasvið mælibúnaðar fyrir ljóspéttni (t.d. litrófsmælir), ef við á,
- upplýsingar um prófunarferlið sem er notað við mælingar á rafviðnámi gegnum húð,
- upplýsingar um prófunarferlið sem er notað við mat á leysilítarbindingunni, ef við á,
- prófunarskammtar, lengd váhrifatímabils eða váhrifatímabila og hitastig við váhrif,
- upplýsingar um verkferli við þvott eftir váhrifatímabilið,
- fjöldi samhliða húðflipa fyrir hvert prófunaríðefni og hvern samanburð (jákvæður og neikvæður samanburður),
- lýsingar á öllum breytingum á prófunaraðferðinni,

- tilvísanir í rannsóknarsöguleg gögn um líkanið. Í þeim skal eftirfarandi felast án þess þó að einskorðast við það:
  - i. ásettannleiki gilda fyrir rafviðnám í gegnum húð (í kΩ) fyrir jákvæða og neikvæða samanburðinn, með tilvísun í viðnámssvið jákvæða og neikvæða samanburðarins
  - ii. ásettannleiki gilda fyrir leysilitarinnihald jákvæða og neikvæða samanburðarins (í µg/húðflípi), með tilvísun í gildissvið leysilitarinnihalds jákvæða og neikvæða samanburðarins
  - iii. ásettannleiki niðurstaðna úr prófun með tilvísun í rannsóknarsögulegan breytileika milli samhliða húðflípa
- lýsing á viðmiðunum fyrir ákvarðanir/spálíkani.

#### *Niðurstöður:*

- gögn úr mælingum á rafviðnámi gegnum húð og leysilitarbindingu (ef við á) skulu sett fram í töfluformi fyrir hvert prófunaríðefni og hvern samanburð, fyrir hverja prófunarkeyrslu (tilraun) og hvern samhliða húðflípa (hvert dýr og hvert húðsýni), meðaltal, staðalfrávik og fráviksstuðul,
- lýsing á öllum áhrifum sem vart verður,
- afleidd flokkun með tilvísun í spálíkanið/ákvörðunarviðmiðanir sem eru notaðar.

#### *Umfjöllun um niðurstöðurnar*

#### *Ályktanir*

#### **HEIMILDIR**

- 1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Aðgengilegt á: [[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev05/05files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html)].
- 2) Kafli B.4 í þessum viðauka, Bráð húðerting/húðæting.
- 3) Kafli B.40a í þessum viðauka, Líkan af mannshúð í glasi.
- 4) Kafli B.65 í þessum viðauka, Aðferð í glasi með tálma úr himnu.
- 5) Kafli B.46 í þessum viðauka, Rannsókn í glasi á húðertingu: prófunaraðferð með endurgerðri húðþekju manns.
- 6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

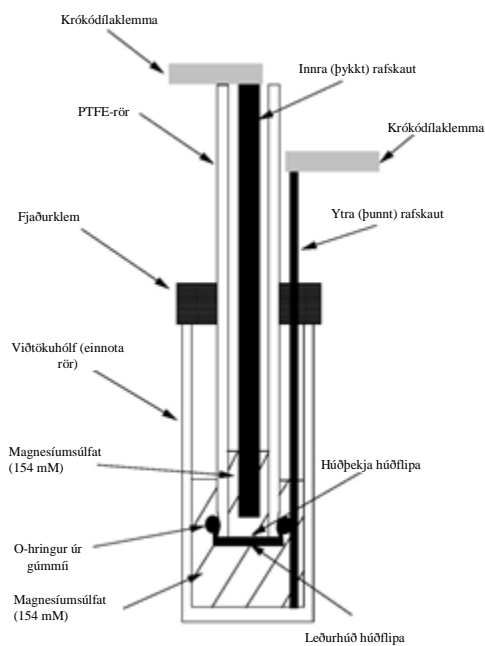


- 7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponc M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23, 219-255.
- 8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, 471-482.
- 9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro* 12, 483- 524.
- 10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops. *ATLA* 23, 129-147.
- 11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- 12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.
- 13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. *ATLA* 26, 275-280.
- 14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- 15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., and Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. *Fd. Chem. Toxicol.* 24, 507-512.
- 17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., and Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro*: Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol. In Vitro* 6, 191-194.
- 18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrasca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. and Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403.

- 19) TER SOP (December 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.
- 20) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

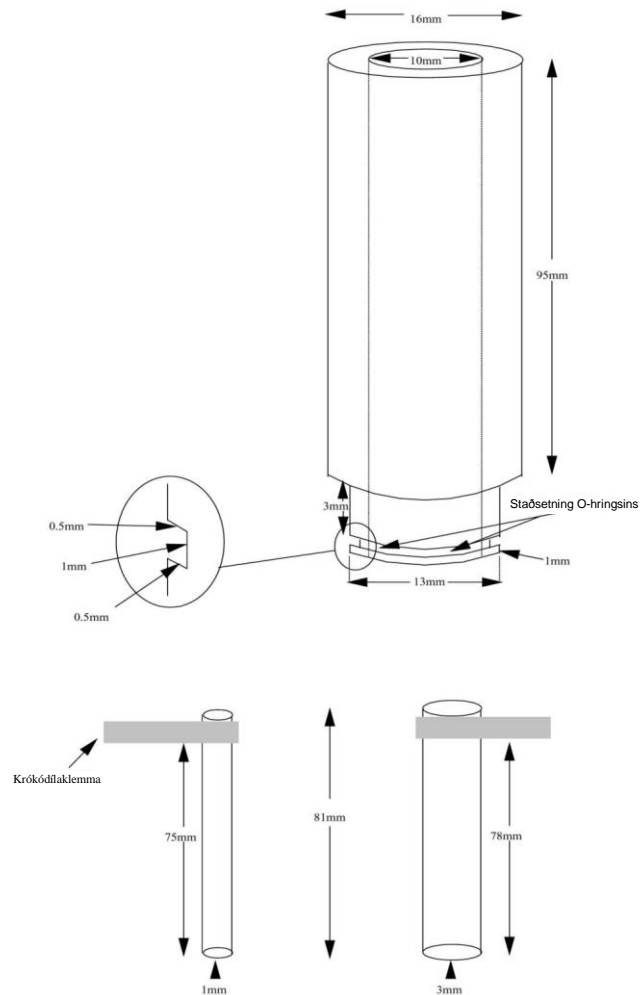
*Mynd 1*

**Búnaður fyrir mælingu á rafviðnámi gegnum rottuhúð**



Mynd 2

## Stærðarmál pólýetraflúoretýlen-rörsins og viðtökurörranna og rafskautanna sem eru notuð



## Mikilvægir þættir búnaðarins sem sýndur er hér að framan:

- innra þvermál PTFE-rörsins,
- lengd rafskautanna í hlutfalli við PTFE-rörið og viðtökurörið: rafskautin eiga ekki að snerta húðflípann og rafskaut af staðallengd á að vera í snertingu við magnesíumsúlfatlausnina,
- magnið af magnesíumsúlfatlausn í viðtökurörrinu: dýpt vökvans, í hlutfalli við hæðina í PTFE-rörrinu, á að vera eins og sýnt er á mynd 1,
- húðflípann þarf að festa nægilega vel á PTFE-rörið til að rafviðnámið sé raunsönn mæling á eiginleikum húðarinnar.

*Viðbætur*

## SKILGREININGAR

**Nákvæmni:** Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktu viðmiðunargildi niðurstaða úr prófun er. Nákvæmni er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferða og einn þáttur gildis. Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli réttra niðurstaðna úr prófunaraðferð (20. heimild).

**C:** Ætandi.

**Íðefni:** Efni eða blanda.

**Samsvörun:** Mælikvarði á nothæfi prófunaraðferðar, þegar um er að ræða prófunaraðferðir sem gefa afdráttarlausar niðurstöður, og er einn þáttur gildis. Hugtakið er stundum notað í stað hugtaksins „nákvæmni“ og er skilgreint sem hlutfall allra prófaðra íðefna sem eru rétt flokkuð sem jákvæð eða neikvæð. Samsvörun er að miklu leyti háð því hversu algeng jákvæð svörun er í þeim gerðum prófunaríðefna sem rannsakaðar eru (20. heimild).

**HSK (hnattsamræmt kerfi til flokkunar og merkingar á íðefnum (SP)):** Kerfi til flokkunar íðefna (efna og blandna), samkvæmt stöðluðum tegundum og stigum eðlisrænnar hættu, heilbrigðishættu og umhverfishættu, sem tekur til samsvarandi hættubóðsatriða, s.s. skýringarmynda, viðvörunarorða, hættusetninga, varnaðarsetninga og öryggisblaða til að miðla upplýsingum um skaðleg áhrif þeirra til verndar fólki (þ.m.t. vinnuveitendur, starfsmenn, flytjendur, neytendur og bráðaliðar) og umhverfinu (1. heimild).

**IATA:** Samþættar aðferðir við prófun og mat.

**Blanda:** Blanda eða lausn tveggja eða fleiri efna.

**Efni með einum efnisþætti:** Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi að a.m.k. 80% (massahlutfall).

**Fjölþáttaefni:** Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem fleiri en einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi í styrk sem nemur  $\geq 10\%$  (massahlutfall) og  $< 80\%$  (massahlutfall). Fjölþáttaefni er afleiðing af framleiðsluferli. Mismunurinn á blöndu og fjölþáttaefni er sá að blandan fæst með blöndun tveggja eða fleiri efna án efnahvarfs. Fjölþáttaefni er afleiðing af efnahvarfi.

**NC:** Óætandi.

**OD:** Ljósþéttni.

**PC:** Jákvæður samanburður, samskonar sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis og er meðhöndlað með efni sem vitað er að framkallar jákvæða svörun. Til að tryggja að hægt sé að meta breytileika í svörun jákvæða samanburðarins yfir tíma skal þessi jákvæða svörun þó ekki vera of kröftug.

**Nothæfisstaðlar:** Staðlar, byggðir á fullgilti prófunaraðferð, sem eru grundvöllur fyrir mat á samanburðarhæfi tillagðrar prófunaraðferðar sem er samsvarandi fullgiltu aðferðinni með tilliti til verkunarmáta og virkni. Meðal þeirra eru i. grundvallarþættir prófunaraðferðarinnar, ii. lágmarksskrá yfir viðmiðunariðefni sem valin eru úr þeim íðefnum sem voru notuð til að sýna fram á ásættanlegt nothæfi fullgiltu prófunaraðferðarinnar og iii. gildi fyrir áreiðanleika og nákvæmni sem eru svipuð þeim sem fengust með fullgiltu prófunaraðferðinni og sem eiga að fást með tillögðu prófunaraðferðinni þegar hún er metin út frá lágmarksskránni yfir viðmiðunariðefni (9. heimild).

**Gildi:** Lýsing á sambandi prófunaraðferðarinnar og áhrifanna, sem miðað er við, og hvort sambandið hefur merkingu og er gagnlegt miðað við tiltekinn tilgang. Gildið lýsir því að hvaða marki prófunaraðferðin nær að mæla rétt eða spá fyrir um líffræðilegu áhrifin sem miðað er við. Gildi felur í sér umfjöllun um nákvæmni (samsvörun) prófunaraðferðar (20. heimild).

**Áreiðanleiki:** Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma prófunaraðferð með samanburðarnákvæmni hjá hverri rannsóknarstofu og hjá mismunandi rannsóknarstofum í tiltekinn tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Áreiðanleiki er metinn með því að reikna út einsetursamanburðarnákvæmni og fjölsetra samanburðarnákvæmni (20. heimild).

**Næmi:** Hlutfall allra jákvæðra/virkra íðefna sem eru rétt flokkuð með prófunaraðferðinni. Næmi er mælikvarði á nákvæmni prófunaraðferðar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunaraðferðar (20. heimild).

**Húðæting í lífi:** Varanleg skemmd í húð sem kemur fram eftir að prófunariðefni hefur verið á húðinni í allt að fjórar klukkustundir, þ.e. sýnilegt drep sem nær í gegnum húðþekjuna og niður í leðurhúðina. Ætandi svörun einkennist af sárum, blæðingu, blæðandi hrúðri og, í lok 14 daga athugunartímabilsins, upplitun þegar húðin fölnar, hárlausum blettum og örum. Til greina kemur að gera vefjameinafræðilegar athuganir til að meta vefjaskemmdir sem vafi leikur á um.

**Sértæki:** Hlutfall allra neikvæðra/óvirkra íðefna sem eru rétt flokkuð með prófunaraðferðinni. Sértæki er mælikvarði á nákvæmni prófunaraðferðar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunaraðferðar (20. heimild).

**Efni:** Frumefni og efnasambönd þess, náttúruleg eða framleidd, þ.m.t. öll aukefni, sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika þess, og öll óhreinindi sem verða til í vinnslunni en þó ekki leysiefni sem skilja má frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess.

**(Prófunar)keyrsla:** Stakt prófunariðefni í samskeiða prófun á a.m.k. þremur samhliða húðflípum.

**Prófunariðefni:** Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

**Rafviðnám gegnum húð (TER):** Mælikvarði á samviðnám húðarinnar, sett fram í kílóómum. Þetta er einföld og traust aðferð til að meta tálmaþvirknina með því að skrá ferð jóna gegnum húðina með Wheatstone-brú.

**UVCB-efni:** Efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.

6) Í stað kafla B.40a í B-hluta kemur eftirfarandi:

„B.40a **RANNSÓKN Í GLASI Á HÚÐÆTINGU: PRÓFUNARAÐFERÐ MEÐ ENDURGERÐRI HÚÐÞEKJU MANNS (RhE)**

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 431 um prófanir (2016). Með húðætingu er átt við varanlega skemmd í húð, sem birtist sem sýnilegt drep sem nær í gegnum húðþekjuna og niður í leðurhúðina, eftir að prófunaríðefni hefur verið borið á hana, samkvæmt skilgreiningu í hnattsamræmdu kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK) (1. heimild) og reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun (reglugerðin um flokkun, merkingu og pökkun) <sup>(1)</sup>. Þessi uppfærða prófunaraðferð B.40a felur í sér prófun í glasi sem gerir kleift að greina óætandi og ætandi efni og blöndur í samræmi við hnattsamræmt kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK-SP) og reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun. Hún gefur einnig færi á undirflokkun ætandi efna að hluta til.
2. Mat á ætingarmætti íðefna hefur oftast falið í sér notkun tilraunadyra (prófunaraðferð B.4, sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 404 um prófanir, upphaflega samþykkt árið 1981 og endurskoðuð árin 1992, 2002 og 2015) (2. heimild). Auk fyrirliggjandi prófunaraðferðar B.40a hafa tvær aðrar prófunaraðferðir í glasi til prófunar á ætingarmætti íðefna verið fullgiltar og samþykktar sem prófunaraðferð B.40 (sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 430 um prófanir) (3. heimild) og prófunaraðferð B.65 (sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 435 um prófanir) (4. heimild). Enn fremur hefur prófunaraðferð B.46 í glasi (sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 439 um prófanir) (5. heimild) verið samþykkt fyrir prófun á húðertingarmætti. Í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunar um samþættar aðferðir við prófun og mat varðandi húðætingu og húðertingu er lýst nokkrum einingum sem samflokka upplýsingaveitur og greiningartæki, og i. veittar leiðbeiningar um hvernig skal samþætta og nota fyrirliggjandi prófunargögn og önnur gögn til að meta húðertingar- og ætingarmátt íðefna, og ii. lagðar til nálganir þegar þörf er á frekari prófunum (6. heimild).
3. Þessi prófunaraðferð varðar húðætingu sem endapunktur með tilliti til heilbrigðis manna. Í henni er notuð endurgerð húðþekja manns (sem er fengin úr óummynduðum hrynisfrumum manns) sem líkir nákvæmlega eftir vefjafræðilegum, formfræðilegum, lífefnafræðilegum og lífeðlisfræðilegum eiginleikum efri hluta mannshúðar, þ.e. húðþekjunnar. Samsvarandi OECD-viðmiðunarreglu um prófanir var upphaflega samþykkt árið 2004 og uppfærð árið 2013 til að hún næði yfir fleiri prófunaraðferðir þar sem líkön með endurgerðri húðþekju manns eru notuð og þann möguleika að nota aðferðirnar til að styðja undirflokkun ætandi íðefna, og uppfærð árið 2015 til að vísa til leiðbeiningarskjalsins um samþættar aðferðir við prófun og mat (IATA) og innleiða notkun annarrar aðferðar til að mæla lífvænleika.
4. Þessi prófunaraðferð nær yfir fjögur fullgilt líkön með endurgerðri húðþekju manns sem eru fánleg á almennum markaði. Forfullgildingarrannsóknir (7. heimild), sem fylgt er eftir með formlegri fullgildingarrannsókn til að meta húðætingu (8.–10. heimild), hafa verið framkvæmdar fyrir tvö þessara prófunarlíkana sem eru fánleg á almennum markaði, EpiSkin™ Standard Model (SM) og EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (sem í eftirfarandi texta eru kallaðar fullgiltar viðmiðunaraðferðir). Niðurstöður úr þeim rannsóknum urðu til þess að mælt var með því að fullgiltu viðmiðunaraðferðirnar tvær, sem getið er hér að ofan, yrðu notaðar í eftirlitsskyni til að greina ætandi efni (C) frá óætandi efnum (NC) og að EpiSkin™ yrði auk þess notuð til að styðja undirflokkun ætandi efna (13.–15. heimild). Tvö önnur prófunarlíkön til rannsóknar á húðætingu í glasi með endurgerðri húðþekju manns, sem eru fánleg á almennum markaði, hafa sýnt svipaðar niðurstöður og fullgiltu viðmiðunaraðferðin EpiDerm™ samkvæmt fullgildingu byggðri á nothæfisstöðlum (16.–18. heimild). Um er að ræða SkinEthiC™ RHE <sup>(2)</sup> og epiCS® (áður nefnt EST-1000) sem einnig er unnt að nota í eftirlitsskyni til að greina ætandi efni frá óætandi efnum (19. og 20. heimild). Rannsóknir eftir fullgildingu, sem framleiðendur líkansins með endurgerðri húðþekju manns (RhE) framkvæmdu á árunum 2012–2014 með endurbættari aðferðarlýsingu sem leiðrétti truflanir af völdum ósértækrar afoxunar MTT vegna prófunaríðefnanna, bættu hæfni til að greina á milli ætandi og óætandi efna og til að styðja undirflokkun ætandi efna (21. og 22. heimild). Frekari tölfræðilegar greiningar á gögnum eftir fullgildingu, sem er aflað með EpiDerm™ SCT, SkinEthiC™ RHE og EpiCS®, hafa verið gerðar til að greina önnur spálíkön sem bættu spágetu að því er varðar undirflokkun (23. heimild).

<sup>(1)</sup> Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1272/2008 frá 16. desember 2008 um flokkun, merkingu og pökkun efna og blandna, um breytingu og niðurfellingu á tilskipunum 67/548/EBE og 1999/45/EB og um breytingu á reglugerð (EB) nr. 1907/2006 (Stjtuð. ESB L 353, 31.12.2008, bls. 1).

<sup>(2)</sup> Skammstöfunin RhE (= endurgerð húðþekja manns) er notuð fyrir öll líkön sem byggja á RhE-tækni. Skammstöfunin RHE sem er notuð í tengslum við SkinEthiC™ líkanið táknar það sama en er skrifað með hástöfum þar eð hún er hluti heitis þessarar tilteknu prófunaraðferðar eins og hún er sett á markað.

5. Áður en hægt er að nota tillagða samsvarandi eða breytta prófunaraðferð *í glasi* með endurgerðri húðþekju manns í eftirlitsskyni, aðrar en fullgiltu viðmiðunaraðferðirnar, skal ákvarða áreiðanleika hennar, gildi (nákvæmni) og takmarkanir miðað við tillagða notkun til að tryggja að hún sé samsvarandi fullgiltu viðmiðunaraðferðunum, í samræmi við kröfurnar í nothæfisstöðlunum (24. heimild), sem settar eru fram í samræmi við meginreglur leiðbeiningarskjals Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 34 (25. heimild). Gagnkvæma samþykkt gagna er aðeins hægt að tryggja eftir að búið er að endurskoða og fella inn í samsvarandi viðmiðunarreglu um prófanir allar tillagðar, nýjar eða uppfærðar prófunaraðferðir samkvæmt nothæfisstöðlunum. Prófunarlíkönin, sem sú viðmiðunarreгла um prófanir nær yfir, er unnt að nota til að uppfylla kröfur landa um niðurstöður úr prófunaraðferðum *í glasi* á húðætingu og njóta um leið góðs af gagnkvæmri samþykkt gagna.

#### SKILGREININGAR

6. Skilgreiningar, sem eru notaðar, eru gefnar upp í 1. viðbæti.

#### ATRÍÐI SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

7. Þessi prófunaraðferð gerir kleift að sanngreina óætandi og ætandi efni og blöndur í samræmi við hnattsamræmt kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum og reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun. Þessi prófunaraðferð styður enn frekar undirflokkun ætandi efna og blandna í valkvæðan undirundirflokk 1A í samræmi við HSK SP (1. heimild) sem og samsetningu undirflokka 1B og 1C (21.–23. heimild). Þessi prófunaraðferð er takmörkuð að því leyti að hún gerir ekki kleift að greina á milli húðætandi efna í undirundirflokk 1B og undirundirflokk 1C í samræmi við HSK SP og reglugerðina um flokkun, merkingu og pökkun, vegna takmarkaðs fjölda vel þekktra ætandi íðefna í undirflokk 1C sem eru húðætandi *í lífi*. Með prófunarlíkönunum EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE og epiCS® er hægt að undirflokkja (þ.e. greina á milli 1A og 1B/1C og óætandi efna (NC)).
8. Margvísleg íðefni, sem eru aðallega stök efni, hafa verið prófuð við fullgildinguna til stuðnings prófunarlíkönunum sem þessi prófunaraðferð nær yfir þegar þau eru notuð til greiningar á óætandi og ætandi efnum; gagnasafn fullgildingarrannsóknarinnar, byggt á athugunum, náði yfir 60 íðefni sem ná yfir margs konar íðefnaflokka (8.–10. heimild). Hönnuðir prófunaraðferðarinnar gerðu prófun til að sýna fram á næmi, sértæki, nákvæmni og samanburðarnákvæmni greiningarinnar innan rannsóknarstofu að því er varðar undirflokkun og Efnahags- og framfarastofnunin fór yfir niðurstöðurnar. Á grundvelli fyrirbyggjandi heildargagna er prófunaraðferðin nothæf fyrir vítt svið efnaflokka í ýmsu eðlisástandi, þ.m.t. vökva, hálföst efni, föst efni og vaxkennd efni. Vökvarnir mega vera vatnskenndir eða ekki vatnskenndir og föstu efnin mega vera uppleysanleg eða óleysanleg í vatni. Föstu efnin skulu möluð í fínt duft áður en þau eru borin á, ef þess er nokkur kostur, en engin önnur formeðhöndlun á sýninu er nauðsynleg. Í tilvikum þar sem unnt er að sýna fram á að prófunarlíkönin sem þessi prófunaraðferð nær yfir séu ekki nothæf fyrir tiltekinn flokk prófunariðefna skal ekki nota þau fyrir þann tiltekna flokk prófunariðefna. Þar sem þessi prófunaraðferð hentar efnum telst hún að auki henta blöndum. Þar eð blöndur ná yfir breitt svið flokka og samsetninga og sem stendur eru aðeins takmarkaðar upplýsingar fyrirbyggjandi um prófanir á blöndum skal þó, í þeim tilvikum þar sem unnt er að sýna fram á ónothæfi prófunaraðferðarinnar varðandi tiltekinn flokk af blöndum (t.d. áætlun fylgt eins og mælt er með í 18. heimild), ekki nota prófunaraðferðina fyrir þann tiltekna flokk blandna. Áður en þessi aðferð til prófunar á blöndu, sem er framkvæmd til að fá gögn sem fyrirhugað er að nota í eftirlitsskyni, er notuð skal skoðað hvort, og þá af hverju, hún gæti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi. Ekki er þörf á slíkri skoðun ef prófun á blöndunni er krafa af hálfu eftirlitsyfirvalda. Ekki er enn búið að meta lofttegundir og úðafni í fullgildingarrannsóknnum (8.–10. heimild). Þó að það sé hugsanlegt að hægt sé að prófa lofttegundir og úðafni með tækninni sem notar endurgerða húðþekju manns er ekki hægt að prófa þau með núverandi prófunaraðferð.
9. Prófunariðefni sem gleypa ljós á sama sviði og MTT-formasan og prófunariðefni sem geta afoxað líflitinn MTT beint (í MTT-formasan) geta truflað mælingar á lífvænleika vefs og þörf er á aðlöguðum samanburði til leiðréttingar. Gerð aðlagðs samanburðar sem kann að vera þörf á fer eftir því hvers konar truflun prófunariðefnið veldur og eftir aðferðinni sem er notuð til að mæla MTT-formasan (sjá 25.–31. lið).

10. Þó að þessi prófunaraðferð veiti ekki nægilegar upplýsingar um húðertingu skal það tekið fram að með prófunaraðferð B.46 eru einkum áhrif húðertingar á heilbrigði rannsókuð *í glasi* og hún byggist á sama prófunarkerfi með endurgerðri húðþekju manns, þótt notuð sé önnur aðferðarlýsing (5. heimild). Fyrir fullt mat á staðbundnum áhrifum á húð eftir váhrif á húð í eitt skipti er mælt með því að fletta upp í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um samþættar aðferðir við prófun og mat (6. heimild). Þessi nálgun með samþættum aðferðum við prófun og mat nær yfir prófanir *í glasi* á húðætingu (eins og lýst er í þessari prófunaraðferð) og húðertingu áður en metið er hvort gera skuli prófanir á lifandi dýrum. Viðurkennt er að notkun mannhúðar er með fyrirvara um siðferðilega þætti og skilyrði á lands- og alþjóðavísu.

## MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

11. Prófunaríðefnið er borið staðbundið á þrívítt líkan með endurgerðri húðþekju manns sem samanstendur af óumbreyttum hrynifrumum manns sem hafa verið ræktaðar til að mynda marglaga, mjög aðgreint líkan af húðþekju manns. Líkanið samanstendur af grunn-, þyrni- og kornalagi og marglaga hornlagi sem í eru, milli frumna, fitulagabynnur sem eru dæmigerðar fyrir helstu flokka lípíða, hliðstæðum þeim sem finnast *í lifi*.
12. Prófunaraðferð með endurgerðri húðþekju manns byggist á þeirri forsendu að ætandi íðefni geti gengið inn í hornlag húðþekjunnar með flæði eða rofi og séu frumudrepanði fyrir frumur í undirliggjandi lögum. Lífvænleiki frumna er mældur með umbreytingu með ensímum á líflitnum MTT [3-(4,5-dímetyljíasól-2-ýl)-2,5-dífenýltetrasólíumbromíð, þíasólýl-blár-tetrasólíumbromíð, CAS-nr. 298-93-1] í blátt formasansalt sem er mælt megindlega eftir útdrátt úr vefjum (27. heimild). Ætandi íðefni eru greind eftir hæfni þeirra til að minnka lífvænleika frumna niður fyrir skilgreind viðmiðunargildi (sjá 35. og 36. lið). Aðferð til prófunar á húðætingu með endurgerðri húðþekju manns hefur sýnt sig að vera áreiðanleg aðferð *í lifi* til að spá fyrir um húðætandi áhrif hjá kaninum sem metin eru samkvæmt prófunaraðferð B.4 (2. heimild).

## SÝNT FRAM Á HÆFNI

13. Áður en fullgiltu prófunarlíkönin fjögur með endurgerðri húðþekju manns, sem fylgja þessari prófunaraðferð, eru tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur sýna fram á tæknilega hæfni sína með því að flokka með réttum hætti hæfnisefni tólf sem tilgreind eru í töflu 1. Ef aðferð er notuð til undirflokkunar skal einnig sýna fram á rétta undirundirflokkun. Ef efni á skránni er ekki tiltækt, eða þegar slíkt er réttlætjanlegt, er heimilt að nota annað efni ef fullnægjandi tilvísunargögn *í lifi* og *í glasi* liggja fyrir um þau ( t.d. af skránni yfir viðmiðunaráðefni (24. heimild)) að því tilskildu að sömu valviðmiðunum, eins og lýst er í töflu 1, sé beitt.

Tafla 1

Skrá yfir hæfnisefni <sup>(1)</sup>

Efni	CAS-númer	Íðefnaflokkur <sup>(2)</sup>	Undirflokkur HSK/SP eða reglugerðar (EB) nr. 1272/2008 byggt á niðurstöðum úr prófun <i>í lifi</i> <sup>(3)</sup>	Undirflokkur fullgiltar viðmiðunaraðferðar byggt á niðurstöðum úr prófun <i>í glasi</i> <sup>(4)</sup>	MTT-afoxari <sup>(5)</sup>	Eðlisástand
Undirundirflokkur 1A ætandi efni <i>í lifi</i>						
Brómóediksýra	79-08-3	Lífræn sýra	1A	(3) 1A	—	S
Bórtríflúoríðdíhýdrat	13319-75-0	Ólífræn sýra	1A	(3) 1A	—	L
Fenól	108-95-2	Fenól	1A	(3) 1A	—	S
Díklóróasetýlklóríð	79-36-7	Rafsækin	1A	(3) 1A	—	L
Samsetning ætandi efna <i>í lifi</i> í undirundirflokkum 1B og 1C						
Glyóxýlsýrumónóhýdrat	563-96-2	Lífræn sýra	1B og 1C	(3) 1B og 1C	—	S



Efni	CAS-númer	Íðefnaflokkur <sup>(2)</sup>	Undirflokkur HSK/SP eða reglugerðar (EB) nr. 1272/2008 byggt á niðurstöðum úr prófun í lífi <sup>(3)</sup>	Undirflokkur fullgiltar viðmiðunaraðferðar byggt á niðurstöðum úr prófun í glasi <sup>(4)</sup>	MTT-afoxari <sup>(5)</sup>	Eðlisástand
------	-----------	------------------------------	--	---	----------------------------	-------------

## Undirundirflokkur 1A ætandi efni í lífi

Mjólkursýra	598-82-3	Lífræn sýra	1B og 1C	(3) 1B og 1C	—	L
Etanólamín	141-43-5	Lífrænn basi	1B	(3) 1B og 1C	Y	Seigfljótan di
Saltsýra (14,4%)	7647-01-0	Ólífræn sýra	1B og 1C	(3) 1B og 1C	—	L

## Óætandi efni í lífi

Fenetylbrómíð	103-63-9	Rafsækin	NC	(3) NC	Y	L
4-amínó-1,2,4-tríasól	584-13-4	Lífrænn basi	NC	(3) NC	—	S
4-(metýlþíó)-bensaldehýð	3446-89-7	Rafsækin	NC	(3) NC	Y	L
Lárínsýra	143-07-7	Lífræn sýra	NC	(3) NC	—	S

Skammstafanir: CASRN = CAS-númer, VRM = fullgilt viðmiðunaraðferð, NC = óætandi, Y = já, S = fast efni, L = vökví

- (1) Hæfnisefni, sem voru fyrst flokkuð í annars vegar ætandi og hins vegar óætandi, síðan eftir ætandi undirundirflokkum og loks eftir íðefnaflokkum, voru valin úr efnunum sem eru notuð í fullgildingarránsóknum Evrópumíðstöðvar um fullgildingu staðgönguáðferða á EpiSkin™ og EpiDerm™ (8.–10. heimild) og úr rannsóknum eftir fullgildingu sem byggjast á gögnum frá hönnuðum EpiSkin™ (22. heimild), EpiDerm™, SkinEthic™ og epiCS® (23. heimild). Nema annað sé tekið fram voru efnin prófuð á því hreinleikastigi sem þau höfðu þegar þau voru keypt á almennum markaði (8. og 10. heimild). Valið innihélt, að því marki sem hægt var, efni sem: i. eru dæmigerð fyrir svörunarsvið ætingar (t.d. óætandi, frá lífelli til mikillar ætingar) sem fullgiltu viðmiðunaraðferðir geta mælt eða spáð fyrir um, ii. eru dæmigerð fyrir íðefnaflokkana sem eru notaðir í fullgildingarránsóknum, iii. hafa vel skilgreinda efnafræðilega byggingu, iv. kalla fram samanburðarmákvæmar niðurstöður í fullgiltu viðmiðunaraðferðinni, v. kalla fram endanlegar niðurstöður í viðmiðunaraðferðinni í lífi, vi. eru fánleg á markaði og vii. þeim fylgir ekki óásættanlegur förgunarkostnaður.
- (2) Íðefnaflokkur, samkvæmt Barratt *et al.* (8. heimild).
- (3) Samsvarandi þökkunarflokkar SP eru I, II og III, eftir því sem við á, fyrir 1A, 1B og 1C samkvæmt HSK SP/reglugerðinni um flokkun, merkingu og þökkun.
- (4) Spárnar úr fullgiltu viðmiðunaraðferðunum í glasi, sem greint er frá í þessari töflu, eru fengnar með EpiSkin™ og EpiDerm™ prófunarlíkönunum (fullgiltar viðmiðunaraðferðir) í prófunum sem hönnuðir prófunaraðferðarinnar framkvæmdu eftir fullgildingu.
- (5) Gildi fyrir lífvænleika sem fengust í fullgildingarránsóknum Evrópumíðstöðvar um fullgildingu staðgönguáðferða á húðætingu voru ekki leiðrétt að því er varðar beina afoxun MTT (í fullgildingarránsóknum voru ekki gerðir samanburðir með dauðum vef). Gögnin eftir fullgildingu, sem hönnuðir prófunaraðferðarinnar öfluðu og eru sett fram í þessari töflu, fengust þó með aðlöguðum samanburðum (23. heimild).

14. Mælt er með því að notandinn sannprófi tálmaeiginleika vefjanna eftir viðtöku þeirra, samkvæmt leiðbeiningum frá framleiðanda líkansins með endurgerðri húðþekju manns, til að sýna fram á hæfni. Þetta er sérstaklega mikilvægt ef vefirnir eru fluttir um langan veg eða flutningurinn tekur langan tíma. Þegar prófunaraðferð hefur verið notuð á árangursríkan hátt og sýnt hefur verið fram á hæfni í notkun hennar þá er ekki nauðsynlegt að sannprófa hana að staðaldri. Ef prófunaraðferð er notuð að staðaldri er þó mælt með að því að haldið sé áfram að meta tálmaeiginleikana með reglulegu millibili.

## VERKFERLI

15. Eftirfarandi er almenn lýsing á þáttum og tilhögun prófunarlíkananna með endurgerðri húðþekju manns til að meta húðætingu sem þessi prófunaraðferð nær yfir. Líkönin með endurgerðri húðþekju manns sem viðurkennd eru sem vísindalega gild til notkunar innan þessarar prófunaraðferðar, þ.e. líkönin EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE og epiCS® (16., 17., 19. og 28.–33. heimild), fást á almennum markaði. Staðlaðar verklagsreglur fyrir þessi fjögur líkön með endurgerðri húðþekju manns eru tiltækar (34.–37. heimild) og helstu þættir prófunaraðferðarinnar eru teknir saman í 2. viðbæti. Mælt er með því að fletta upp í viðkomandi stöðluðum verklagsreglum þegar eitt af líkönunum er innleitt og notað á rannsóknarstofu. Prófun með prófunarlíkönunum fjórum með endurgerðri húðþekju manns, sem þessi prófunaraðferð nær yfir, skal uppfylla eftirfarandi:

## ÞÆTTIR Í PRÓFUNARAÐFERÐ MEÐ ENDURGERÐRI HÚÐÞEKJU MANNS

**Almennar aðstæður**

16. Nota skal óumbreyttar hyrnisfrumur manns til að endurgera þekjuna. Í henni skulu vera mörg lög af lífvænlegum þekjufrumum (grunnlag, þyrnilag, kornalag) undir virku hornlagi. Hornlagið skal vera marglaga með grundvallarfitusniði til að veita virkan, traustan tálma gegn því að frumudrepani viðmiðunariðefni, t.d. natríumdódekýlsúlfat eða Triton X-100, gangi hratt inn í það. Sýna skal fram á tálmaþvirkni og hana má meta, annaðhvort með því að ákvarða við hvaða styrk viðmiðunariðefni dregur úr lífvænleika vefjanna um 50% (IC<sub>50</sub>) eftir fastan váhrifatíma eða með því að ákvarða hve langan váhrifatíma þarf til að draga úr lífvænleika frumna um 50% (ET<sub>50</sub>) þegar viðmiðunariðefnið er sett á í tilteknum, föstum styrk (sjá 18. lið). Afmörkunareiginleikar líkansins skulu koma í veg fyrir að efni flytjist um hornlagið að lífvænlegum vef en það myndi skerða getu líkansins með endurgerðri húðþekju manns til að lýsa váhrifum á húð. Líkanið með endurgerðri húðþekju manns skal vera laust við smit af völdum baktería, veira, berfryminga eða sveppa.

**Virkniaðstæður***Lífvænleiki*

17. Greiningin sem er notuð til að magngreina lífvænleika vefja er greining með MTT-lit (27. heimild). Lífvænlegar frumur í vefjalíkani með endurgerðri húðþekju manns afoxa líflitinn MTT í útfellingu af bláu MTT-formasani sem er svo dregin úr vefnum með ísóprópanóli (eða svipuðum leysi). Ljósþéttni hreins útráttarleysis skal vera nægilega lítil, þ.e. < 0,1. Hægt er að magngreina útdregið MTT-formasan með annað hvort staðalgleypni (ljósþéttni) eða litrófsmælingaraðferð með háþrýsti/-útháþrýstivöskviljun (e. *HPLC/UPLC-spectrophotometry procedure*) (38. heimild). Notendur líkans með endurgerðri húðþekju manns skulu ganga úr skugga um að hver framleiðslulota notaðs líkans með endurgerðri húðþekju manns uppfylli skilgreindar viðmiðanir fyrir neikvæðan samanburð. Hönnuður eða birgir líkansins með endurgerðri húðþekju manns skal staðfesta ásættanlegt svið (efri og neðri mörk) fyrir ljósþéttigildi neikvæða samanburðarins. Ásættanlegt svið fyrir ljósþéttigildi neikvæða samanburðarins fyrir fullgiltu prófunarlíkönin fjögur með endurgerðri húðþekju manns, sem þessi prófunaraðferð nær yfir, er tilgreint í töflu 2. Notandi litrófsmælingar með háþrýsti/-útháþrýstivöskviljun skal nota ljósþéttisvið fyrir neikvæðan samanburð, sem er tilgreint í töflu 2, sem samþykktarviðmiðun fyrir neikvæða samanburðinn. Skjalfest skal að vefirnir, sem eru meðhöndlaðir með neikvæðum samanburði, séu stöðugir í ræktun (gefi svipaðar ljósþéttimælingar) meðan váhrifatímabil stendur yfir.

Tafla 2

**Ásættanlegt svið ljósþéttigilda neikvæðs samanburðar fyrir gæðaeftirlit með framleiðslulotum**

	Neðri ásættanleikamörk	Efri ásættanleikamörk
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthiC™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

*Tálmavirkni*

18. Hornlagið og samsetning lípíðanna í því ætti að nægja til að koma í veg fyrir að tiltekin frumudrepani viðmiðunariðefni (t.d. natríumdódekýlsúlfat eða Triton X-100) gangi hratt inn í það, miðað við IC<sub>50</sub> eða ET<sub>50</sub> (tafla 3). Hönnuður eða seljandi líkansins með endurgerðri húðþekju manns skal sýna fram á tálmaþvirkni hverrar framleiðslulotu líkansins með endurgerðri húðþekju manns sem er notað þegar vefirnir eru afhentir endanlegum notanda (sjá 21. lið).

*Formfræði*

19. Gera skal vefjafræðilega rannsókn á líkaninu með endurgerðri húðþekju manns til að sýna fram á að bygging hennar sé marglaga og lík húðþekju manns sem inniheldur grunnlag, þyrnilag, kornalag og hornlag húðar og sýnir fitusnið sem svipar til fitusniðs í húðþekju manns. Hönnuður eða seljandi líkansins með endurgerðri húðþekju manns skal veita upplýsingar um vefjafræðilega rannsókn á hverri framleiðslulotu líkansins með endurgerðri húðþekju manns þar sem sýnt er fram á viðeigandi formfræði vefjanna þegar vefirnir eru afhentir endanlegum notanda (sjá 21. lið).

*Samanburðarnákvæmni*

20. Notendur prófunaraðferðarinnar skulu sýna fram á samanburðarnákvæmni prófunaraðferðanna til lengri tíma með jákvæðum og neikvæðum samanburðum. Enn fremur skal eingöngu nota prófunaraðferðina ef hönnuður eða birgir líkansins með endurgerðri húðþekju manns leggur fram gögn sem sýna fram á samanburðarnákvæmni til lengri tíma með ætandi og óætandi íðefnum úr t.d. skránni yfir hæfnisefni (tafla 1). Ef um er að ræða notkun prófunaraðferðar til undirflokunar skal einnig sýna fram á samanburðarnákvæmni að því er varðar undirflokun.

*Gæðaeftirlit*

21. Líkanið með endurgerðri húðþekju manns skal eingöngu notað ef hönnuður eða birgir sýnir fram á að hver framleiðslulota líkana með endurgerðri húðþekju manns, sem er notuð, uppfylli skilgreindar viðmiðanir fyrir afhendingu framleiðslunnar en af þeim skipta *lífvenleiki* (17. liður), *tálmavirkni* (18. liður) og *formfræði* (19. liður) mestu máli. Notendur prófunaraðferðarinnar fá gögn um þau atriði afhent svo þeir geti haft þær upplýsingar með í prófunarskýrslunni. Aðeins er hægt að samþykkja niðurstöður, sem fást með vefjalotum sem eru viðurkenndar samkvæmt gæðaeftirliti, sem áreiðanlegar til að spá fyrir um ætingarflokkun. Hönnuður eða birgir líkansins með endurgerðri húðþekju manns staðfestir ásætlanlegt svið (efri og neðri mörk) fyrir IC50 eða ET50. Ásætlanlegt svið fyrir fullgiltu aðferðirnar fjórar er gefið í töflu 3.

*Tafla 3***Gæðaeftirlitsviðmiðanir fyrir afhendingu framleiðslulota**

	Neðri ásætlanleikamörk	Efri ásætlanleikamörk
EpiSkin™ (SM) (18 klukkustunda meðhöndlun með natríumdódekýlsúlfati) (33. heimild)	IC <sub>50</sub> = 1,0 mg/ml	IC <sub>50</sub> = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1% Triton X-100) (34. heimild)	ET50 = 4,0 klst.	ET50 = 8,7 klst.
SkinEthiC™ RHE (1% Triton X-100) (35. heimild)	ET50 = 4,0 klst.	ET50 = 10,0 klst.
epiCS® (1% Triton X-100) (36. heimild)	ET50 = 2,0 klst.	ET50 = 7,0 klst.

**Prófunar- og samanburðariðefni sett á**

22. Nota skal a.m.k. tvö samhliða vefjasýni fyrir hvert prófunariðefni og samanburðinn fyrir hvert váhrifatímabil. Nota skal nægilegt magn prófunariðefnisins, bæði þegar um er að ræða fljótandi og föst íðefni, til að þekja yfirborð húðþekjunnar jafnt en þó ekki ótakmarkaðan skammt, þ.e. nota skal minnst 70 µl/cm<sup>2</sup> eða 30 mg/cm<sup>2</sup>. Með hliðsjón af því um hvaða líkan er að ræða skal væta yfirborð húðþekjunnar með afjönuðu eða eimuðu vatni áður

en föst íðefni eru sett á til að tryggja góða snertingu prófunaríðefnisins við yfirborð húðþekjunnar (34.–37. heimild). Prófa skal föst efni í fíngerðu duftformi þegar því verður við komið. Notkunaraðferðin skal hæfa prófunaríðefninu (sjá t.d. 34–37. heimild). Í lok váhrifatímabils skal skola prófunaríðefnið vandlega af húðþekjunni með vatnskenndri jafnalausn eða 0,9% NaCl. Með hliðsjón af því hvert af fullgiltu prófunarlíkönunum fjórum með endurgerðri húðþekju manns er notað eru tvö eða þrjú váhrifatímabil notuð fyrir hvert prófunaríðefni (fyrir öll fjögur fullgiltu líkönin með endurgerðri húðþekju manns: 3 mín. og 1 klst.; fyrir EpiSkin™ viðbótarváhrifatími sem nemur 4 klst.). Með hliðsjón af prófunarlíkaninu með endurgerðri húðþekju manns sem er notað og váhrifatímabili sem er metið getur ræktunarhiti meðan á váhrifum stendur verið á milli stofuhita og 37 °C.

23. Nota skal samskeiða neikvæðan og jákvæðan samanburð í hverri keyrslu til að sýna fram á að lífvænleiki (með neikvæða samanburðinum), tálmaþvirkni og næmi vefjanna, sem af henni leiðir (með jákvæða samanburðinum), séu innan skilgreinds, rannsóknarsögulegs ásættanleikasviðs. Tillögð íðefni fyrir jákvæðan samanburð eru ísedik eða 8N KOH með hliðsjón af því líkani með endurgerðri húðþekju manns sem er notað. Það skal tekið fram að 8N KOH er beinn MTT-afoxari og þörf gæti verið á aðlöguðum samanburðum eins og lýst er í 25. og 26. lið. Mælt er með 0,9% (massi miðað við rúmmál) NaCl eða vatni fyrir neikvæða samanburði.

#### Mælingar á lífvænleika frumna

24. Greiningu með MTT, sem er megindleg aðferð, skal nota til að mæla lífvænleika frumna í þessari prófunaraðferð (27. heimild). Vefjasýnið er sett í MTT-lausn í hæfilegum styrk (0,3 eða 1 mg/ml) í 3 klukkustundir. Útfellt, blátt formasan er svo dregið út úr vefnum með leysi (t.d. ísóprópanóli, súru ísóprópanóli) og formasanstyrkurinn er mældur með því að ákvarða ljóspéttni við 570 nm á síukvarðabili sem er að hámarki  $\pm 30$  nm eða með litrófsmælingaraðferð með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun (sjá 30. og 31. lið) (38. heimild).
25. Prófunaríðefni geta truflað greiningu með MTT, annað hvort með beinni afoxun MTT í blátt formasan og/eða með litatruflun ef prófunaríðefnið gleypir í sig, annað hvort frá náttúrunnar hendi eða vegna meðhöndlunar, á sama ljóspéttnisviði og formasan ( $570 \pm 30$  nm, aðallega blá og fjólublá íðefni). Nota skal viðbótarsamanburði til að greina og leiðrétta hugsanlega truflun þessara prófunaríðefna, s.s. samanburðinn fyrir ósértæka afoxun MTT og samanburðinn fyrir ósértæka litun (NSC) (sjá 26. og 30. lið). Þetta skiptir einkum máli þegar tiltekið prófunaríðefni er ekki skolað algerlega af vefnum eða þegar það gengur inn í húðþekjuna og finnst því í vefjunum þegar prófun á lífvænleika MTT er gerð. Í stöðluðu verklagsreglunum fyrir prófunarlíkönin (34.–37. heimild) er ítarleg lýsing á því hvernig unnt er að leiðrétta beina afoxun MTT og truflanir frá litunarefnum.
26. Til að greina beina MTT-afoxara skal bæta hverju prófunaríðefni út í nýtilreitt MTT-æti (34.–37. heimild). Ef MTT-blandan sem inniheldur prófunaríðefnið verður blá/fjólublá er gert ráð fyrir að prófunaríðefnið afoxi MTT-litinn beint og framkvæma skal frekari athuganir á virkni á dauða húðþekju, óháð því hvort notuð er stöðluð ljóspéttnigleypnimæling eða litrófsmæliaðferð með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun. Í þessari viðbótarathugun á virkni er notaður dauður vefur sem hefur einungis eftirstandandi efnaskiptavirkni en gleypir í sig svipað magn prófunaríðefnis og lífvænlegur vefur. Hvert íðefni sem afoxar MTT er sett á a.m.k. tvö samhlíða sýni úr dauðum vef í hverjum váhrifatíma, sem gangast undir alla prófunina á húðætingu. Raunverulegur lífvænleiki vefjar er síðan reiknaður út sem hundraðshlutfall lífvænleika vefjar, fengið með lifandi vef sem var látinn verða fyrir váhrifum frá MTT-afoxara, að frádregnu hundraðshlutfalli ósértækrar afoxunar MTT sem er fengið með dauðum vef sem var látinn verða fyrir váhrifum af sama MTT-afoxara, reiknað út í samanburði við neikvæða samanburðinn sem er keyrður samskeiða prófuninni sem er leiðrétt (%NSMTT).
27. Til að greina hugsanlega truflun af lituðum prófunaríðefnum eða prófunaríðefnum sem litast þegar þau komast í snertingu við vatn eða ísóprópanól og til að ákvarða hvort þörf sé á viðbótarsamanburðum skal framkvæma tíðnirófsgreiningu prófunaríðefnis í vatni (umhverfi á meðan á váhrifum stendur) og/eða ísóprópanóli (útráttarlausn). Ef prófunaríðefnið í vatni og/eða ísóprópanóli gleypir í sig ljós á sviðinu  $570 \pm 30$  nm, ætti að framkvæma frekari

samanburði með litgjöfum eða, að öðrum kosti, nota litrófsmælingu með háþrýsti/-útháþrýstivökvaskiljun, en í því tilviki er ekki þörf á þessum samanburði (sjá 30. og 31. lið). Þegar mæling á staðalgleypni (ljóspéttni) er gerð er hvert truflandi litaða prófunaríðefni sett á minnst tvö lífvænleg samhliða vefjasýni í hverjum váhrifatíma, sem gangast undir alla prófunina á húðætingu en eru ræktuð í æti í stað MTT-launsar á meðan á MTT-ræktunarþrepi stendur til að fá samanburð fyrir ósértæka litun (NSC<sub>lifandi</sub>). Samanburður NSC<sub>lifandi</sub> skal gerður samskeiða í hverjum váhrifatíma fyrir hvert litað prófunaríðefni (í hverri keyrslu) vegna eðlislægs líffræðilegs breytileika lifandi vefjar. Raunverulegur lífvænleiki vefjar er síðan reiknaður út sem hundradshlutfall lífvænleika vefjar, fengið með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum af truflandi prófunaríðefninu og ræktaður með MTT-laun, að frádregnu hundradshlutfalli ósértæktrar litunar, sem er fengið með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum af truflandi prófunaríðefninu og ræktaður í æti án MTT, sem er keyrður samskeiða prófuninni sem er leiðrétt (%NSC<sub>lifandi</sub>).

28. Að því er varðar prófunaríðefni sem sanngreint er að valdi bæði beinni afoxun MTT (sjá 26. lið) og litatruflun (sjá 27. lið), er þörf á þriðju gerð af samanburði, auk samanburðar fyrir ósértæka afoxun MTT og samanburðar NSC<sub>lifandi</sub> sem er lýst í undangengnum liðum, við mælingu á staðalgleypni (ljóspéttni). Þetta á yfirleitt við um dökkliðuð prófunaríðefni sem trufla greiningu með MTT (t.d. blár, fjólublár, svartur) þar eð eðlislægur litur þeirra hindrar mat á getu þeirra til beinnar afoxunar MTT, eins og lýst er í 26. lið. Þessi prófunaríðefni geta bundist bæði lifandi og dauðum vef og því getur samanburður með ósértækri afoxun MTT ekki eingöngu leiðrétt hugsanlega beina afoxun MTT af völdum prófunaríðefnisins heldur einnig litatruflun sem kemur til vegna bindingar prófunaríðefnis við dauðan vef. Þetta gæti leitt til tvöfaldrar leiðréttingar á litatruflun, þar eð samanburður NSC<sub>lifandi</sub> leiðréttir þegar litatruflun sem kemur til vegna bindingar prófunaríðefnisins við lifandi vef. Til að koma í veg fyrir mögulega tvöfalda leiðréttingu litatruflunar þarf að gera þriðja samanburðinn fyrir ósértæka litun með dauðum vef (NSC<sub>dauður</sub>). Í þessum viðbótarsamanburði er prófunaríðefnið sett á minnst tvö samhliða sýni úr dauðum vef í hverjum váhrifatíma, sem gangast undir allt prófunarferlið en eru ræktuð í æti í stað MTT-launsar á meðan á MTT-ræktunarþrepi stendur. Stakur samanburður NSC<sub>dauður</sub> nægir fyrir hvert prófunaríðefni, óháð fjölda óháðra prófana/keyrslna sem gerðar eru, en skal gerður samskeiða samanburði með ósértækri afoxun MTT og, ef unnt er, með sömu vefjalotu. Raunverulegur lífvænleiki vefjar er síðan reiknaður út sem hundradshlutfall lífvænleika vefjar, fengið með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum af prófunaríðefninu, að frádregnu %NSMTT, að frádregnu %NSC<sub>lifandi</sub>, að viðbættu hundradshlutfalli ósértæktrar litunar sem er fengið með dauðum vef sem er látinn verða fyrir váhrifum af truflandi prófunaríðefninu og ræktaður í æti án MTT, reiknað út í samanburði við neikvæða samanburðinn sem er keyrður samskeiða prófuninni sem er leiðrétt (%NSC<sub>dauður</sub>).
29. Mikilvægt er að taka mið af því að ósértæk afoxun MTT og ósértækar litatruflanir geta valdið því að aflestur vefjaútdráttar á litrófsmælinum verði ofan línuleikasviðs. Á þeim grundvelli skal hver rannsóknarstofa ákvarða línuleikasvið fyrir sinn litrófsmæli með MTT-formasani (CAS-númer 57360-69-7) af almennum markaði áður en prófun á prófunaríðefnum í eftirlitsskyni hefst. Einkum er mæling á staðalgleypni (ljóspéttni) með litrófsmæli viðeigandi til að meta beina MTT-afoxara og prófunaríðefni sem trufla litun þegar ljóspéttni vefjaútdráttar, sem fæst með prófunaríðefninu án leiðréttingar vegna beinnar afoxunar MTT og/eða litatruflunar, mælist innan línuleikasviðs litrófsmælisins eða þegar óleiðrétt hundradshlutfall lífvænleika sem er fengið með prófunaríðefninu skilgreinir það þegar sem ætandi efni (sjá 35. og 36. lið). Engu að síður skulu niðurstöður fyrir prófunaríðefni sem valda %NSMTT og/eða %NSC<sub>lifandi</sub> > 50% af neikvæða samanburðinum teknar með fyrirvara.
30. Að því er varðar lituð prófunaríðefni, sem samrýmast ekki mælingu á staðalgleypni (ljóspéttni) vegna of mikillar truflunar við greiningu með MTT, má nota staðgönguaðferðina litrófsmælingu með háþrýsti/-útháþrýstivökvaskiljun til að mæla MTT-formasan (sjá 31. lið) (37. heimild). Litrófsmælingakerfi með háþrýsti/-útháþrýstivökvaskiljun gerir kleift að skilja MTT-formasan frá prófunaríðefninu fyrir magnákvörðun (38. heimild). Af þessum sökum er ekki þörf á NSC<sub>lifandi</sub> eða NSC<sub>dauðum</sub> samanburði þegar litrófsmæling með háþrýsti/-útháþrýstivökvaskiljun er notuð, óháð íðefninu sem er prófað. Engu að síður skal nota samanburði fyrir ósértæka afoxun MTT ef grunur leikur á að prófunaríðefnið sé beinn afoxari MTT eða ef litur þess hamlar mati á getu til beinnar afoxunar MTT (eins og lýst er í 26. lið). Þegar litrófsmæling með háþrýsti/-útháþrýstivökvaskiljun er notuð til að mæla MTT-formasan er hundradshlutfall lífvænleika vefjar reiknað út sem hundradshlutfall toppflatarmáls MTT-formasans, sem fæst með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu, í samanburði við toppgildi MTT-formasans sem er fengið með samskeiða neikvæðum samanburði. Að því er varðar prófunaríðefni sem geta afoxað MTT beint er raunverulegur lífvænleiki vefjar reiknaður út sem hundradshlutfall lífvænleika vefjar sem fæst

með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu, að frádregnu %NSMTT. Að lokum skal tekið fram að ekki er unnt að meta beina afoxara MTT, sem geta einnig truflað litun, sem verða eftir í vefjum eftir meðhöndlun og afoxa MTT að svo miklu leyti að þeir leiða til ljóspéttni (með notkun staðlaðrar ljóspéttnimælingar) eða toppflatarmáls (með litrófsmælingu með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun) prófaðs vefjaútdráttar sem lendir utan línuleikasviðs litrófsmælisins, þó að ekki sé búist við að slíkt gerist nema í undantekningartilvikum.

31. Litrófsmælingu með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun má einnig nota með öllum gerðum prófunaríðefna (lituð, ólituð, efni sem afoxa MTT-litrefni og efni sem gera það ekki) til að mæla MTT-formasan (38. heimild). Vegna fjölbreytni litrófsmælingakerfa með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun skal sýna fram á hæfi litrófsmælingakerfisins með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun áður en það er notað til að magnreina MTT-formasan úr vefjaútdrætti með því að sýna að samþykktarviðmiðanirar séu uppfylltar fyrir staðlaða mælipætti fyrir hæfi, á grundvelli þeirra sem lýst er í leiðbeiningum Matvæla- og lyfjaeftirlits Bandaríkjanna fyrir iðnaðinn um fullgildingu lífgreiningaraðferða (38. og 39. heimild). Þessir helstu mælipættir og samþykktarviðmiðanirar þeirra eru sýnd í 4. viðbæti. Um leið og samþykktarviðmiðanirar, sem eru skilgreindar í 4. viðbæti, eru uppfylltar telst litrófsmælingakerfið með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun hæft til mælingar á MTT-formasani samkvæmt rannsóknarskilyrðunum sem lýst er í þessari prófunaraðferð.

#### **Viðmiðanir fyrir ásættanleika**

32. Í hverri prófunaraðferð þar sem fullgilt líkón með endurgerðri húðþekju manns eru notuð skulu vefir, sem eru meðhöndlaðir með neikvæða samanburðinum, sýna ljóspéttni sem endurspeglar gæði vefjanna, eins og lýst er í töflu 2, og skulu ekki vera undir rannsóknarsögulega fastsettum mörkum. Vefir sem eru meðhöndlaðir með jákvæða samanburðinum, þ.e. ísediki eða 8N KOH, skulu endurspegla getu vefja til að sýna svörun við ætandi íðefni við skilyrði prófunarlíkansins (sjá 2. viðbæti). Breytileikinn milli samhliða vefjasýna með prófunaríðefninu og/eða samanburðaríðefnum skal vera innan ásættanlegra marka krafanna fyrir hvert fullgilt líkan með endurgerðri húðþekju manns (sjá 2. viðbæti) (t.d. skal mismunurinn í breytileika milli þessara tveggja samhliða vefjasýna ekki fara yfir 30%). Ef annað hvort neikvæði eða jákvæði samanburðurinn í keyrslu lendir utan ásættanlegs sviðs telst keyrslan ekki hæf og skal hún endurtekin. Ef breytileiki prófunaríðefnis er utan skilgreinds sviðs skal endurtaka prófunina.

#### **Túlkun á niðurstöðum og spálíkan**

33. Nota skal ljóspéttnigildin, sem fást með hverju prófunaríðefni, til að reikna út lífvænleika í hundraðshlutum í samanburði við neikvæða samanburðinn sem er fastsettur við 100%. Ef litrófsmæling með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun er notuð er hundraðshlutfall lífvænleika reiknað út sem hundraðshlutfall toppflatarmáls MTT-formasans sem fæst með lifandi vef, sem er látinn verða fyrir váhrifum af prófunaríðefninu, í samanburði við toppgildi MTT-formasans sem er fengið með samskeiða neikvæðum samanburði. Þröskuldsgildi fyrir hundraðshluta lífvænleika frumna, sem greinir ætandi prófunaríðefni frá óætandi prófunaríðefnum (eða greinir milli mismunandi undirundirflokka ætandi efna), eru skilgreind hér fyrir neðan í 35. og 36. lið fyrir hvert prófunarlíkan sem þessi prófunaraðferð nær yfir og skulu notuð við túlkun á niðurstöðunum.

34. Stök prófunarkeyrsla á a.m.k. tveimur samhliða vefjasýnum ætti að nægja ef niðurstaðan gefur ótvíræða flokkun prófunaríðefnisins. Ef niðurstöður eru óvissar, t.d. ef ósamsvörun er í samhliða mælingum, má taka til athugunar að framkvæma aðra keyrslu, sem og þá þriðju ef ósamræmi er á milli niðurstaðna úr fyrstu keyrslunum tveimur.

35. Spálíkanið fyrir EpiSkin™-líkanið til prófunar á húðætingu (9., 34. og 22. heimild), sem tengist flokkunarkerfi HSK SP/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun, er sýnt í töflu 4:

Tafla 4

## Spálíkan EpiSkin™

Lífvænleiki mældur eftir váhrifatímupunktum (t=3, 60 og 240 mínútur)	Spá sem þarf að hafa í huga
< 35% eftir váhrif í 3 mín.	<b>Ætandi:</b> • Valkvæður undirundirflokkur 1A (*)
≥ 35% eftir váhrif í 3 mín. <b>OG</b> < 35% eftir váhrif í 60 mín. <b>EÐA</b> ≥ 35% eftir váhrif í 60 mín. <b>OG</b> < 35% eftir váhrif í 240 mín.	<b>Ætandi:</b> • Samsetning valkvæðra undirundirflokka 1B og 1C
≥ 35% eftir váhrif í 240 mín.	<b>Óætandi</b>

(\*) Samkvæmt gögnum sem aflað var með það fyrir augum að meta hvort prófunarlíkönin með endurgerðri húðþekju manns nýtist til að styðja undirflokkun var sýnt fram á að u.þ.b. 22% niðurstaðna úr prófunarlíkaninu EpiSkin™, sem sýndu undirundirflokk 1A, gætu í raun verið efni/blöndur í undirundirflokki 1B eða 1C (þ.e. of há flokkun) (sjá 3. viðbæti).

36. Spálíkönin fyrir líkönin til prófunar á húðætingu, EpiDerm™ SCT (10., 23. og 35. heimild), SkinEthic™ RHE (17., 18., 23. og 36. heimild) og epiCS® (16., 23. og 37. heimild), sem tengjast flokkunarkerfi HSK SP/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun, eru sýnd í töflu 5:

Tafla 5

## EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE og epiCS®

Lífvænleiki mældur eftir váhrifatímupunktum (t=3 og 60 mínútur)	Spá sem þarf að hafa í huga
SKREF 1 fyrir EpiDerm™ SCT, fyrir SkinEthic™ RHE og epiCS®	
< 50% eftir váhrif í 3 mín.	<b>Ætandi</b>
≥ 50% eftir váhrif í 3 mín. <b>OG</b> < 15% eftir váhrif í 60 mín.	<b>Ætandi</b>
≥ 50% eftir váhrif í 3 mín. <b>OG</b> ≥ 15% eftir váhrif í 60 mín.	<b>Óætandi</b>
SKREF 2 fyrir EpiDerm™ SCT - fyrir efni/blöndur sem eru greind sem ætandi í skrefi 1	
< 25% eftir váhrif í 3 mín.	Valkvæður undirundirflokkur 1A *

Lífvænleiki mældur eftir váhrifátímapunktum (t=3 og 60 mínútur)	Spá sem þarf að hafa í huga
SKREF 1 fyrir EpiDerm™ SCT, fyrir SkinEthic™ RHE og epiCS®	
≥ 25% eftir váhrif í 3 mín	Samsetning valkvæðra undirundirflokka 1B og 1C
SKREF 2 fyrir SkinEthic™ RHE - fyrir efni/blöndur sem eru greind sem ætandi í skrefi 1	
< 18% eftir váhrif í 3 mín.	Valkvæður undirundirflokkur 1A *
< 18% eftir váhrif í 3 mín	Samsetning valkvæðra undirundirflokka 1B og 1C
SKREF 2 fyrir epiCS® - fyrir efni/blöndur sem eru greind sem ætandi í skrefi 1	
< 15% eftir váhrif í 3 mín.	Valkvæður undirundirflokkur 1A *
≥ 15% eftir váhrif í 3 mín	Samsetning valkvæðra undirundirflokka 1B og 1C

## GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

**Gögn**

37. Setja skal gögn fyrir samhliða vefjasýni innan hversrar prófunar (t.d. ljóspéttigildi og reiknaðan hundraðshluta fyrir lífvænleika frumna fyrir hvert prófunaríðefni, auk flokkunar) fram í töflu, þ.m.t. gögn úr endurteknum tilraunum, ef við á. Auk þess skal setja fram meðaltal, lífvænleikasvið og fráviksstuðla milli samhliða vefjasýna fyrir hverja prófun. Víxlverkanir við MTT-hvarfmiðil með beinum MTT-afoxurum eða lituðum prófunaríðefnum skulu tilgreindar fyrir hvert prófað íðefni.

**Prófunarskýrsla**

38. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

*Prófunar- og samanburðaríðefni:*

- efni með einum efnisþætti: efnafraðileg sanngreining, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.,
- fjölpáttæfni, UVCB-efni og blanda: lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafraðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.
- útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafraðilegir eiginleikar sem skipta máli,
- uppruni, lotunúmer, ef það liggur fyrir,
- meðhöndlun prófunaríðefnisins/samanburðarefnisins fyrir prófunina, ef við á (t.d. hitun og mölun),
- stöðugleiki prófunaríðefnisins, síðasti notkunardagur eða dagsetning endurgreiningar, ef hún er þekkt,



— geymsluskiyrði.

*Líkan með endurgerðri húðþekju manns og aðferðarlýsing sem er notuð ásamt rökstuðningi fyrir valinu (ef við á)*

*Prófunarskiyrði:*

- líkan með endurgerðri húðþekju manns sem er notað (þ.m.t. númer framleiðslulotu),
- kvörðunarpplýsingar um mælibúnaðinn (t.d. litrófsmælir), bylgjulengd og bandsía (ef við á) til að magngreina MTT-formasan og línuleikasvið mælibúnaðar,
- lýsing á aðferðinni sem er notuð til að magngreina MTT-formasan,
- lýsing á hæfi litrófsmælingakerfis með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun, ef við á,
- heildarupplýsingar til stuðnings notkun á tilteknu líkani með endurgerðri húðþekju manns, þ.m.t. nothæfi þess. Í þeim skal eftirfarandi felast án þess þó að einskorðast við það:
  - i. lífvænleiki,
  - ii. tálmaþvirkni,
  - iii. formfræði,
  - iv. samanburðarnákvæmni og forspágeta,
  - v. gæðaeftirlit með líkaninu,
- tilvísanir í rannsóknarsöguleg gögn um líkanið. Í þeim skal felast, án þess þó að einskorðast við það, ásættanleiki gæðaeftirlitsgagna með tilvísun í rannsóknarsöguleg gögn um framleiðslulotur,
- sýnt fram á hæfni við framkvæmd prófunaraðferðarinnar fyrir reglulega notkun með því að prófa hæfnisefni.

*Prófunaraðferð:*

- upplýsingar um prófunaraðferðina sem er notuð (þ.m.t. skolonaraðferðir sem eru notaðar eftir váhrifatímabilið),
- skammtar prófunaríðefnis og samanburðaríðefnis sem eru notaðir,
- lengd váhrifatímabils eða váhrifatímabila og hitastig við váhrif,
- tilgreining á samanburðinum sem var notaður fyrir beina afoxara MTT og/eða litandi prófunaríðefni, ef við á,

- fjöldi samhliða vefjasýna sem eru notað fyrir hvert prófunaríðefni og samanburðir (jákvæður samanburður, neikvæður samanburður og ósértæk afoxun MTT, NSC<sub>lifandi</sub> og NSC<sub>dauður</sub>, ef við á) í hverjum váhrifatíma,
- lýsing á ákvörðunarviðmiðunum/spálíkani sem er notað, á grundvelli líkansins með endurgerðri húðþekju manns sem er notað,
- lýsing á öllum breytingum á prófunaraðferðinni (þ.m.t. skolonaraðferðum).

#### *Samþykktarviðmiðanir fyrir keyrslur og prófanir*

- meðalgildi fyrir jákvæðan og neikvæðan samanburð og ásættanleikasvið á grundvelli rannsóknarsögulegra gagna,
- ásættanlegur breytileiki milli samhliða vefjasýna fyrir jákvæðan og neikvæðan samanburð,
- ásættanlegur breytileiki milli samhliða vefjasýna fyrir prófunaríðefnið.

#### *Niðurstöður:*

- töflusetning gagna fyrir stök prófunaríðefni og staka samanburði, fyrir hvert váhrifatímabil, hverja keyrslu og hverja samhliða mælingu, þ.m.t. ljóspéttni eða toppflatarmál MTT-formasans, hundradshlutfall lífvænleika vefja, meðalhundradshlutfall lífvænleika vefja, mismunur milli samhliða sýna, staðalfrávik og/eða fráviksstuðlar, ef við á,
- ef við á, niðurstöður úr samanburðum sem eru notaðir fyrir beina afoxara MTT og/eða prófunaríðefni til litunar, þ.m.t. ljóspéttni eða toppflatarmál MTT-formasans, %NSMTT, %NSC<sub>lifandi</sub>, %NSC<sub>dauður</sub>, mismunur milli samhliða vefjasýna, staðalfrávik og/eða fráviksstuðlar (ef við á), og endanlegt rétt hundradshlutfall lífvænleika vefja,
- niðurstöður sem fengust með prófunaríðefninu eða prófunaríðefnunum og samanburðaríðefnunum í tengslum við skilgreindar samþykktarviðmiðanir fyrir keyrslur og prófanir,
- lýsing á öðrum áhrifum sem fram komu,
- afleidd flokkun með tilvísun í spálíkanið/ákvörðunarviðmiðanir sem eru notaðar.

#### *Umfjöllun um niðurstöðurnar*

#### *Ályktanir*

#### **HEIMILDIR**

- 1) UN (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva. Aðgengilegt á: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev05/05files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html)
- 2) Kafli B.4 í þessum viðauka, Bráð húðerting/æting.
- 3) Kafli B.40 í þessum viðauka, Rannsókn í glasi á húðætingu.

- 4) Kafli B.65 í þessum viðauka, Aðferð *í glasi* við prófun með tálma úr himnu.
- 5) Kafli B.46 í þessum viðauka, Rannsókn *í glasi* á húðertingu: Prófunaraðferð með endurgerðri húðþekju manns.
- 6) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponc M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23:219-255.
- 8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol.In Vitro* 12:471-482.
- 9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicol.in Vitro* 12:483-524.
- 10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. and Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371-401.
- 11) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, *ATLA* 23:129-147.
- 12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- 13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- 14) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.
- 15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 March 2000.
- 16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol.In Vitro* 19: 925-929.

- 17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann, H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N., Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., and Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol. In Vitro* 20: 547-559.
- 18) Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0,5 cm<sup>2</sup> Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379-1385.
- 19) EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 November 2006.
- 20) EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12 June 2009.
- 21) OECD (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 190). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 22) Alépée N., Grandidier M.H., and Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28:131-145.
- 23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., and Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29:2055-2080.
- 24) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
- 25) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 26) Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 62:393-403.
- 27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.
- 28) Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro*. Í: *In Vitro Skin Toxicology*. Rougier A., Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133-140.
- 29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol. in Vitro* 8:889 - 891.
- 30) Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J and Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. *Inter. J. Pharmaceu.* 203:211 - 225.

- 31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. and Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310-319.
- 32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS and Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163-171.
- 33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF and Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8:747-756.
- 34) EpiSkin™ SOP (December 2011). *INVITTOX* Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.
- 35) EpiDerm™ SOP (February 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.
- 36) SkinEthic™ RHE SOP (January 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.
- 37) EpiCS® SOP (January 2012). Version 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems.
- 38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., and McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29: 741-761.
- 39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (May 2001). Aðgengilegt á: [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>].

*I. viðbætur*

## SKILGREININGAR

**Nákvæmni:** Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktu viðmiðunargildi niðurstaða úr prófun er. Nákvæmni er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferða og einn þáttur gildis. Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli réttra niðurstaðna úr prófunaraðferð (25. heimild).

**Lífvænleiki frumna:** Mæliþáttur sem mælir heildarvirkni frumuhóps, t.d. getu frumubundinna vetnissvipta í hvatberum til að afoxa líflitinn MTT (3-(4,5-dímetyljþíasól-2-ýl)-2,5-dífenýltetrasólíumbrómíð, þíasólýl-blár) sem, háð endapunktinum sem mældur er og tilhögun prófunar, samsvarar heildartölu og/eða lífsþrótti lifandi frumna.

**Íðefni:** Efni eða blanda.

**Samsvörun:** Samsvörun er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferðar, þegar um er að ræða prófunaraðferðir sem gefa afdráttarlausar niðurstöður, og er einn þáttur gildis. Hugtakið er stundum notað í stað hugtaksins „nákvæmni“ og er skilgreint sem hlutfall allra prófaðra íðefna sem eru rétt flokkuð sem jákvæð eða neikvæð. Samsvörun er að miklu leyti háð því hversu algeng jákvæð svörun er í þeim gerðum prófunariðefna sem rannsakaðar eru (25. heimild).

**ET<sub>50</sub>:** Hægt að meta með ákvörðun á þeim váhrifatíma sem þarf til að draga úr lífvænleika frumu um 50% við notkun viðmiðunariðefnis við tilgreindan, fastan styrk, sjá einnig IC<sub>50</sub>.

**HSK (hnattsamræmda kerfið til flokkunar og merkingar á íðefnum):** Kerfi til flokkunar íðefna (efna og blandna), samkvæmt stöðluðum tegundum og stigum eðlisrænnar hættu, heilbrigðishættu og umhverfishættu, sem tekur til samsvarandi hættubodsatriða, s.s. hættumerkja, viðvörunarorða, hættusetninga, varnaðarsetninga og öryggisblaða, til að miðla upplýsingum um skaðleg áhrif íðefnanna í því skyni að vernda fólk (þ.m.t. vinnuveitendur, launafólk, flytjendur, neytendur og bráðaliða) og umhverfið (1. heimild).

**HPLC:** Háþrýstivökvaskiljun.

**IATA:** Samþættar aðferðir við prófun og mat.

**IC<sub>50</sub>:** Hægt að meta með ákvörðun á þeim styrk viðmiðunariðefnis sem dregur úr lífvænleika vefjanna um 50% (IC<sub>50</sub>) eftir fastan váhrifatíma, sjá einnig ET<sub>50</sub>.

**Ótakmarkaður skammtur:** Það magn prófunariðefnis sem er borið á húðþekjuna og er umfram magnið sem þarf til að hylja yfirborð húðþekjunnar fullkomlega og jafnt.

**Blanda:** Tvö eða fleiri efni í blöndu eða lausn sem þau hvarfast ekki í.

**Efni með einum efnisþætti:** Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi að a.m.k. 80% (massahlutfall).

**MTT:** 3-(4,5-dímetyljþíasól-2-ýl)-2,5-dífenýltetrasólíumbrómíð, þíasólýl-blátt tetrasólíumbrómíð.

**Fjölþáttaefni:** Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem fleiri en einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi í styrk sem nemur > 10% (massahlutfall) og < 80% (massahlutfall). Fjölþáttaefni er afleiðing af framleiðsluferli. Mismunurinn á blöndu og fjölþáttaefni er sá að blandan fæst með blöndun tveggja eða fleiri efna án efnahvarfs. Fjölþáttaefni er afleiðing af efnahvarfi.

**NC:** Óætandi.

**Samanburður NSC<sub>dauður</sub>:** Samanburður fyrir ósértæka litun í dauðum vef.

**Samanburður NSC<sub>lifandi</sub>:** Samanburður fyrir ósértæka litun í lifandi vef.

**NSMTT:** Ósértæk afoxun MTT.

**OD:** Ljósþéttni

**PC:** Jákvæður samanburður, samhliða sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis og er meðhöndlað með íðefni sem vitað er að framkallar jákvæða svörun. Til að tryggja að hægt sé að meta breytileika í svörun jákvæða samanburðarins yfir tíma skal þessi jákvæða svörun þó ekki vera of kröftug.

**Nothæfisstaðlar:** Staðlar, byggðir á fullgilti prófunaraðferð, sem eru grundvöllur fyrir mat á samanburðarhæfi tillagðrar prófunaraðferðar sem er samsvarandi fullgiltu aðferðinni með tilliti til verkunarmáta og virkni. Meðal þeirra eru i. grundvallarþættir prófunaraðferðarinnar, ii. lágmarksskrá yfir viðmiðunariðefni sem valin eru úr þeim íðefnum sem voru notuð til að sýna fram á ásættanlegt nothæfi fullgiltu prófunaraðferðarinnar og iii. gildi fyrir áreiðanleika og nákvæmni sem eru svipuð þeim sem fengust með fullgiltu prófunaraðferðinni og sem eiga að fást með tillögðu prófunaraðferðinni þegar hún er metin út frá lágmarksskránni yfir viðmiðunariðefni (25. heimild).

**Gildi:** Lýsing á sambandi prófunaraðferðarinnar og áhrifanna, sem miðað er við, og hvort sambandið hefur merkingu og er gagnlegt miðað við tiltekinn tilgang. Gildið lýsir því að hvaða marki prófunaraðferðin nær að mæla rétt eða spá fyrir um líffræðilegu áhrifin sem miðað er við. Gildi felur í sér umfjöllun um nákvæmni (samsvörun) prófunaraðferðar (25. heimild).

**Áreiðanleiki:** Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma prófunaraðferð með samanburðarnákvæmni hjá hverri rannsóknarstofu og hjá mismunandi rannsóknarstofum í tiltekinn tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Áreiðanleiki er metinn með því að reikna út einseturssamanburðarnákvæmni og fjölsetra samanburðarnákvæmni (25. heimild).

**Keyrsla:** Keyrsla samanstendur af einu eða fleirum prófunariðefnum sem eru prófuð samskeiða með neikvæðum samanburði og jákvæðum samanburði.

**Næmi:** Hlutfall allra jákvæðra/virkra íðefna sem eru rétt flokkuð með prófunaraðferðinni. Næmi er mælikvarði á nákvæmni prófunaraðferðar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunaraðferðar (25. heimild).

**Húðæting í lífi:** Varanleg skemmd í húð sem kemur fram eftir að prófunaríðefni hefur verið á húðinni í allt að fjórar klukkustundir, þ.e. sýnilegt drep sem nær í gegnum húðþekjuna og niður í leðurhúðina. Ætandi svörun einkennist af sárum, blæðingu, blæðandi hrúðri og, í lok 14 daga athugunartímabilsins, upplitun þegar húðin fölnar, hárlausum blettum og örum. Til greina kemur að gera vefjameinafræðilegar athuganir til að meta vefjaskemmdir sem vafi leikur á um.

**Sértæki:** Hlutfall allra neikvæðra/óvirkra íðefna sem eru rétt flokkuð með prófunaraðferðinni. Sértæki er mælikvarði á nákvæmni prófunaraðferðar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunaraðferðar (25. heimild).

**Efni:** Frumefni og efnasambönd þess, náttúruleg eða framleidd, þ.m.t. öll aukefni, sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika þess, og öll óhreinindi sem verða til í vinnslunni en þó ekki leysiefni sem skilja má frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess.

**Prófunaríðefni:** Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

**UPLC:** Úthábrýstivöskviljun.

**UVCB-efni:** efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.



2. viðbætur

HELSTU ÞÆTTIR PRÓFUNARLÍKANA MEÐ ENDURGERÐRI HÚÐÞEKJU MANNS SEM HAFNA VERIÐ FULLGILT TIL PRÓFUNAR Á HÚÐÆTINGU

Þættir prófunarlíkans	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Yfirborð líkans	0,38 cm <sup>2</sup>	0,63 cm <sup>2</sup>	0,5 cm <sup>2</sup>	0,6 cm <sup>2</sup>
Fjöldi samhliða vefjasýna	Minnst 2 í hverjum váhrifatíma	2–3 í hverjum váhrifatíma	Minnst 2 í hverjum váhrifatíma	Minnst 2 í hverjum váhrifatíma
Meðhöndlunarskammtar og notkun	<p>Vökvar og seigfljótandi efni: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm<sup>2</sup>)</p> <p>Föst efni: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm<sup>2</sup>) + 100 µl ± 5µl NaCl-lausrn (9 g/l)</p> <p>Vaxkennd/límkennd efni: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm<sup>2</sup>) með nælonmöska</p>	<p>Vökvar: 50 µl (79,4 µl/cm<sup>2</sup>) með eða án nælonmöska</p> <p><i>Samrýmanleiki prófunaríðefnis við nælonmöska fyrir prófun:</i></p> <p>Hálfföst efni: 50 µl (79,4 µl/cm<sup>2</sup>)</p> <p>Föst efni: 25 µl H<sub>2</sub>O (eða meira ef nauðsyn krefur) + 25 mg (39,7 mg/cm<sup>2</sup>)</p> <p>Vaxkennd efni: flöt flípalaga stykki, um 8 mm í þvermál, sett ofan á vefinn sem er bleyttur með 15 µl H<sub>2</sub>O.</p>	<p>Vökvar og seigfljótandi efni: 40 µl ± 3µl (80 µl/cm<sup>2</sup>) með nælonmöska</p> <p><i>Samrýmanleiki prófunaríðefnis við nælonmöska fyrir prófun:</i></p> <p>Föst efni: 20 µl ± 2µl H<sub>2</sub>O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm<sup>2</sup>)</p> <p>Vaxkennd/límkennd efni: 20 ± 3 mg (40 mg/cm<sup>2</sup>) með nælonmöska</p>	<p>Vökvar: 50 µl (83,3 µl/cm<sup>2</sup>) með nælonmöska</p> <p><i>Samrýmanleiki prófunaríðefnis við nælonmöska fyrir prófun:</i></p> <p>Hálfföst efni: 50 µl (83,3 µl/cm<sup>2</sup>)</p> <p>Föst efni: 25 mg (41,7 mg/cm<sup>2</sup>) + 25 µl H<sub>2</sub>O (eða meira ef nauðsyn krefur)</p> <p>Vaxkennd efni: flöt kókulaga stykki, um 8 mm í þvermál, sett ofan á vefinn sem er bleyttur með 15 µl H<sub>2</sub>O.</p>

Þættir prófunarlíkans	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Forathugun vegna beinnar afoxunar MTT	50 µl (vökvi) eða 20 mg (fast efni) + 2 ml MTT  0,3 mg/ml lausn í 180 ± 5 mín við 37 °C, 5% CO <sub>2</sub> , 95% rakastig  → ef lausnin verður blá/fjólublá skal gera aðlagðan samanburð með vef sem hefur verið drekkt í vatni	50 µl (vökvi) eða 25 mg (fast efni) + 1 ml MTT  1 mg/ml lausn í 60 mín við 37 °C, 5% CO <sub>2</sub> , 95% rakastig  → ef lausnin verður blá/fjólublá skal gera aðlagðan samanburð með vef sem hefur verið drepinn með frýstingu	40 µl (vökvi) eða 20 mg (fast efni) + 1 ml MTT  1 mg/ml lausn í 180 ± 15 mín við 37 °C, 5% CO <sub>2</sub> , 95% rakastig  → ef lausnin verður blá/fjólublá skal gera aðlagðan samanburð með vef sem hefur verið drepinn með frýstingu	50 µl (vökvi) eða 25 mg (fast efni) + 1 ml MTT  1 mg/ml lausn í 60 mín við 37 °C, 5% CO <sub>2</sub> , 95% rakastig  → ef lausnin verður blá/fjólublá skal gera aðlagðan samanburð með vef sem hefur verið drepinn með frýstingu
Forathugun vegna litatruflunar	10 µl (vökvi) eða 10 mg (fast efni) + 90 µl H <sub>2</sub> O blandað í 15 mín við stofuhita  → ef lausnin litast skal gera aðlagðan samanburð með lifandi vef	50 µl (vökvi) eða 25 mg (fast efni) + 300 µl H <sub>2</sub> O í 60 mín við 37 °C, 5% CO <sub>2</sub> , 95% rakastig  → ef lausnin litast skal gera aðlagðan samanburð með lifandi vef	40 µl (vökvi) eða 20 mg (fast efni) + 300 µl H <sub>2</sub> O blandað í 60 mín við stofuhita  → ef prófunaríðefnið er litað skal gera aðlagðan samanburð með lifandi vef	50 µl (vökvi) eða 25 mg (fast efni) + 300 µl H <sub>2</sub> O í 60 mín við 37 °C, 5% CO <sub>2</sub> , 95% rakastig  → ef lausnin litast skal gera aðlagðan samanburð með lifandi vef
Váhrifatími og hitastig	3 mín, 60 mín (± 5 mín) og 240 mín (± 10 mín)  Í loftræstum skáp, stofuhiti (18–28 °C)	3 mín við stofuhita og 60 mín við 37 °C, 5% CO <sub>2</sub> , 95% rakastig	3 mín við stofuhita og 60 mín við 37 °C, 5% CO <sub>2</sub> , 95% rakastig	3 mín við stofuhita og 60 mín við 37 °C, 5% CO <sub>2</sub> , 95% rakastig
Skolun	25 ml 1x fosfatstillt saltlausn (2 ml/keysla)	20 sinnum með stöðugu léttu streymi af 1x fosfatstilltri saltlausn	20 sinnum með stöðugu léttu streymi af 1x fosfatstilltri saltlausn	20 sinnum með stöðugu léttu streymi af 1x fosfatstilltri saltlausn

Þættir prófunarlíkans	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Neikvæður samanburður	50 µl NaCl lausn (9 g/l) Prófað í hverjum váhrifatíma	50 µl H <sub>2</sub> O Prófað í hverjum váhrifatíma	40 µl H <sub>2</sub> O Prófað í hverjum váhrifatíma	50 µl H <sub>2</sub> O Prófað í hverjum váhrifatíma
Jákvæður samanburður	50 µl ísedik Prófað í aðeins 4 klukkustundir	50 µl 8N KOH Prófað í hverjum váhrifatíma	40 µl 8N KOH Prófað í aðeins 1 klukkustund	50 µl 8N KOH Prófað í hverjum váhrifatíma
MTT-lausn	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT-ræktunartími og hitastig	180 mín (± 15 mín) við 37 °C, 5% CO <sub>2</sub> , 95% rakastig	180 mín við 37 °C, 5% CO <sub>2</sub> , 95% rakastig	180 mín (± 15 mín) við 37 °C, 5% CO <sub>2</sub> , 95% rakastig	180 mín við 37 °C, 5% CO <sub>2</sub> , 95% rakastig
Útdráttarleysir	500 µl sýrt ísóprópanól (0,04 N vetnisklórríð í ísóprópanóli) (einangraður vefur, allur á kafi)	2 ml ísóprópanól (útdráttur ofan og neðan af innskotsbolla)	1,5 ml ísóprópanól (útdráttur ofan og neðan af innskotsbolla)	2 ml ísóprópanól (útdráttur ofan og neðan af innskotsbolla)
Útdráttartími og -hitastig	Yfir nótt við stofuhita, varið ljósi	Yfir nótt án hristings við stofuhita eða í 120 mín með hristingi (~ 120 snún./mín.) við stofuhita	Yfir nótt án hristings við stofuhita eða í 120 mín með hristingi (~ 120 snún./mín.) við stofuhita	Yfir nótt án hristings við stofuhita eða í 120 mín með hristingi (~ 120 snún./mín.) við stofuhita

Þættir prófunarlíkans	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Mæling á ljóspéttni	570 nm (545–595 nm) án viðmiðunarsíu	570 nm (eða 540 nm) án viðmiðunarsíu	570 nm (540–600 nm) án viðmiðunarsíu	540–570 nm án viðmiðunarsíu
Gæðaeftirlit með vef	18 klukkustunda meðhöndlun með natriumdódekýlsúlfati 1,0 mg/ml ≤ IC <sub>50</sub> ≤ 3,0 mg/ml	Meðhöndlun með 1% Triton X-100 4,08 klst. ≤ ET <sub>50</sub> ≤ 8,7 klst.	Meðhöndlun með 1% Triton X-100 4,0 klst. ≤ ET <sub>50</sub> ≤ 10,0 klst.	Meðhöndlun með 1% Triton X-100 2,0 klst. ≤ ET <sub>50</sub> ≤ 7,0 klst.
Viðmiðanir fyrir ásættanleika	<ol style="list-style-type: none"> <li>Meðaltal ljóspéttni samhliða vefjasýna sem eru meðhöndluð með neikvæðum samanburði (NaCl) skal vera ≥ 0,6 og ≤ 1,5 í hverjum váhrifatíma</li> <li>Meðallífvænleiki samhliða vefjasýna sem eru látin verða fyrir váhrifum í 4 klukkustundir með jákvæða samanburðinum (ísedik), gefinn upp sem hundraðshlutfall neikvæða samanburðarins, skal vera ≤ 20%</li> <li>Á bilinu 20–100% fyrir lífvænleika og fyrir ljóspéttni ≥ 3,0, skal mismunur á lífvænleika milli samhliða vefjasýnanna tveggja ekki vera meiri en 30%</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Meðaltal ljóspéttni samhliða vefjasýna sem eru meðhöndluð með neikvæðum samanburði (H<sub>2</sub>O) skal vera ≥ 0,8 og ≤ 2,8 í hverjum váhrifatíma</li> <li>Meðallífvænleiki samhliða vefjasýna sem eru látin verða fyrir váhrifum í 1 klukkustund með jákvæða samanburðinum (8N KOH), gefinn upp sem hundraðshlutfall neikvæða samanburðarins, skal vera ≤ 15%</li> <li>Á bilinu 20–100% fyrir lífvænleika skal fráviksstuðullinn milli samhliða vefjasýna vera 30%</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Meðaltal ljóspéttni samhliða vefjasýna sem eru meðhöndluð með neikvæðum samanburði (H<sub>2</sub>O) skal vera ≥ 0,8 og ≤ 3,0 í hverjum váhrifatíma</li> <li>Meðallífvænleiki samhliða vefjasýna sem eru látin verða fyrir váhrifum í 1 klukkustund (og í 4 klukkustundir, ef við á) með jákvæða samanburðinum (8N KOH), gefinn upp sem hundraðshlutfall neikvæða samanburðarins, skal vera ≤ 15%</li> <li>Á bilinu 20–100% fyrir lífvænleika og fyrir ljóspéttni ≥ 3,0 skal mismunur á lífvænleika milli samhliða vefjasýnanna tveggja ekki vera meiri en 30%</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Meðaltal ljóspéttni samhliða vefjasýna sem eru meðhöndluð með neikvæðum samanburði (H<sub>2</sub>O) skal vera ≥ 0,8 og ≤ 2,8 í hverjum váhrifatíma</li> <li>Meðallífvænleiki samhliða vefjasýna sem eru látin verða fyrir váhrifum í 1 klukkustund með jákvæða samanburðinum (8N KOH), gefinn upp sem hundraðshlutfall neikvæða samanburðarins, skal vera 20%</li> <li>Á bilinu 20–100% fyrir lífvænleika og fyrir ljóspéttni ≥ 3,0 skal mismunur á lífvænleika milli samhliða vefjasýnanna tveggja ekki vera meiri en 30%</li> </ol>

## 3. viðbætur

## ÁRANGUR PRÓFUNARLÍKANANNA VARÐANDI UNDIRFLOKKUN

Taflan hér fyrir neðan sýnir árangur prófunarlíkananna fjögurra sem er reiknaður út á grundvelli 80 íðefna sem prófunarhönnuðirnir fjórir hafa prófað. Skrifstofa Efnahags- og framfarastofnunarinnar sá um útreikningana og þeir voru endurskoðaðir og samþykktir af undirhópi sérfræðinga (21. og 23. heimild).

Með prófunarlíkönunum EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ og epiCS® er hægt að undirflokkka (þ.e. greina á milli 1A og 1B/1C og óætandi efna (NC)).

Árangur, tíðni of hárrar flokkunar, tíðni of lágrar flokkunar og nákvæmni (forspárgeta) prófunarlíkananna fjögurra á grundvelli 80 íðefna, öll prófuð í 2 eða 3 keyrslum í hverju prófunarlíkani:

<b>TÖLFRÆÐILEGAR UPPLÝSINGAR UM SPÁR FENGNAR FYRIR ÖLL ÍÐEFNIN</b>				
(n=80 íðefni prófuð í 2 óháðum keyrslum fyrir epiCS® eða 3 óháðum keyrslum fyrir EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ og SkinEthic™ RHE, þ.e. 159 (*) eða 240 flokkanir, eftir því sem við á)				
	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
<b>Of háar flokkanir:</b>				
1B/1C flokkað of hátt sem 1A	21,50%	29,0%	31,2%	32,8%
NC flokkað of hátt sem 1B/1C	20,7%	23,4%	27,0%	28,4%
NC flokkað of hátt sem 1A	0,00%	2,7%	0,0%	0,00%
Flokkað of hátt sem ætandi	20,7%	26,1%	27,0%	28,4%
<b>Heildarhlutfall of hárrar flokkunar (allir flokkar)</b>	<b>17,9%</b>	<b>23,3%</b>	<b>24,5%</b>	<b>25,8%</b>
<b>Of lágar flokkanir:</b>				
1A flokkað of lágt sem 1B/1C	16,7%	16,7%	16,7%	12,5%
1A flokkað of lágt sem NC	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
1B/1C flokkað of lágt sem NC	2,2%	0,00%	7,5%	6,6%
<b>Heildarhlutfall of lágrar flokkunar (allir flokkar)</b>	<b>3,3%</b>	<b>2,5%</b>	<b>5,4%</b>	<b>4,4%</b>
<b>Réttar flokkanir:</b>				
1A rétt flokkað	83,3%	83,3%	83,3%	87,5%
1B/1C rétt flokkað	76,3%	71,0%	61,3%	60,7%
NC rétt flokkað	79,3%	73,9%	73,0%	71,62%
<b>Heildarnákvæmni</b>	<b>78,8%</b>	<b>74,2%</b>	<b>70%</b>	<b>69,8%</b>

NC: Óætandi

(\*) eitt íðefni var prófað einu sinni í epiCS® vegna skorts á aðgengi (23. heimild)

## 4. viðbætur

Helstu mæliþættir og samþykktarviðmiðanir fyrir hæfi litrófsmælingakerfis með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun til mælingar á MTT-formasani sem er dregið úr vef endurgerðrar húðþekju manns

Mæliþáttur	Aðferðarlýsing úr leiðbeiningum matvæla- og lyfjaeftirlits Bandaríkjanna (37. og 38. heimild)	Samþykktarviðmiðanir
Valvísí	Greining á ísóprópanóli, lifandi blanksýni (ísóprópanólútdráttur úr lifandi vef endurgerðrar húðþekju manns án meðhöndlunar), dautt blanksýni (ísóprópanólútdráttur úr dauðum vef endurgerðrar húðþekju manns án meðhöndlunar)	Svæðitruflun $\leq 20\%$ af svæði <sub>LLOQ</sub> <sup>(1)</sup>
Samkvæmni	Gæðaeftirlit (þ.e. MTT-formasan við 1,6 µg/ml, 16 µg/ml og 160 µg/ml) í ísóprópanóli (n=5)	FS $\leq 15\%$ eða $\leq 20\%$ vegna LLOQ
Nákvæmni	Gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n=5)	% frávika $\leq 15\%$ eða $\leq 20\%$ vegna LLOQ
Áhrif efniviðarins	Gæðaeftirlit í lifandi blanksýni (n=5)	85% $\leq$ áhrif efniviðarins $\leq 115\%$
Yfirfærsla	Greining á ísóprópanóli eftir staðli ULOQ <sup>(2)</sup>	Svæðitruflun $\leq 20\%$ af svæði <sub>LLOQ</sub>
Samanburðarnákvæmni (innan sama dags)	Þrjú óháðir kvörðunarferlar (á grundvelli sex samfelldra þynninga MTT-formasans í ísóprópanól í hlutföllum 1:3, þar sem byrjað er á ULOQ, þ.e. 200 µg/ml). Gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n=5)	Kvörðunarferlar: % frávika $\leq 15\%$ eða $\leq 20\%$ vegna LLOQ Gæðaeftirlit: % frávika $\leq 15\%$ og FS $\leq 15\%$
Samanburðarnákvæmni (innan sama dags)	1. dagur: Einn kvörðunarferill og gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n=3) 2. dagur: Einn kvörðunarferill og gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n=3) 3. dagur: Einn kvörðunarferill og gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n=3)	
Skammtíma stöðugleiki MTT-formasans í útdrætti úr vef úr endurgerðri húðþekju manns	Gæðaeftirlit í lifandi blanksýni (n=3), greint á degi tilreiðslu og eftir 24 klst. geymslu við stofuhita	% frávika $\leq 15\%$
Langtímastöðugleiki MTT-formasans í útdrætti úr vef úr endurgerðri húðþekju manns, ef þörf krefur	Gæðaeftirlit í lifandi blanksýni (n=3), greint á degi tilreiðslu og eftir nokkurra daga geymslu við tiltekið hitastig (t.d. 4 °C, -20 °C, -80 °C)	% frávika $\leq 15\%$

(1) LLOQ: Neðri magngreiningarmörk, skilgreind til að ná yfir 1–2% lífvænleika vefjar, þ.e. 0,8 µg/ml.

(2) ULOQ: Efri magngreiningarmörk, skilgreind þannig að þau eru a.m.k. tvöfalt hærri en hæsti styrkur MTT-formasans í ísóprópanólútdráttum úr neikvæðum samanburðum sem búist er við, þ.e. 200 µg/ml.“

## 7) Í stað kafla B.46 í B-hluta kemur eftirfarandi:

**‘B.46 IN VITRO SKIN IRRITATION: „B. 46 RANNSÓKN Í GLASI Á HÚDERTINGU: PRÓFUNARAÐFERÐ MED ENDURGERÐRI HÚÐÞEKJU MANNS**

## INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 439 um prófanir (2015). Húðerting er skemmd í húð sem kemur fram eftir að prófunarefnið hefur verið á húðinni í allt að 4 klukkustundir og getur gengið til baka [eins og skilgreint er í hnattsamræmdu kerfi Sameinuðu þjóðanna (SP) til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK)] (1. heimild) og reglugerð Evrópusambandsins (ESB) 1272/2008 um flokkun, merkingu og þökkun efna og blandna (reglugerðin um flokkun, merkingu og þökkun) <sup>(1)</sup>. Þessi prófunaraðferð er aðferð *í glasi* sem hægt er að nota til hættugreiningar á ertandi íðefnum (efnum og blöndum) í samræmi við 2. undirflokk HSK SP/reglugerðina um flokkun, merkingu og þökkun (2. heimild). Á svæðum sem hafa ekki samþykkt hinn valkvæða 3. undirflokk HSK SP (vægt ertandi efni) er einnig hægt að greina óflokkuð íðefni með þessari prófunaraðferð. Með hliðsjón af reglumannum og flokkunarkerfinu sem notað er má því nota þessa prófunaraðferð til að ákvarða húðertingu íðefna annað hvort sem sjálfstæða staðgönguprófun á húðertingu *í lífi* eða sem staðgönguprófun að hluta til innan prófunaráætlunar (3. heimild).
2. Mat á húðertingu hefur oftast falið í sér notkun tilraunadyra [prófunaraðferð B.4, sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 404 um prófanir, upphaflega samþykkt árið 1981 og endurskoðuð árin 1992, 2002 og 2015] (4. heimild). Til prófunar á húðætingu hafa þrjár fullgiltar prófunaraðferðir *í glasi* verið samþykktar í Evrópusambandinu sem prófunaraðferð B.40 (sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 430 um prófanir), prófunaraðferð B.40a (sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 431 um prófanir) og prófunaraðferð B.65 (sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 435 um prófanir) (5.–7. heimild). Í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunar um samþættar aðferðir við prófun og mat varðandi húðætingu og húðertingu er lýst nokkrum einingum sem samflokka upplýsingaveitur og greiningartæki, og i. veittar leiðbeiningar um hvernig skal samþætta og nota fyrirbyggjandi prófunargögn og önnur gögn til að meta húðertingar- og ætingarmátt íðefna, og ii. lagðar til nálganir þegar þörf er á frekari prófunum (3. heimild).
3. Þessi prófunaraðferð varðar húðertingu sem endapunktur með tilliti til heilbrigðis manna. Hún byggist á prófunarkerfi *í glasi* með endurgerðri húðþekju manns (RhE), sem líkir nákvæmlega eftir lífefnafræðilegum og lífeðlisfræðilegum eiginleikum efri hluta mannshúðar, þ.e. húðþekjunnar. Í prófunarkerfi með endurgerðri húðþekju manns eru óummyndaðar hynnisfrumur manns notaðar sem frumugjafi til að endurgera líkan úr húðþekju með dæmigerðri vefjafræði og frumuuppbyggingu. Nothæfisstaðlar eru tiltækir til að auðvelda fullgildingu og mat á samsvarandi og breyttum prófunaraðferðum sem byggjast á endurgerðri húðþekju manns í samræmi við meginreglurnar í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 34 (8. og 9. heimild). Samsvarandi viðmiðunarreglu um prófanir var upphaflega samþykkt árið 2010, uppfærð árið 2013 til að hún næði yfir fleiri líkön með endurgerðri húðþekju manns og uppfærð árið 2015 til að vísa til leiðbeiningarskjalsins um samþættar aðferðir við prófun og mat (IATA) og innleiða notkun annarrar aðferðar til að mæla lífvænleika.
4. Rannsóknur á forfullgildingu, bestun og fullgildingu er lokið fyrir fjögur líkön til prófunar *í glasi* sem fást á almennum markaði (10.–28. heimild) sem byggjast á prófunarkerfi með endurgerðri húðþekju manns (næmi 80%, sértæki 70% og nákvæmni 75%). Þessi prófunaraðferð nær yfir þessi fjögur prófunarlíkön og eru þau skráð í 2. viðbæti þar sem einnig eru veittar upplýsingar um gerð fullgildingarrannsóknarinnar sem notuð var til að fullgilda viðkomandi prófunaraðferðir. Eins og fram kemur í 2. viðbæti hefur fullgilta viðmiðunar aðferðin verið notuð til að þróa fyrirbyggjandi prófunaraðferð og nothæfisstáðlana (8. heimild).
5. Aðeins er hægt að tryggja gagnkvæma samþykkt gagna Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir prófunarlíkön sem eru fullgilt samkvæmt nothæfisstöðlunum (8. heimild) ef prófunarlíkönin hafa verið endurskoðuð og samþykkt af Efnahags- og framfarastofnuninni. Prófunarlíkönin sem þessi prófunaraðferð nær yfir og samsvarandi OECD-viðmiðunarreglu um prófanir er unnt að nota jafnt til að uppfylla kröfur landa um niðurstöður úr prófunaraðferðum *í glasi* á húðertingu og njóta um leið góðs af gagnkvæmri samþykkt gagna.
6. Skilgreiningar á hugtökum sem eru notuð í þessu skjali eru gefnar upp í 1. viðbæti.

## ATRÍÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFA Í UPPHAFI

7. Sú takmörkun er á prófunaraðferðinni, eins og sýnt er fram á í viðtæku framskyggnu fullgildingarrannsókninni til mats og lýsingar á prófunaraðferðum með endurgerðri húðþekju manns, að hún gefur ekki færi á flokkun íðefna í valkvæðan 3. undirflokk hnattsamræmdu kerfis SP (vægt ertandi efni) (1. heimild). Notkun þessarar prófunaraðferðar ákvarðast því af reglumanna aðildarríkjanna. Að því er varðar Evrópusambandið þá er ekki búið að taka 3. undirflokk upp í reglugerðina um flokkun, merkingu og þökkun. Fyrir fullt mat á staðbundnum áhrifum á húð eftir váhrif á húð í eitt skipti er mælt með því að fletta upp í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um samþættar aðferðir við prófun og mat (3. heimild). Viðurkennt er að notkun mannshúðar er með fyrirvara um siðferðilega þætti og skilyrði á lands- og alþjóðavísu.

<sup>(1)</sup> Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1272/2008 frá 16. desember 2008 um flokkun, merkingu og þökkun efna og blandna, um breytingu og niðurfellingu á tilskipunum 67/548/EBE og 1999/45/EB og um breytingu á reglugerð (EB) nr. 1907/2006 (Stjtuð. ESB L 353, 31.12.2008, bls. 1).

8. Þessi prófunaraðferð varðar húðertingu sem endapunktur með tilliti til heilbrigðis manna. Þó að þessi prófunaraðferð veiti ekki fullnægjandi upplýsingar um húðætingu skal það tekið fram að prófunaraðferð B.40a (sem jafngildir OECD-viðmiðunareglu 431 um prófanir) um húðætingu byggist á sama prófunarkerfi með endurgerðri húðþekju manns þótt notuð sé önnur aðferðarlýsing (6. heimild). Þessi prófunaraðferð er byggð á líkönum með endurgerðri húðþekju manns sem í eru notaðar hyrnisfrumur manns og eru því dæmigerð *í glasi* fyrir marklíffæri dýrategundarinnar sem miðað er við. Auk þess nær hún yfir upphafsstig keðjuverkunar eða gangvirki bólgunnar (frumu- og vefjaskemmdir sem leiða af sér staðbundinn skaða) sem verður meðan á ertingu *í lífi* stendur. Margvísleg íðefni hafa verið prófuð við fullgildinguna, sem liggur til grundvallar þessari prófunaraðferð, og gagnasafn fullgildingarrannsóknarinnar náði yfir alls 58 íðefni (16., 18. og 23. heimild). Prófunaraðferðin á við um föst efni, vökva, hálfstöð efni og vaxkennd efni. Vökvarnir mega vera vatnskenndir eða ekki vatnskenndir og föstu efnin mega vera uppleysanleg eða óleysanleg í vatni. Föstu efnin skulu möluð í fínt duft áður en þau eru borin á, ef þess er nokkur kostur, en engin önnur formeðhöndlun á sýninu er nauðsynleg. Ekki er enn búið að meta lofttegundir og úðafni í fullgildingarrannsókn (29. heimild). Þó að það sé hugsanlegt að hægt sé að prófa lofttegundir og úðafni með tækninni sem notar endurgerða húðþekju manns er ekki hægt að prófa þau með núverandi prófunaraðferð.
9. Áður en þessi aðferð til prófunar á blöndu, sem er framkvæmd til að fá gögn sem fyrirhugað er að nota í eftirlitsskyni, er notuð skal skoðað hvort, og þá af hverju, hún gæti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi. Ekki er þörf á slíkri skoðun ef prófun á blöndunni er krafa af hálfu eftirlitsyfirvalda. Þar eð blöndur ná yfir breitt svið flokka og samsetninga og sem stendur eru aðeins takmarkaðar upplýsingar fyrirleggjandi um prófanir á blöndum skal þó, í þeim tilvikum þar sem unnt er að sýna fram á ónothæfi prófunaraðferðarinnar varðandi tiltekinn flokk af blöndum (t.d. áætlun fylgt eins og mælt er með í Eskes *et al.* 2012 (30. heimild)), ekki nota prófunaraðferðina fyrir þann tiltekna flokk blandna. Einnig skal gæta varúðar ef í ljós kemur að tilteknir íðefnaflokkar eða eðlisefnafræðilegir eiginleikar eigi ekki við um fyrirleggjandi prófunaraðferð.
10. Prófunaríðefni sem gleypa ljós á sama sviði og MTT-formasan og prófunaríðefni sem geta afoxað MTT-líflitinn beint (í MTT-formasan) geta truflað mælingar á lífvænleika frumna og þörf er á aðlöguðum samamburði til leiðréttingar (sjá 28.–34.lið).
11. Stök prófunarkeyrsla á þremur samhliða vefjasýnum ætti að nægja ef flokkun prófunarefnisins er ótvíræð. Ef niðurstöður eru óvissar, t.d. ef ósamsvörur er í samhliða mælingum og/eða meðalhundraðshluti lífvænleika er jafnt og  $50 \pm 5\%$ , skal tekið til athugunar að gera aðra keyrslu, sem og þá þriðju ef ósamræmi er á milli niðurstaðna úr fyrstu keyrslunum tveimur.

#### MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

12. Prófunarefnið er borið staðbundið á þrívítt líkan með endurgerðri húðþekju manns sem samanstendur af óumbreyttum hyrnisfrumum manns sem hafa verið ræktaðar til að mynda marglaga, mjög aðgreint líkan af húðþekju manns. Líkanið samanstendur af grunn-, þyrni- og kornalagi og marglaga hornlagi sem í eru, milli frumna, fitulagaþynnur sem eru dæmigerðar fyrir helstu flokka lípíða, hliðstæðum þeim sem finnast *í lífi*.
13. Húðerting af völdum íðefna, sem kemur aðallega fram sem hörundsroði og bjúgur, er afleiðing keðjuverkandi atburða sem hefjast þegar íðefni fara í gegnum hornlag húðar og kunna að valda skaða á undirliggjandi lögum hyrnisfrumna og öðrum húðfrumum. Sködduðu frumurnar geta annað hvort látið frá sér bólgvaldandi milliliði eða leitt til keðjuverkunar bólgu sem hefur einnig áhrif á frumurnar í leðurhúðinni, einkum frumurnar í uppistöðuvef og innþekju blóðæða. Það er útvíkkun og aukið gegndræpi frumnanna í innþekjunni sem framkallar hörundsroðann og bjúginn (29. heimild). Þegar engin æðun er fyrir hendi í prófunarkerfinu *í glasi* mæla prófunaraðferðirnar með endurgerðri húðþekju manns einkum upphafsatburðina í keðjuverkuninni, þ.e. frumu- eða vefjaskemmdir (16. og 17. heimild), með því að nota lífvænleika frumna sem mælikvarða.
14. Lífvænleiki frumna í líkönum með endurgerðri húðþekju manns er mældur með umbreytingu með ensímum á líflitnum MTT [3-(4,5-dímetylþíasól-2-yl)-2,5-difényltetrasólúmbrómíð, þíasólýl-blár, CAS-númer 298-93-1] í blátt formasansalt sem er mælt meginlega eftir útdrátt úr vefjunum (31. heimild). Ertandi íðefni eru greind eftir hæfni þeirra til að minnka lífvænleika frumna niður fyrir skilgreind viðmiðunargildi (þ.e.  $\leq 50\%$  fyrir 2. undirflokk HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og þökkun. Íðefni, sem framkalla lífvænleika í frumum sem er meiri en skilgreint viðmiðunargildi, má líta á sem efni sem eru ekki ertandi (þ.e.  $> 50\%$  utan flokka), með hliðsjón af regluramma og notkunarsviði prófunaraðferðarinnar.



## SÝNT FRAM Á HÆFNI

15. Áður en einhver af fullgiltu prófunarlíkönunum fjórum, sem fylgja þessari prófunaraðferð (2. viðbætur), eru tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur staðfesta tæknilega hæfni sína með hæfnisefnunum tíu sem tilgreind eru í töflu 1. Ef t.d. skráð efni er ekki tiltækt er heimilt að nota annað efni ef fullnægjandi tilvísunargögn í lífi og í glasi liggja fyrir um það ( t.d. af skránni yfir viðmiðunaráðefni (8. heimild)), að því tilskildu að sömu valviðmiðunum, eins og lýst er í töflu 1, sé beitt. Ef annað hæfnisefni er notað skal það rökstutt.
16. Mælt er með því að notendur sannprófi tálmaeiginleika vefjanna eftir viðtöku þeirra samkvæmt leiðbeiningum frá framleiðanda líkansins með endurgerðri húðþekju manns, til að sýna fram á hæfni. Þetta er sérstaklega mikilvægt ef vefirnir eru fluttir um langan veg eða flutningurinn tekur langan tíma. Þegar prófunaraðferð hefur verið notuð á árangursríkan hátt og hæfni í notkun hennar hefur verið náð og sýnt fram á hana þá er ekki nauðsynlegt að sannprófa hana að staðaldri. Ef prófunaraðferð er notuð að staðaldri er þó mælt með að því að haldið sé áfram að meta tálmaeiginleikana með reglulegu millibili.

Tafla 1

Hæfnisefni <sup>(1)</sup>

Efni	CAS-nr.	Stig í lífi <sup>(2)</sup>	Eðlisástand	Undirflokkur HSK SP
------	---------	----------------------------	-------------	---------------------

## ÓFLOKKUÐ EFNI (UTAN FLOKKA HSK SP)

naftalínedíksýra	86-87-3	0	Fast efni	Utan flokka
ísoprópanól	67-63-0	0,3	Vökvi	Utan flokka
metýlsterat	112-61-8	1	Fast efni	Utan flokka
heptylbútýrat	5870-93-9	1,7	Vökvi	Utan flokka (valkvæður 3. undirflokkur) <sup>(3)</sup>
hexýlsalisýlat	6259-76-3	2	Vökvi	Utan flokka (valkvæður 3. undirflokkur) <sup>(3)</sup>

## FLOKKUÐ EFNI (2. UNDIRFLOKKUR HSK SP)

sýklamenaldehyð	103-95-7	2,3	Vökvi	Undirflokkur 2
1-brómhexan	111-25-1	2,7	Vökvi	Undirflokkur 2
kalfúmíhýdroxíð (5% vatnslausn)	1310-58-3	3	Vökvi	Undirflokkur 2
1-metýl-3-fenýl-1-píperasín	5271-27-2	3,3	Fast efni	Undirflokkur 2
heptanal	111-71-7	3,4	Vökvi	Undirflokkur 2

(1) Hæfnisefnin eru hlutmengi efnanna sem eru notuð í fullgildingarrannsókninni og valið byggist á eftirfarandi viðmiðum: i. íðefnin fást á almennum markaði, ii. þau eru dæmigerð fyrir allt svið Draize-ertingarstiganna (frá ekki ertandi til mjög ertandi), iii. þau hafa vel skilgreinda efnafræðilega byggingu, iv. þau eru dæmigerð fyrir efnafræðilegu virknina sem notuð er í fullgildingarferlinu í glasi, v. þau hafa gefið samanburðarnákvæmar niðurstöður í mörgum prófunum og mörgum rannsóknarstofum, vi. spáð var rétt fyrir um þau í glasi, og vii. þau hafa ekki mjög mikla eiturhrifaiginleika (t.d. krabbameinsvaldandi áhrif eða eiturhrif á æxlunarfæri) og þeim fylgir ekki óásættanlegur förgunarkostnaður.

(2) Stig í lífi í samræmi við prófunaraðferð B.4 (4. heimild).

(3) Í þessari prófunaraðferð er litið á hinn valkvæða 3. undirflokk HSK SP (vægt ertandi efni) (1. heimild) sem utan flokka.

## VERKFERLI

17. Eftirfarandi er lýsing á þáttum og tilhögun prófunaraðferðar með endurgerðri húðþekju manns til að meta húðertingu (sjá einnig 3. viðbæti að því er varðar mæliþætti í tengslum við hvert prófunarlíkan). Tiltækar eru staðlaðar verklagsreglur fyrir líkönin fjögur sem eru í samræmi við þessa prófunaraðferð (32.–35. heimild).

## ÞÆTTIR Í PRÓFUNARAÐFERÐ MEÐ ENDURGERÐRI HÚÐÞEKJU MANNS

**Almenn skilyrði**

18. Nota skal óumbreyttar hrynifrumur manns til að endurgera þekjuna. Í henni skulu vera mörg lög af lífvænlegum þekjufrumum (grunnlag, þyrnilag, kornlag) undir virku hornlagi. Hornlagið skal vera marglaga, með grundvallarfitusniði til að veita virkan, traustan tálma gegn því að frumudrepani viðmiðunaríðefni, t.d. natriumdódekýlsúlfat eða Triton X-100, gangi hratt inn í það. Sýna skal fram á tálmaþvirkna og hana má meta, annaðhvort með því að ákvarða við hvaða styrk viðmiðunaríðefni dregur úr lífvænleika vefjanna um 50% (IC<sub>50</sub>) eftir fastan váhrifatíma eða með því að ákvarða hve langan váhrifatíma þarf til að draga úr lífvænleika frumna um 50% (ET<sub>50</sub>) þegar viðmiðunaríðefnið er sett á í tilteknum, föstum styrk. Afmörkunareiginleikar líkansins skulu koma í veg fyrir að efni flytjist um hornlagið að lífvænlegum vef en það myndi skerða getu líkansins með endurgerðri húðþekju manns til að lýsa váhrifum á húð. Líkanið með endurgerðri húðþekju manns skal vera laust við smit af völdum baktería, veira, berfryminga eða sveppa.

**Virkniaðstæður***Lífvænleiki*

19. Greiningin sem er notuð til að mægnreina lífvænleika er greining með MTT-lit (31. heimild). Lífvænlegar frumur í vefjalíkani með endurgerðri húðþekju manns geta afoxað líflitinn MTT í útfellingu af bláu MTT-formasani sem er svo dregin úr vefnum með ísóprópanóli (eða svipuðum leysi). Ljósþéttni (OD) hreins útdrátarleysis skal vera nægilega lítil, þ.e. OD < 0,1. Hægt er að mægnreina útdregið MTT-formasan með annað hvort staðalgleypni (ljósþéttni) eða litrófsmælingaraðferð með háþrýsti-/útháþrýstivöskvaskiljun (e. *HPLC/UPLC-spectrophotometry procedure*) (36. heimild). Notendur líkans með endurgerðri húðþekju manns skulu ganga úr skugga um að hver framleiðslulota notaðs líkans með endurgerðri húðþekju manns uppfylli skilgreindar viðmiðanir fyrir neikvæðan samanburð. Hönnuður eða birgir líkansins með endurgerðri húðþekju manns skal staðfesta ásættanlegt svið (efri og neðri mörk) fyrir ljósþéttningildi neikvæða samanburðarins (við aðstæður samkvæmt prófunaraðferðinni fyrir húðertingu). Ásættanlegt svið fyrir fullgiltu prófunarlíkönin fjögur með endurgerðri húðþekju manns, sem þessi prófunaraðferð nær yfir, er tilgreint í töflu 2. Notandi litrófsmælingar með háþrýsti-/útháþrýstivöskvaskiljun skal nota ljósþéttnisvið fyrir neikvæðan samanburð, sem er tilgreint í töflu 2, sem samþykktarviðmiðun fyrir neikvæða samanburðinn. Skjalfest skal að vefirnir, sem eru meðhöndlaðir með neikvæðum samanburði, séu stöðugir í ræktun (gefi svipaðar lífvænleikamælingar) meðan váhrifatímabil stendur yfir.

Tafla 2

**Ásættanlegt svið ljósþéttningilda neikvæðs samanburðar fyrir prófunarlíkönin sem þessi prófunaraðferð nær yfir**

	Neðri ásættanleikamörk	Efri ásættanleikamörk
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8
SkinEthiC™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

*Tálmaþvirkni*

20. Hornlagið og samsetning lípíðanna í því ætti að nægja til að koma í veg fyrir að frumudrepani viðmiðunaríðefni, t.d. natriumdódekýlsúlfat eða Triton X-100, gangi hratt inn í það, miðað við IC<sub>50</sub> eða ET<sub>50</sub> (tafla 3).

*Formfræði*

21. Gera skal vefjafræðilega rannsókn á líkaninu með endurgerðri húðþekju manns til að sýna fram á að bygging hennar sé lík húðþekju manns (þ.m.t. marglaga hornlag húðar).

*Samanburðarnákvæmni*

22. Niðurstöður úr jákvæða og neikvæða samanburðinum skulu sýna fram á samanburðarnákvæmni í langan tíma.

*Gæðaeftirlit*

23. Líkanið með endurgerðri húðþekju manns skal eingöngu notað ef hönnuður eða birgir sýnir fram á að hver framleiðslulota líkana með endurgerðri húðþekju manns, sem er notuð, uppfylli skilgreindar viðmiðanir fyrir afhendingu framleiðslunnar en af þeim skipta *lífvænleiki* (19. liður), *tálmavirkni* (20. liður) og *formfræði* (21. liður) mestu máli. Notendur prófunaraðferðarinnar skulu fá gögn um þau atriði afhent svo þeir geti haft þær upplýsingar með í prófunarskýrslunni. Hönnuður eða birgir líkansins með endurgerðri húðþekju manns skal staðfesta ásættanlegt svið (efri og neðri mörk) fyrir IC<sub>50</sub> eða ET<sub>50</sub>. Aðeins er hægt að samþykkja niðurstöður, sem fást með viðurkenndum vefjum, sem áreiðanlegar til að spá fyrir um ertingarflokkun. Ásættanlegt svið fyrir prófunarlíkönin fjögur, sem þessi prófunaraðferð nær yfir, eru gefin í töflu 3.

*Tafla 3***Gæðaeftirlitsviðmiðanir fyrir afhendingu framleiðslulota fyrir prófunarlíkönin sem þessi prófunaraðferð nær yfir**

	Neðri ásættanleikamörk	Efri ásættanleikamörk
EpiSkin™ (SM) (18 klukkustunda meðhöndlun með natríumdódekýlsúlfati) (32. heimild).	IC <sub>50</sub> = 1,0 mg/ml	IC <sub>50</sub> = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1% Triton X-100) (33. heimild)	ET <sub>50</sub> = 4,0 klst.	ET <sub>50</sub> = 8,7 klst.
SkinEthiC™ RHE (1% Triton X-100) (34. heimild)	ET <sub>50</sub> = 4,0 klst.	ET <sub>50</sub> = 10,0 klst.
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 klukkustunda meðhöndlun með natríumdódekýlsúlfati) (35. heimild).	IC <sub>50</sub> = 1,4 mg/ml	IC <sub>50</sub> = 4,0 mg/ml

**Prófunar- og samanburðariðefni sett á**

24. Nota skal a.m.k. þrjú samhlíða sýni fyrir hvert prófunariðefni og fyrir samanburðinn í hverri keyrslu. Nota skal nægilegt magn prófunariðefnisins, bæði þegar um er að ræða fljótandi og föst íðefni, til að þekja yfirborð húðþekjunnar jafnt en þó ekki ótakmarkaðan skammt, þ.e. á bilinu 26 til 83 l/cm<sup>2</sup> eða mg/cm<sup>2</sup> (sjá 3. viðbæti). Ef um er að ræða föst íðefni skal væta yfirborð húðþekjunnar með afjónuðu eða eimuðu vatni áður en þau eru sett á til að tryggja góða snertingu prófunariðefnisins við yfirborð húðþekjunnar. Prófa skal föst efni í fíngerðu duftformi þegar því verður við komið. Í sumum tilvikum er hægt að nota nælonmóska til að auðvelda dreifingu (sjá 3. viðbæti). Í lok váhrifatímabils skal skola prófunariðefnið vandlega af yfirborði húðþekjunnar með vatnskenndri jafnalausn eða 0,9% NaCl. Váhrifatímabilið er á bilinu 15–60 mínútur, með hliðsjón af því hvaða líkön með endurgerðri húðþekju manns eru notuð, og sýnið er látið standa við hitastigið frá 20–37 °C. Þessi váhrifatímabil og hitastig eru bestuð fyrir hverja einstaka prófunaraðferð með endurgerðri húðþekju manns og eru dæmigerð fyrir mismunandi eðliseiginleika prófunarlíkananna (t.d. tálmavirkni) (sjá 3. viðbæti).
25. Nota skal samskeiða neikvæðan og jákvæðan samanburð í hverri keyrslu til að sýna fram á að lífvænleiki (með neikvæða samanburðinum), tálmavirkni og næmi vefjanna, sem af henni leiðir (með jákvæða samanburðinum), séu innan skilgreinds, rannsóknarsögulegs ásættanleikasviðs. Lagt er til að notað sé 5% natríumdódekýlsúlfat í vatnslausn við jákvæðan samanburð. Lagt er til að notað sé annaðhvort vatn eða fostfatjöfnuð saltlausn við neikvæðan samanburð.

**Mælingar á lífvænleika frumna**

26. Samkvæmt prófunaraðferðinni er nauðsynlegt að lífvænleikinn sé ekki mældur um leið og prófunaríðefnin hafa verið borin á heldur eftir að skolaður vefurinn hefur verið látinn standa í hæfilega langan tíma í nýju æti eftir meðhöndlunina. Á þeim tíma nær vefurinn bæði að jafna sig af vægt frumdrepanði áhrifum og greinileg, frumdrepanði áhrif koma í ljós. Við bestun tveggja prófunarlíkana með endurgerðri húðþekju manns, sem liggja til grundvallar þessari prófunaraðferð, reyndist best ef stöðutími eftir meðhöndlun var 42 klukkustundir (11.–15. heimild).
27. Greining með MTT er stöðluð meginleg aðferð sem skal nota til að mæla lífvænleika frumna í þessari prófunaraðferð. Hún samræmist notkun í þrívíðu vefjalíkani. Vefjasýnið er sett í MTT-litarlausn í hæfilegum styrk (t.d. 0,3–1 mg/ml) í 3 klukkustundir. Lífvænlegar frumur breyta MTT í blátt formasan. Útfellt, blátt formasan er svo dregið út úr vefnum með leysi (t.d. ísóprópanóli, súru ísóprópanóli) og formasanstyrkurinn er mældur með því að ákvarða ljóspéttni við 570 nm á síukvarðabili sem er að hámarki  $\pm 30$  nm eða með litrófsmælingaraðferð með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun (sjá 34. lið) (36. heimild).
28. Ljósfræðilegir eiginleikar prófunaríðefnisins eða efnafræðileg verkun þess á MTT (t.d. geta íðefni komið í veg fyrir litarmyndunina eða snúið henni við sem og valdið henni) geta truflað greininguna og leitt til rangs mats á lífvænleika. Þetta getur gerst þegar tiltekið prófunaríðefni er ekki skolað algerlega af vefnum eða ef það gengur inn í húðþekjuna. Ef prófunaríðefni hefur beina virkni á MTT-litinn (t.d. er afoxari MTT-litar), er litað frá náttúrunnar hendi eða litast við meðhöndlun vefjarins skal viðbótarsamanburði beitt til að greina og leiðrétta truflandi áhrif prófunaríðefnisins á aðferðina sem er notuð til mælinga á lífvænleika (sjá 29. og 33. lið). Í stöðluðu verklagsreglugerðum fyrir fullgiltu líkönin fjögur sem þessi prófunaraðferð nær yfir (32.–35. heimild) er ítarleg lýsing á því hvernig unnt er að leiðrétta beina afoxun MTT-litar og truflanir frá litarefnum.
29. Til að greina beina MTT-afoxara beint skal bæta hverju prófunaríðefni út í nýtilreidda MTT-litarlausn. Ef MTT-blandan sem inniheldur prófunaríðefnið verður blá/fjólublá er gert ráð fyrir að prófunaríðefnið afoxi MTT-litinn beint og framkvæma skal frekari athuganir á virkni ólífvænlegs vefjar endurgerðrar húðþekju manns, óháð því hvort notuð er stöðluð ljóspéttnigleypnimæling eða litrófsmælingaáferð með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun. Í þessari viðbótathugun á virkni er notaður dauður vefur sem hefur einungis eftirstandandi efnaskiptavirkni en gleypir í sig prófunaríðefnið á svipaðan hátt og lífvænlegur vefur. Hvert prófunaríðefni sem afoxar MTT-litinn er sett á a.m.k. tvö samhlíða sýni úr dauðum vef sem gangast undir alla prófunaraðferðina til að fá ósértæka afoxun MTT (NSMTT) (32.–35. heimild). Stakur NSMTT-samanburður nægir fyrir hvert prófunaríðefni, án tillits til óháðra prófana/keyslna sem gerðar eru. Raunverulegur lífvænleiki vefjar er síðan reiknaður út sem hundraðshlutfall lífvænleika vefjar, fengið með lifandi vef sem var látinn verða fyrir váhrifum frá MTT-afoxara, að frádregnu hundraðshlutfalli ósértækrar afoxunar MTT sem er fengið með dauðum vef sem var látinn verða fyrir váhrifum af sama MTT-afoxara, reiknað út í samanburði við neikvæða samanburðinn sem er keyrður samskeiða prófuninni sem er leiðrétt (%NSMTT).
30. Til að greina hugsanlega truflun af lituðum prófunaríðefnum eða prófunaríðefnum sem litast þegar þau komast í snertingu við vatn eða ísóprópanól og til að ákvarða hvort þörf sé á viðbótarsamanburðum skal framkvæma tíðnirófgreiningu prófunaríðefnis í vatni (umhverfi á meðan á váhrifum stendur) og/eða ísóprópanóli (útdráttarlausn). Ef prófunaríðefnið í vatni og/eða ísóprópanóli gleypir í sig ljós á sviðinu  $570 \pm 30$  nm, ætti að framkvæma frekari samanburði á litgjöfum eða, að öðrum kosti, nota litrófsmælingu með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun, en í því tilviki er ekki þörf á þessum samanburði (sjá 33. og 34. lið). Þegar mæling á staðalgleypni (ljóspéttni) er gerð er hvert truflandi litaða prófunaríðefni sett á minnst tvö lífvænleg samhlíða vefjasýni sem gangast undir alla prófunaraðferðina en eru ræktuð í æti í stað MTT-launsar á meðan á MTT-ræktunarþrepi stendur til að fá samanburð fyrir ósértæka litun (NSC<sub>lifandi</sub>). Samanburður NSC<sub>lifandi</sub> skal gerður samskeiða prófuninni á litaða prófunaríðefninu og ef um er að ræða margar prófanir skal gera óháðan samanburð NSC<sub>lifandi</sub> fyrir hverja framkvæmda prófun (í hverri keyrslu) vegna eðlislægs líffræðilegs breytileika lifandi vefjar. Raunverulegur lífvænleiki vefjar er síðan reiknaður sem hundraðshlutfall lífvænleika vefjar, fengið með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum af truflandi prófunaríðefninu og ræktaður með MTT-laun, að frádregnu hundraðshlutfalli ósértækrar litunar sem er fengið með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum af truflandi prófunaríðefninu og ræktaður í æti án MTT, sem er keyrður samskeiða prófuninni sem er leiðrétt (%NSC<sub>lifandi</sub>).
31. Að því er varðar prófunaríðefni sem sanngreint er að valdi bæði beinni afoxun MTT (sjá 29. lið) og litatruflun (sjá 30. lið), er þörf á þriðju gerð af samanburði, auk samanburðar fyrir ósértæka afoxun MTT og samanburðar NSC<sub>lifandi</sub> sem er lýst í undangengnum liðum, við mælingu á staðalgleypni (ljóspéttni). Þetta á yfirleitt við um dökklituð prófunaríðefni sem trufla greiningu með MTT (t.d. blár, fjólublár, svartur) þar eð eðlislægur litur þeirra hindrar mat á getu þeirra til beinnar afoxunar MTT, eins og lýst er í 29. lið. Þessi prófunaríðefni geta bundist bæði lifandi og dauðum vef og því getur samanburður með ósértækri afoxun MTT ekki eingöngu leiðrétt hugsanlega beina afoxun MTT af völdum prófunaríðefnisins heldur einnig litatruflun sem kemur til vegna bindingar prófunaríðefnis við dauðan

vef. Þetta gæti leitt til tvöfaldrar leiðréttingar á litatruflun, þar eð samanburður NSC<sub>lifandi</sub> leiðréttir þegar litatruflun sem kemur til vegna bindingar prófunaríðefnisins við lifandi vef. Til að koma í veg fyrir mögulega tvöfalda leiðréttingu litatruflunar þarf að gera þriðja samanburðinn fyrir ósértæka litun með dauðum vef (NSC<sub>dauður</sub>). Í þessum viðbótarsamanburði er prófunaríðefnið sett á minnst tvö samhlíða sýni úr dauðum vef sem gangast undir allt prófunarferlið en eru ræktuð í æti í stað MTT-launar á meðan á MTT-ræktunarþrepi stendur. Stakur samanburður NSC<sub>dauður</sub> nægir fyrir hvert prófunaríðefni, óháð fjölda óháðra prófana/keyslna sem gerðar eru, en skal gerður samskeiða samanburði með ósértækri afoxun MTT og, ef unnt er, með sömu vefjalotu. Raunverulegur lífvænleiki vefjar er síðan reiknaður út sem hundraðshlutfall lífvænleika vefjar, fengið með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum af prófunaríðefninu, að frádregnu %NSMTT, að frádregnu %NSC<sub>lifandi</sub>, að viðbættu hundraðshlutfalli ósértækrar litunar sem er fengið með dauðum vef sem er látinn verða fyrir váhrifum af truflandi prófunaríðefninu og ræktaður í æti án MTT, reiknað út í samanburði við neikvæða samanburðinn sem er keyrður samskeiða prófuninni sem er leiðrétt (%NSC<sub>dauður</sub>).

32. Mikilvægt er að taka mið af því að ósértæk afoxun MTT og ósértækar litatruflanir geta valdið því að aflestur vefjaútdráttar á litrófsmælinum verði ofan línuleikasviðs. Á þeim grundvelli skal hver rannsóknarstofa ákvarða línuleikasvið fyrir sinn litrófsmæli með MTT-formasan (CAS-númer 57360-69-7) af almennum markaði áður en prófun á prófunaríðefnum í eftirlitsskyni hefst. Mæling á staðalgleypni (ljóspéttni) með litrófsmæli er viðeigandi til að meta beina MTT-afoxara og prófunaríðefni sem trufla litun þegar ljóspéttni vefjaútdráttar, sem fæst með prófunaríðefninu án leiðréttingar vegna beinnar afoxunar MTT og/eða litatruflunar, mælist innan línuleikasviðs litrófsmælisins eða þegar óleiðrétt hundraðshlutfall lífvænleika sem er fengið með prófunaríðefninu er þegar  $\leq 50\%$ . Engu að síður skulu niðurstöður fyrir prófunaríðefni, sem valda %NSMTT og/eða %NSC<sub>lifandi</sub>  $\geq 50\%$  af neikvæða samanburðinum, teknar með fyrirvara þar eð það er þröskuldsgildi sem er notað til að skilja á milli flokkaðra og óflokkaðra íðefna (sjá 36. lið).
33. Að því er varðar lituð prófunaríðefni, sem samrýmast ekki mælingu á staðalgleypni (ljóspéttni) vegna of mikillar truflunar við greiningu með MTT, má nota staðgönguaðferðina litrófsmælingu með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun til að mæla MTT-formasan (sjá 34. lið) (36. heimild). Litrófsmælingakerfi með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun gerir kleift að skilja MTT-formasan frá prófunaríðefninu fyrir magnákvörðun (36. heimild). Af þessum sökum er ekki þörf á NSC<sub>lifandi</sub> eða NSC<sub>dauðum</sub> samanburði þegar litrófsmæling með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun er notuð, óháð íðefninu sem er prófað. Engu að síður skal nota samanburði fyrir ósértæka afoxun MTT ef grunur leikur á að prófunaríðefnið sé beinn afoxari MTT eða ef litur þess hamlar mati á getu til beinnar afoxunar MTT (eins og lýst er í 29. lið). Þegar litrófsmæling með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun er notuð til að mæla MTT-formasan er hundraðshlutfall lífvænleika vefjar reiknað út sem hundraðshlutfall toppflatarmáls MTT-formasans, sem fæst með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu, í samanburði við toppgildi MTT-formasans sem er fengið með samskeiða neikvæðum samanburði. Að því er varðar prófunaríðefni sem geta afoxað MTT beint er raunverulegur lífvænleiki vefjar reiknaður út sem hundraðshlutfall lífvænleika vefjar sem fæst með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu, að frádregnu %NSMTT. Að lokum skal tekið fram að ekki er unnt að meta beina afoxara MTT, sem geta einnig truflað litun, sem verða eftir í vefjum eftir meðhöndlun og afoxa MTT að svo miklu leyti að þeir leiða til ljóspéttni (með notkun staðlaðrar ljóspéttnimælingar) eða toppflatarmáls (með litrófsmælingu með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun) prófaðs vefjaútdráttar sem lendir utan línuleikasviðs litrófsmælisins, þó að ekki sé búist við að slíkt gerist nema í undantekningartilvikum.
34. Litrófsmælingu með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun má einnig nota með öllum gerðum prófunaríðefna (lituð, ólituð, efni sem afoxa MTT-litarefni og efni sem gera það ekki) til að mæla MTT-formasan (36. heimild). Vegna fjölbreytni litrófsmælingakerfa með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun skal sýna fram á hæfi litrófsmælingakerfisins með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun áður en það er notað til að magngreina MTT-formasan úr vefjaútdrátti með því að sýna að samþykktarviðmiðanirnar séu uppfylltar fyrir staðlaða mælipætti fyrir hæfi, á grundvelli þeirra sem lýst er í leiðbeiningum Matvæla- og lyfjaeftirlits Bandaríkjanna fyrir iðnaðinn um fullgildingu lífgreiningaraðferða (36. og 37. heimild). Þessir helstu mælipættir og samþykktarviðmiðanirnar þeirra eru sýnd í 4. viðbæti. Um leið og samþykktarviðmiðanirnar, sem eru skilgreindar í 4. viðbæti, eru uppfylltar telst litrófsmælingakerfið með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun hæft til mælingar á MTT-formasani samkvæmt rannsóknarskilyrðunum sem lýst er í þessari prófunaraðferð.

#### Viðmiðanir fyrir ásættanleika

35. Fyrir hverja prófunaraðferð með fullgiltum framleiðslulotum líkana með endurgerðri húðþekju manns (sjá 23. lið) skulu vefir, sem eru meðhöndlaðir með neikvæða samanburðinum, sýna ljóspéttni sem endurspeglar gæði vefjanna sem hafa farið gegnum öll skref sendingar- og viðtökuferlisins og alla meðhöndlun samkvæmt aðferðarlýsingu. Ljóspéttnigildi samanburðarins skulu ekki vera undir viðurkenndum, rannsóknarsögulegum mörkum. Á sama hátt skulu vefir sem eru meðhöndlaðir með jákvæða samanburðinum, þ.e. 5% natríumdódekýlsúlfati í vatnslausn, endurspeglar getu þeirra til að sýna svörum við ertandi íðefni við skilyrði prófunaraðferðarinnar (sjá 3. viðbæti og, fyrir frekari upplýsingar, staðlaðar verklagsreglur fyrir prófunarlíkönin fjögur sem þessi viðmiðunarregla um prófanir nær yfir (32.–35. heimild)). Tengdar og viðeigandi mælingar á breytileika milli samhlíða vefjasýna, þ.e. staðalfrávik (SD), skulu vera innan ásættanlegra marka sem fastsett eru fyrir prófunarlíkanið sem er notað (sjá 3. viðbæti).

**Túlkun á niðurstöðum og spálíkan**

36. Nota má ljósþéttignigildin, sem fást með hverju prófunaríðefni, til að reikna út lífvænleika í hundradshlutum, staðlaðan við neikvæða samanburðinn sem er látinn gilda 100%. Ef litrófsmæling með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun er notuð er hundradshlutfall lífvænleika reiknað út sem hundradshlutfall toppflatarmáls MTT-formasans sem fæst með lifandi vef, sem er látinn verða fyrir váhrifum af prófunaríðefninu, í samanburði við toppgildi MTT-formasans sem er fengið með samskeiða neikvæðum samanburði. Þröskuldsgildi hundradshluta lífvænleika frumna, sem skilur á milli ertandi íðefna og óflokkaðra prófunaríðefna, og sú tölfraðilega aðferð eða aðferðir, sem eru notaðar til að meta niðurstöðurnar og greina ertandi íðefni, skulu skýrt skilgreind og skjalfest og sýna skal fram á að þau séu eins og við á (sjá staðlaðar verklagsreglur fyrir prófunarlíkönin, til upplýsingar). Þröskuldsgildi til að spá fyrir um ertandi áhrif eru gefin hér á eftir:

- Prófunaríðefnið reynist þurfa flokkun og merkingu í samræmi við HSK SP/reglugerðina um flokkun, merkingu og pökkun (1. eða 2. undirflokkur), ef meðalhundradshlutfall lífvænleika vefjar eftir váhrif og ræktun að lokinni meðhöndlun er minna en eða jafnt ( $\leq$ ) 50%. Þar eð ekki er hægt að greina á milli 1. og 2. undirflokks HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun með prófunarlíkönunum með endurgerðri húðþekju manns, sem þessi prófunaraðferð nær yfir, er þörf á frekari upplýsingum um húðætingu til að ákvarða lokaflokkun [sjá einnig leiðbeiningarskjal Efnahags- og framfarastofnunarinnar um samþættar aðferðir við prófun og mat (3. heimild)]. Er prófunaríðefnið reynist óætandi (t.d. á grundvelli prófunaraðferðar 40, B.40a eða B.65) og sýnir lífvænleika vefjar eftir váhrif og ræktun eftir meðhöndlun sem er minni eða jafn ( $\leq$ ) 50%, er prófunaríðefnið talið húðertandi í samræmi við 2. undirflokk HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun.
- Háð reglurammanum í aðildarríkjum má líta svo á að prófunaríðefnið sé ekki ertandi fyrir húð, í samræmi við flokkun sem utan flokka í HSK SP/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun, ef lífvænleiki vefjanna eftir váhrif og ræktun að lokinni meðhöndlun er meiri en ( $>$ ) 50%.

**GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF****Gögn**

37. Setja skal gögn fyrir samhliða vefjasýni innan hvernar keyrslu (t.d. ljósþéttignigildi og gögn um reiknaðan hundradshluta fyrir lífvænleika frumna fyrir hvert prófunaríðefni, auk flokkunar) fram í töflu, þ.m.t. gögn úr endurteknum tilraunum, ef við á. Auk þess skal tilgreina meðaltal  $\pm$  staðalfrávik fyrir hverja keyrslu. Víxlverkanir við MTT-hvarfmiðil og lituð prófunaríðefni skulu tilgreindar fyrir hvert prófað íðefni.

**Prófunarskýrsla**

38. Eftirtaldir upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

*Prófunar- og samanburðaríðefni:*

- efni með einum efnisþætti: efnafræðileg sanngreining, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.,
- fjölþáttaefni, UVCB-efni og blanda: lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.
- útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,
- uppruni, lotunúmer, ef það liggur fyrir,
- meðhöndlun prófunaríðefnisins/samanburðaríðefnanna fyrir prófunina, ef við á (t.d. hitun og mölun),
- stöðugleiki prófunaríðefnisins, síðasti notkunardagur eða dagsetning endurgreiningar, ef hún er þekkt,
- geymsluskilyrði.

Líkan með endurgerðri húðþekju manns og aðferðarlýsing sem er notuð (og rökstuðningur fyrir valinu, ef við á)

*Prófunarskilyrði:*

- líkan með endurgerðri húðþekju manns sem er notað (þ.m.t. númer framleiðslulotu),
- kvörðunarpplýsingar um mælibúnaðinn (t.d. litrófsmælir), bylgjulengd og bandsía (ef við á) til að magngreina MTT-formasan og línuleikasvið mælibúnaðar; lýsing á aðferðinni sem er notuð til að magngreina MTT-formasan,
- lýsing á hæfi litrófsmælingakerfis með háþrýsti-/útháþrýstivöskvaskiljun, ef við á, heildarpplýsingar til stuðnings notkunar á tilteknu líkani með endurgerðri húðþekju manns, þ.m.t. nothæfi þess. Í þeim skal eftirfarandi felast án þess þó að einskorðast við það:
  - i. lífvænleiki,
  - ii. tálmaþvirkni,
  - iii. formfræði,
  - iv. samanburðarnákvæmni og forspágeta,
  - v. gæðaeftirlit með líkaninu,
- tilvísanir í rannsóknarsöguleg gögn um líkanið. Í þeim skal felast, án þess þó að einskorðast við það, ásættanleiki gæðaeftirlitsgagna með tilvísun í rannsóknarsöguleg gögn um framleiðslulotur.
- sýnt fram á hæfni við framkvæmd prófunaraðferðarinnar fyrir reglulega notkun með því að prófa hæfnisefni.

*Prófunaraðferð:*

- upplýsingar um prófunaraðferðina sem er notuð (þ.m.t. skolonaraðferðir sem eru notaðar eftir váhrifatímabilið), skammtar prófunaríðefnis og samanburðaríðefnis sem eru notaðir,
- váhrifatími, hitastig við váhrif og stöðutími eftir váhrif,
- tilgreining á samanburðinum sem var notaður fyrir beina afoxara MTT og/eða litandi prófunaríðefni, ef við á,
- fjöldi samhliða vefjasýna sem eru notuð fyrir hvert prófunaríðefni og samanburðir (jákvæður samanburður, neikvæður samanburður og ósértæk afoxun MTT, NSC<sub>litandi</sub> og NSC<sub>dauður</sub>, ef við á),
- lýsing á ákvörðunarviðmiðunum/spálíkani sem er notað, á grundvelli líkansins með endurgerðri húðþekju manns sem er notað,
- lýsing á öllum breytingum á prófunaraðferðinni (þ.m.t. skolonaraðferðum).

*Samþykktarviðmiðanir fyrir keyrslur og prófanir*

- meðalgildi fyrir jákvæðan og neikvæðan samanburð og ásættanleikasvið á grundvelli rannsóknarsögulegra gagna, ásættanlegur breytileiki milli samhliða vefjasýna fyrir jákvæðan og neikvæðan samanburð,
- ásættanlegur breytileiki milli samhliða vefjasýna fyrir prófunaríðefnið.

*Niðurstöður:*

- töflusetning gagna fyrir stök prófunaríðefni fyrir hverja keyrslu og hverja samhliða mælingu, þ.m.t. ljósbéttni eða toppflatarmál MTT-formasans, hundraðshlutfall vefjalífvænleika, meðalhundraðshlutfall vefjalífvænleika og staðalfrávik,
- ef við á, niðurstöður úr samanburðum sem eru notaðir fyrir beina afoxara MTT og/eða prófunaríðefni til litunar, þ.m.t. ljósbéttni eða toppflatarmál MTT-formasans, %NSMTT, %NSC<sub>lifandi</sub>, %NSC<sub>dauður</sub>, staðalfrávik og endanlegt rétt hundraðshlutfall lífvænleika vefjar,
- niðurstöður sem fengust með prófunaríðefninu eða prófunaríðefnunum og samanburðum í tengslum við skilgreindar samþykktarviðmiðanir fyrir keyrslur og prófanir,
- lýsing á öðrum áhrifum sem fram komu,
- afleidd flokkun með tilvísun í spálíkanið/ákvörðunarviðmiðanir sem eru notaðar.

*Umfiöllun um niðurstöðurnar**Ályktanir***HEIMILDIR**

- 1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Aðgengilegt á: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev05/05files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html).
- 2) EURL-ECVAM (2009). Statement on the “Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards”, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9 April 2009. Aðgengilegt á: [https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31\\_skin-irritation-statement\\_20090922.pdf](https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf)
- 3) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 4) Kafli B.4 í þessum viðauka, Bráð húðerting/æting.
- 5) Kafli B.40 í þessum viðauka, Rannsókn í glasi á húðætingu: Rafviðnám gegnum húð (TER).
- 6) Kafli B.40bis í þessum viðauka, Rannsókn í glasi á húðætingu: Prófunaraðferð með endurgerðri húðþekju manns (RhE).
- 7) Kafli B.65 í þessum viðauka, Aðferð í glasi við prófun með tálma úr himnu.
- 8) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.



- 10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.
- 11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.
- 12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107–114.
- 13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005). The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351-367.
- 14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinstein, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329-349.
- 15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.
- 16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.
- 17) Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1- $\alpha$ .
- 18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603-619.
- 19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonnaud, E. and Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351-358.
- 20) EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Aðgengilegt á: [https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26\\_statement\\_SkinIrritation\\_20070525\\_C.pdf](https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf)
- 21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *Ath.: Þetta eru upprunalegu nothæfisstaðlarnir sem voru notaðir við fullgildingu þessara tveggja prófumaraðferða. Ekki skal nota þessa nothæfisstaðla lengur því uppfærð útgáfa (8. heimild) er nú fánleg.*
- 22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. [https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC\\_Statement\\_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf](https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf)

- 23) OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol Sci*, 34, 327-334
- 25) Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111-122
- 26) OECD (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 159), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 27) OECD (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 155), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.
- 29) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231-243.
- 30) Eskes, C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403).
- 31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- 32) EpiSkin™ (February 2009). SOP, Version 1.8 ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals
- 33) EpiDerm™ (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).
- 34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.
- 35) LabCyte (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model "LabCyte EPI-MODEL24"
- 36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Handrit í vinnslu.
- 37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Aðgengilegt á: [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>].

- 38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, í: Practical Contact Dermatitis, bls. 7–18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.
- 39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *Ath.: Þetta er gildandi útgáfa nothæfisstaðla Evrópumíðstöðvar um fullgildingu staðgönguáðferða, uppfærð árið 2009 í ljósi innleiðingar HSK SP. Ekki skal nota þessa nothæfisstaðla lengur því uppfærð útgáfa (8. heimild) er nú fánleg í tengslum við fyrirliggjandi viðmiðunarreglu um prófanir.*
- 40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.
- 41) EC (2001). Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 Adapting to Technical Progress for the 28th Time Council Directive 67/548/EEC on the Approximation of Laws, Regulations and Administrative Provisions Relating to the Classification, Packaging and Labelling of Dangerous Substances, *Official Journal of the European Union* L225, 1-333.

*I. viðbætur*

## SKILGREININGAR

**Nákvæmni:** Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktu viðmiðunargildi niðurstaða úr prófun er. Nákvæmni er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferða og einn þáttur gildis. Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli réttra niðurstaðna úr prófunaraðferð (9. heimild).

**Lífvænleiki frumna:** Mæliþáttur sem mælir heildarvirkni frumuhóps, t.d. getu frumubundinna vetnissvipta í hvatberum til að draga úr líflitnum MTT (3-(4,5-dímetylþíasól-2-ýl)-2,5-dífenýltetrasólíumbrómíð, þíasólýl-blár) sem, háð endapunktinum sem mældur er og tilhögun prófunar, samsvarar heildartölu og/eða lífsþrótti lifandi frumna.

**Íðefni:** efni eða blanda.

**Samsvörun:** Samsvörun er mælikvarði á nothæfi þegar um er að ræða prófunarlíkön sem gefa afdráttarlausar niðurstöður, og er einn þáttur gildis. Hugtakið er stundum notað í stað hugtaksins „nákvæmni“ og er skilgreint sem hlutfall allra prófaðra íðefna sem eru rétt flokkuð sem jákvæð eða neikvæð. Samsvörun er að miklu leyti háð því hversu algeng jákvæð svörun er í þeim gerðum prófunaríðefna sem rannsakaðar eru (9. heimild).

**ET<sub>50</sub>:** Hægt að meta með ákvörðun á þeim váhrifatíma sem þarf til að draga úr lífvænleika frumu um 50% við notkun viðmiðunariðefnis við tilgreindan, fastan styrk, sjá einnig IC<sub>50</sub>.

**HSK (hnattsamræmt kerfi Sameinuðu þjóðanna (SP) til flokkunar og merkingar íðefna):** Kerfi til flokkunar íðefna (efna og blandna), samkvæmt stöðluðum tegundum og stigum eðlisrænnar hættu, heilbrigðishættu og umhverfishættu, sem tekur til samsvarandi hættuboðsatriða, s.s. skýringarmynda, viðvörunarorða, hættusetninga, varnaðarsetninga og öryggisblaða til að miðla upplýsingum um skaðleg áhrif þeirra til verndar fólki (þ.m.t. vinnuveitendur, starfsmenn, flytjendur, neytendur og bráðaliðar) og umhverfinu (1. heimild).

**HPLC:** Háþrýstivöskviljun.

**IATA:** Samþættar aðferðir við prófun og mat.

**IC<sub>50</sub>:** Hægt að meta með ákvörðun á þeim styrk viðmiðunariðefnis sem dregur úr lífvænleika vefjanna um 50% (IC<sub>50</sub>) eftir fastan váhrifatíma, sjá einnig ET<sub>50</sub>.

**Ótakmarkaður skammtur:** Það magn prófunariðefnis sem er borið á húðþekjuna og er umfram magnið sem þarf til að hylja yfirborð húðþekjunnar fullkomlega og jafnt.

**Blanda:** Blanda eða lausn tveggja eða fleiri efna.

**Efni með einum efnisþætti:** Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi að a.m.k. 80% (massahlutfall).

**MTT:** 3-(4,5-dímetylýlþíasól-2-ýl)-2,5-dífenýltetrasólíumbrómíð, þíasólýl-blátt tetrasólíumbrómíð.

**Fjölþáttaefni:** Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem fleiri en einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi í styrk sem nemur  $\geq 10\%$  (massahlutfall) og  $< 80\%$  (massahlutfall). Fjölþáttaefni er afleiðing af framleiðsluferli. Mismunurinn á blöndu og fjölþáttaefni er sá að blandan fæst með blöndun tveggja eða fleiri efna án efnahvarfs. Fjölþáttaefni er afleiðing af efnahvarfi.

**NSC<sub>dauður</sub>:** Samanburður fyrir ósértæka litun með dauðum vef.

**NSC<sub>lifandi</sub>:** Samanburður fyrir ósértæka litun með lifandi vef.

**NSMTT:** Ósértæk afoxun MTT.

**Nothæfisstaðlar:** Staðlar, byggðir á fullgilttri prófunaraðferð, sem eru grundvöllur fyrir mat á samanburðarhæfi tillagðrar prófunaraðferðar sem er samsvarandi fullgiltu aðferðinni með tilliti til verkunarmáta og virkni. Meðal þeirra eru i) grundvallarþættir prófunaraðferðarinnar, ii) lágmarksskrá yfir viðmiðunariðefni sem valin eru úr þeim íðefnum sem voru notuð til að sýna fram á ásætlanlegt nothæfi fullgiltu prófunaraðferðarinnar og iii) gildi fyrir nákvæmni og áreiðanleika sem eru samsvarandi þeim sem fengust með fullgiltu prófunaraðferðinni og sem eiga að fást með tillögðu prófunaraðferðinni þegar hún er metin út frá lágmarksskránni yfir viðmiðunariðefni (9. heimild).

**PC:** Jákvæður samanburður, samhliða sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis og er meðhöndlað með íðefni sem vitað er að framkallar jákvæða svörun. Til að tryggja að hægt sé að meta breytileika í svörun jákvæða samanburðarins yfir tíma skal þessi jákvæða svörun þó ekki vera of kröftug.

**Gildi:** Lýsing á sambandi prófunarinnar og áhrifanna, sem miðað er við, og hvort sambandið hefur merkingu og er gagnlegt miðað við tiltekinn tilgang. Gildið lýsir því að hvaða marki prófunin nær að mæla rétt eða spá fyrir um líffræðilegu áhrifin sem miðað er við. Gildi felur í sér umfjöllun um nákvæmni (samsvörun) prófunaraðferðar (9. heimild).

**Áreiðanleiki:** Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma prófunaraðferð með samanburðarnákvæmni hjá hverri rannsóknarstofu og hjá mismunandi rannsóknarstofum í tiltekinn tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Áreiðanleiki er metinn með því að reikna út einseturssamanburðarnákvæmni og fjölsetra samanburðarnákvæmni (9. heimild).

**Staðgönguprófun:** Prófun sem er hönnuð til að koma í stað prófunar, sem notuð er að staðaldri og samþykkt til hættugreiningar og/eda áhættumats, og sem hefur verið sýnt fram á að verndar heilbrigði manna eða dýra eða umhverfið, eftir því sem við á, til jafns við eða betur en samþykktu prófunin við allar hugsanlegar prófunaraðstæður og fyrir öll hugsanleg prófunariðefni (9. heimild).

**Keyrsla:** Keyrsla samanstandur af einu eða fleirum prófunariðefnum sem eru prófuð samskiða með neikvæðum samanburði og jákvæðum samanburði.

**Næmi:** Hlutfall allra jákvæðra/virkra prófunarefna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Næmi er mælikvarði á nákvæmni prófunaraðferðar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunaraðferðar (9. heimild).

**Húðerting í lífi:** Framköllun á skemmd í húð sem getur gengið til baka og kemur fram eftir að prófunaríðefnið hefur verið á húðinni í allt að 4 klukkustundir. Húðerting er staðbundin svörun viðkomandi húðvefjar sem kemur í ljós stuttu eftir örvun (38. heimild). Hún kemur til vegna staðbundinna bólguviðbragða í náttúrulegu (ósértæku) ónæmiskerfi húðvefjarins. Aðaleinkenni hennar er að hún gengur til baka, veldur bólguviðbrögðum og flestum klínískum einkennum ertingar (hörundsroða, bjúg, kláða og sársauka) sem tengjast bólguferli.

**Sértæki:** Hlutfall allra neikvæðra/óvirkra prófunaríðefna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Sértæki er mælikvarði á nákvæmni prófunaraðferðar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunaraðferðar (9. heimild).

**Efni:** Frumefni og efnasambönd þess, náttúruleg eða unnin með framleiðsluferlum, þ.m.t. öll aukefni, sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika þess, og öll óhreinindi, sem stafa frá vinnslunni, en þó ekki leysiefni sem skilja má frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess.

**Prófunaríðefni:** Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

**UPLC:** Útháprýstivökvaskiljun.

**UVCB-efni:** Efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.

## 2. viðbætur

## PRÓFUNARLÍKÖN SEM ÞESSI PRÓFUNARAÐFERÐ NÆR YFIR

Nr.	Heiti prófunarlíkans	Gerð fullgildingarrannsóknar	Tilvísanir
1	EpiSkin™	Víðtæk framskyggn fullgildingarrannsókn (2003–2007). Þættir þessa líkans voru notaðir til að skilgreina nauðsynlega prófunaraðferðarþætti í upprunalegum og uppfærðum nothæfisstöðlum Evrópumíðstöðvar um fullgildingu staðgönguáðferða (39., 40. og 21. heimild) (*). Auk þess voru gögnin úr aðferðinni varðandi greiningu óflokkaðra og flokkaðra efna helsti grundvöllurinn að skilgreiningu á gildum fyrir sértæki og næmi í upprunalegu nothæfisstöðlunum (*).	2., 10., 11., 14., 15., 16., 17., 18., 19., 20., 21., 23., 32., 39. og 40. heimild
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ ( <i>upprunalegt</i> ): Upphaflega fór prófunarlíkanið í gegnum víðtæka framskyggn fullgildingu ásamt nr. 1 frá 2003–2007. Þættir þessa líkans voru notaðir til að skilgreina nauðsynlega prófunaraðferðarþætti í upprunalegum og uppfærðum nothæfisstöðlum Evrópumíðstöðvar um fullgildingu staðgönguáðferða (39., 40. og 21. heimild) (*). <b>EpiDerm™ SIT (EPI-200)</b> : Breyting á upprunalegu EpiDerm™ var fullgilt með upprunalegum nothæfisstöðlum Evrópumíðstöðvar um fullgildingu staðgönguáðferða (21. heimild) árið 2008 (*).	2., 10., 12., 13., 15., 16., 17., 18., 20., 21., 23., 33., 39. og 40. heimild 2., 21., 22., 23., og 33. heimild
3	SkinEthiC™ RHE	Fullgildingarrannsókn byggð á upprunalegum nothæfisstöðlum Evrópumíðstöðvar um fullgildingu staðgönguáðferða (21. heimild) árið 2008 (*).	2., 21., 22., 23., og 31. heimild
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Fullgildingarrannsókn (2011–2012) byggð á nothæfisstöðlum (PS) í OECD-viðmiðunarreglu 439 um prófanir (8. heimild) sem byggja á uppfærðum nothæfisstöðlum Evrópumíðstöðvar um fullgildingu staðgönguáðferða (*) (39. og 40. heimild).	24., 25., 26., 27., 28., 35., 39. og 40. heimild og nothæfisstaðlar þessarar viðmiðunarreglu um prófanir (8. heimild) (*)

(\*) Upprunalegir nothæfisstaðlar Evrópumíðstöðvar um fullgildingu staðgönguáðferða (PS) (21. heimild) voruð þróaðir árið 2007 þegar framskyggn fullgildingarrannsókninni (16. heimild) var lokið, þar sem árangur prófunarlíkananna nr. 1 og 2 var metinn að því er varðar flokkunarkerfið, eins og lýst er í 28. breytingu á tilskipun Evrópusambandsins um hættuleg efni (41. heimild). Árið 2008 komu til framkvæmda HSK SP (1. heimild) og reglugerðin um flokkun, merkingu og þökkun, þar sem þröskuldsgildi sem skilur á milli óflokkaðra og flokkaðra efna var fært í raun úr 2,0 stigum í lífi í 2,3 stig. Til að aðlagast breyttri kröfu samkvæmt reglum var skráin yfir nákvæmnisgildin og viðmiðunariðefni í nothæfisstöðlum Evrópumíðstöðvar um fullgildingu staðgönguáðferða uppfærð árið 2009 (2., 39. og 40. heimild). Líkt og upprunalegu nothæfisstaðlarnir voru uppfærðu nothæfisstaðlarnir að miklu leyti byggðir á gögnum frá líkönum nr. 1 og 2 (16. heimild) en til viðbótar voru notuð gögn um viðmiðunariðefni frá líkani nr. 3. Árið 2010 voru uppfærðir nothæfisstaðlar Evrópumíðstöðvar um fullgildingu staðgönguáðferða notaðir til að mæla fyrir um nothæfisstaðlana sem tengjast þessari viðmiðunarreglu um prófanir (8. heimild). Að því er varðar þessa prófunaraðferð telst EpiSkin™ fullgilt viðmiðunaraðferðin þar sem það var notað til að þróa allar viðmiðanir nothæfisstaðlanna. Ítarlegar upplýsingar um fullgildingarrannsóknir, samantekt á gögnum sem var aflað sem og bakgrunnsupplýsingar um nauðsynlegar breytingar á nothæfisstöðlunum í kjölfar framkvæmdar HSK SP/reglugerðar um flokkun, merkingu og þökkun má finna í bakgrunns- og skýringarskjali Evrópumíðstöðvar um fullgildingu staðgönguáðferða/Stofnunar Sambandslýðveldisins Þýskalands fyrir áhættumat (Bundesinstitut für Risikobewertung, BfR) samsvarandi OECD-viðmiðunarreglu 439 um prófanir (23. heimild).

SIT: Prófun á húðertingu (e. *Skin Irritation Test*)

RHE: Endurgerð húðþekja manns (e. *Reconstructed Human Epidermis*)

## 3. viðbætur

MÆLIÞÆTTIR Í AÐFERÐARLÝSINGU SEM ERU SÉRTÆKIR FYRIR HVERT PRÓFUNARLÍKAN SEM ÞESSI PRÓFUNARADFERÐ NÆR YFIR

Líkönin með endurgerðri húðþekju manns eru með mjög svipaðar aðferðarlýsingar og einkum er í þeim öllum notað 42 klst. tímabil eftir stöðutíma (32.–35. heimild). Mismunurinn varðar aðallega þrjá mæliþætti í tengslum við mismunandi tálmaþekki prófunarlíkananna og er tilgreindur hér: A) tími og magn fyrir ræktun, B) prófunaríðefnið sett á og C) magn eftir ræktun

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
--	---------------	------------------------	----------------	-------------------------

## A) Fyrir ræktun

Ræktunartími	18–24 klst.	18–24 klst.	< 2 klst.	15–30 klst.
Magn ætis	2 ml	0,9 ml	0,3 eða 1 ml	0,5 ml

## B) Prófunaríðefnið sett á

Fyrir vökva	10 µl (26 µl/cm <sup>2</sup> )	30 µl (47 µl/cm <sup>2</sup> )	16 µl (32 µl/cm <sup>2</sup> )	25 µl (83 µl/cm <sup>2</sup> )
Fyrir föst efni	10 mg (26 mg/cm <sup>2</sup> ) + EV (5 µl)	25 mg (39 mg/cm <sup>2</sup> ) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm <sup>2</sup> ) + EV (10 µl)	25 mg (83 mg/cm <sup>2</sup> ) + EV (25 µl)
Notkun nælonmöska	Ekki notaður	Ef þörf krefur	Notaður	Ekki notaður
Heildarásætningartími	15 mínútur	60 mínútur	42 mínútur	15 mínútur
Ásetningarhitastig	SH	a) við SH í 25 mínútur b) við 37 °C í 35 mínútur	SH	SH

## C) Magn eftir ræktun

Magn ætis	2 ml	0,9ml x 2	2 ml	1 ml
-----------	------	-----------	------	------

## D) Hámark ásættanlegs breytileika

Staðalfrávik milli samhliða vefjasýna	SD≤18	SD≤18	SD≤18	SD≤18
---------------------------------------	-------	-------	-------	-------

SH: Stofuhiti

EV: eimað vatn

DPBS: Fosfatjöfnuð saltlausn Dulbecco



## 4. viðbætur

HELSTU MÆLIÞÆTTIR OG SAMÞYKKTARVIÐMIÐANIR FYRIR HÆFI LITRÓFSMÆLINGAKERFIS MEÐ HÁÞRÝSTI-  
/ÚTHÁÞRÝSTIVÖKVASKILJUN TIL MÆLINGAR Á MTT-FORMASANI SEM ER DREGIÐ ÚR VEF ENDURGERÐRAR HÚÐÞEKJU  
MANNS

Mæliþáttur	Aðferðarlýsing úr leiðbeiningum matvæla- og lyfjaeftirlits Bandaríkjanna (36. og 37. heimild)	Samþykktarviðmiðanir
Valvísi	Greining á ísóprópanóli, lifandi blanksýni (ísóprópanólútdráttur úr lifandi vef endurgerðrar húðþekju manns án meðhöndlunar), dautt blanksýni (ísóprópanólútdráttur úr dauðum vef endurgerðrar húðþekju manns án meðhöndlunar)	Svæðitrufun $\leq 20\%$ af svæðilLOQ <sup>(1)</sup>
Samkvæmni	Gæðaeftirlit (þ.e. MTT-formasan við 1,6µg/ml, 16 µg/ml og 160 µg/ml) í ísóprópanóli (n=5)	FS $\leq 15\%$ eða $\leq 20\%$ vegna LLOQ
Nákvæmni	Gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n=5)	% frávika $\leq 15\%$ eða $\leq 20\%$ vegna LLOQ
Áhrif efniviðarins	Gæðaeftirlit í lifandi blanksýni (n=5)	85% $\leq$ áhrif efniviðarins $\leq 115\%$
Yfirfærsla	Greining á ísóprópanóli eftir staðli ULOQ <sup>(2)</sup>	Svæðitrufun $\leq 20\%$ af svæðilLOQ
Samanburðarnákvæmni (innan sama dags)	Þrjú óháðir kvörðunarferlar (á grundvelli sex samfelldra þynninga MTT-formasans í ísóprópanól í hlutföllum 1:3, þar sem byrjað er á ULOQ, þ.e. 200 µg/ml).  Gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n=5)	Kvörðunarferlar: % frávika $\leq 15\%$ eða $\leq 20\%$ vegna LLOQ
Samanburðarnákvæmni (innan sama dags)	1. dagur: Einn kvörðunarferill og gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n=3)  2. dagur: Einn kvörðunarferill og gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n=3)  3. dagur: Einn kvörðunarferill og gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n=3)	Gæðaeftirlit: % frávika $\leq 15\%$ og FS $\leq 15\%$
Skammtíma stöðugleiki MTT-formasans í út-drætti úr vef úr endurgerðri húðþekju manns	Gæðaeftirlit í lifandi blanksýni (n=3), greint á degi tilreiðslu og eftir 24 klst. geymslu við stofuhita	% frávika $\leq 15\%$
Langtímastöðugleiki MTT-formasans í út-drætti úr vef úr endurgerðri húðþekju manns, ef þörf krefur	Gæðaeftirlit í lifandi blanksýni (n=3), greint á degi tilreiðslu og eftir nokkurra daga geymslu við tiltekið hitastig (t.d. 4 °C, -20 °C, -80 °C)	% frávika $\leq 15\%$ “

(1) LLOQ: Neðri magnreiningarmörk, skilgreind til að ná yfir 1–2% lífvænleika vefjar, þ.e. 0,8 µg/ml.

(2) ULOQ: Efri magnreiningarmörk, skilgreind þannig að þau eru a.m.k. tvöfalt hærrí en hæsti styrkur MTT-formasans í ísóprópanólútdráttum úr neikvæðum samanburðum sem búist er við, þ.e. 200 µg/ml.

8) Í B-hluta er eftirfarandi köflum bætt við:

„B.63 SKIMUNARPRÓFUN FYRIR EITURHRIF Á ÆXLUN/ÞROSKUN

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 421 um prófanir (2016). OECD-viðmiðunarreglurnar um prófun iðefna eru endurskoðaðar reglulega í ljósi framfara á sviði vísinda. Upprunaleg viðmiðunarregla 421 um skimunarprófanir var samþykkt 1995 á grundvelli aðferðarlýsingar fyrir „Preliminary Reproduction Toxicity Screening Test“ (Bráðabirgðaskimunarprófun fyrir eiturrif á æxlun) sem rædd var á tveimur fundum sérfræðinga í London 1990 (1. heimild) og í Tokyo 1992 (2. heimild).
2. Þessi prófunaraðferð hefur verið uppfærð með endapunktum sem skipta máli fyrir innkirtlatruflandi efni sem eftirfylgni vegna forgangsáðgerðarinnar sem Efnahags- og framfarastofnunin hafði frumkvæði að árið 1998 til að endurskoða fyrirbyggjandi viðmiðunarreglur um prófanir og til að þróa nýjar viðmiðunarreglur um prófanir fyrir skimun og prófun á hugsanlega innkirtlatruflandi efnum (3. heimild). OECD-viðmiðunarregla 407 um prófanir (28 daga rannsókn á eiturrifum hjá nagdýrum við endurtekna skammta um munn, kafli B.7 í þessum viðauka) var t.d. bætt árið 2008 með viðeigandi mælipáttum til að greina virkni prófunariðefna á innkirtla. Markmiðið með uppfærslunni á viðmiðunarreglu 421 um prófanir var að taka með nokkra endapunkta sem skipta máli fyrir innkirtlatruflandi efni í viðmiðunarreglunum um skimunarprófanir þar sem váhrifatímabilin ná yfir nokkur af viðkvæmu þroskunartímabilunum (tímabilin fyrir eða fyrst eftir got).
3. Völdu viðbættu endapunktarnir sem skipta máli fyrir innkirtlatruflandi efni, sem eru einnig í viðmiðunarreglu 443 um prófanir (Framlengd einnar kynslóðar rannsókn á eiturrifum á æxlun, kafli B.56 í þessum viðauka), voru felldir inn í viðmiðunarreglu 421 um prófanir á grundvelli hagkvæmniathugunar þar sem fjallað var um vísindalegar og tæknilegar spurningar í tengslum við innfellingu þeirra sem og hugsanlegar breytingar sem þyrfti að gera á tilhögun prófunarinnar vegna innfellingar þeirra (4. heimild).
4. Þessi prófunaraðferð er ætluð til að fá fram takmarkaðar upplýsingar varðandi áhrif prófunariðefnis á tímgunargetu karl- og kvendýra s.s. kynkirtlastarfsemi, þörunarhegðun, getnað, þroskun fangs og got. Hún er hvorki annar valkostur né kemur í stað fyrirbyggjandi prófunaraðferða B.31, B.34, B.35 eða B.56.

ATRIDI SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

5. Hægt er að nota þessa skimunarprófunaraðferð til að fá fyrstu upplýsingar um hugsanleg áhrif á æxlun og/eða þroskun, annaðhvort á fyrri stigum í mati á eiturefnafræðilegum eiginleikum iðefna eða á iðefnum sem gefa tilefni til áhyggna. Einnig er hægt að nota hana sem hluta af upphaflegum skimunarprófunum á fyrirbyggjandi iðefnum þar sem litlar eða engar eiturefnafræðilegar upplýsingar eru tiltækar, sem skammtastærðarannsókn fyrir ítarlegri rannsóknir á æxlun/þroskun eða þegar það telst viðeigandi af öðrum ástæðum. Þegar rannsóknin er gerð skal fylgja þeim leiðbeinandi meginreglum og atriðum sem lýst er í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 19 um kennsl, mat og notkun á klínískum einkennum sem mannúðlegum endapunktum fyrir tilraunadýr sem eru notuð við öryggismat (5. heimild).
6. Þessi prófunaraðferð veitir ekki tæmandi upplýsingar um alla þætti æxlunar og þroskunar. Einkum gefur hún einungis takmarkaða möguleika til að greina birtingarform sem tengjast váhrifum fyrir got, eftir gotið eða áhrif sem kunna að stafa af váhrifum eftir got. Vegna (m.a.) tiltölulega fárra dýra í skammtahópunum, sérvirkni endapunktanna og þess hversu stutt rannsóknin stendur yfir er ekki hægt að nota þessa aðferð til að sanna afdráttarlaust fullyrðingar um að engin áhrif komi fram. Ef ekki liggja fyrir gögn úr öðrum prófunum á eiturrifum á æxlun/þroskun eru jákvæðar niðurstöður þar að auki gagnlegar fyrir fyrsta hættumat og til að taka ákvarðanir að því er varðar nauðsyn þess að framkvæma viðbótarprófanir og um tímasetningu þeirra.
7. Niðurstöðurnar, sem fást með mælipáttum sem tengjast innkirtlum, skal skoða í tengslum við „OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals“ (hugtakarammi Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir prófun og mat á innkirtlatruflandi iðefnum) (6. heimild). Í þessum hugtakaramma er bættri OECD-viðmiðunarreglu 421 um prófanir haldið á 4. þrepi eins og greiningu í lífi sem veitir upplýsingar um skaðleg áhrif á endapunkta í tengslum við innkirtla. Innkirtlaboð (e. *endocrine signal*) telst þó e.t.v. ekki nægileg sönnun ein og sér um að prófunariðefnið sé innkirtlatruflandi efni.
8. Í þessari prófunaraðferð er gert ráð fyrir að prófunariðefnið sé gefið um munn. Það getur reynst nauðsynlegt að gera breytingar ef aðrar váhrifaleiðir eru notaðar.

9. Áður en þessi aðferð til prófunar á blöndu, sem er framkvæmd til að fá gögn sem fyrirhugað er að nota í eftirlitsskyni, er notuð skal skoðað hvort, og þá af hverju, hún gæti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi. Ekki er þörf á slíkri skoðun ef prófun á blöndunni er krafa af hálfu eftirlitsyfirvalda.
10. Skilgreiningar sem eru notaðar eru gefnar upp í 1. viðbæti.

#### MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

11. Nokkrum hópum karl- og kvendýra er gefið prófunaríðefnið í stigskiptum skömmtum. Karldýr skulu fá skammta í a.m.k. fjórar vikur, til og með dagsins fyrir áætlaðan aflífunardag (að lágmarki í tvær vikur fyrir pörun, á pörunartímabilinu og í u.þ.b. tvær vikur eftir pörun). Í ljósi þess hversu takmarkað skömmtunartímabilið er hjá karldýrum fyrir pörun er frjósemi e.t.v. ekki sérlega næmur mælikvarði á eiturhrif á eistu. Því er nauðsynlegt að framkvæma ítarlega, vefjafræðilega rannsókn á eistunum. Samsetning tveggja vikna skömmtunartímabils fyrir pörun og seinni athuganir á pörun/frjósemi ásamt heildarskömmtunartímabili sem er a.m.k. fjórar vikur, sem er fylgt eftir með ítarlegri vefjameinafræðilegri rannsókn á kynkirtlum karldýranna, telst fullnægjandi til að gera kleift að greina meirihluta áhrifa á frjósemi karldýra og sæðismyndun.
12. Kvendýr skulu fá skammta meðan á rannsókninni stendur. Þetta nær yfir tvær vikur fyrir pörun (með það að markmiði að ná yfir a.m.k. tvo heila gangferla), breytilegan tíma fram að getnaði, lengd meðgöngunnar og a.m.k. þrettán daga að loknu goti, til og með dagsins fyrir áætlaðan aflífunardag.
13. Lengd rannsóknar eftir aðlögun og mat á gangferli fyrir skammtagiöf fer eftir háttalagi kvendýrsins og er u.þ.b. 63 dagar, [a.m.k. 14 dagar fyrir pörun, (allt að) 14 daga pörun, 22 daga meðgöngutími, 13 daga mjólkurskeið].
14. Dýrin eru skoðuð vandlega daglega á inngjafartímabilinu til að greina merki um eiturhrif. Dýr, sem drepast eða eru aflífuð meðan á prófunartímabili stendur, eru krufin og í lok prófunar eru eftirlifandi dýr aflífuð og krufin.

#### LÝSING Á AÐFERÐINNI

##### Val á dýrategund

15. Þessi prófunaraðferð er ætluð til prófunar á rottum. Ef mælipættirnir, sem tilgreindir eru í þessari prófunaraðferð, eru rannsakaðir í öðrum nagdýrum skal rökstyðja það ítarlega. Í alþjóðlegu fullgildingaráætluninni til að greina innkirtlatruflandi efni í OECD-viðmiðunarreglu 407 um prófanir (sem samsvarar kafla B.7 í þessum viðauka) var rottan eina tegundin sem var notuð. Ekki skal nota stofna ef frjósemi þeirra er lítil eða vitað er að þroskunargallar eru algengir. Nota skal heilbrigð dýr, sem hafa aldrei fengið fang, sem hafa ekki verið notuð áður við tilraunir. Tilgreina skal tegund, stofn, kyn, þyngd og aldur tilraunadýranna. Við upphaf rannsóknarinnar ætti breytileiki í þyngd dýranna, sem eru notuð, að vera í lágmarki og ekki víkja meira en 20% frá meðalþyngd hvors kyns um sig. Ef rannsóknin er gerð sem forrannsókn langtímarannsóknar eða rannsóknar á heilli kynslóð er ákjósanlegt að dýr af sama stofni og uppruna séu notuð í báðum rannsóknunum.

##### Aðbúnaður og fóðrun

16. Öll verkferli skulu vera í samræmi við staðbundna staðla um umönnun tilraunadýra. Hiti í vistarverum tilraunadýranna skal vera 22 °C (± 3 °C). Þótt rakastig eigi að vera minnst 30% og helst ekki yfir 70%, nema við þrif á vistarverunum, er kjörteki 50–60%. Nota skal gervilyfsingu og ljóslotan skal vera 12 klukkustundir af birtu og myrkur í 12 klukkustundir. Nota má hefðbundið rannsóknarstofufóður ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni. Val á fóðri kann að ráðast af því að hægt sé að blanda prófunaríðefni í fóðrið á viðeigandi hátt þegar það er gefið með þessari aðferð.

17. Dýrin skulu vera í búri með litlum hópum af sama kyni en þau má hafa hvert í sínu búri ef færð eru vísindaleg rök fyrir því. Þegar dýr eru saman í búri skulu þau ekki vera fleiri en fimm í hverju búri. Þörun skal fara fram í búrum sem eru til þess hentug. Koma skal kvendýrum með fangi hverju fyrir sig í búr og láta þau fá efni til að gera sér bæli. Mjólkandi kvendýrum er komið hverju fyrir sig í búr ásamt afkvæmum þeirra.
18. Greina skal fóðrið reglulega með tilliti til aðskotaefna. Halda skal til haga sýni úr fæðunni þar til skýrslan er tilbúin.

#### **Undirbúningur dýranna**

19. Heilbrigðum, ungum, fullvöxnum dýrum er slembiraðað í samanburðar- og tilraunahópum. Koma skal búrunum þannig fyrir að staðsetning þeirra hafi sem minnst áhrif. Dýrin eru auðkennd, hvert um sig, á einkvæman hátt og höfð í búrum sínum í a.m.k. fimm daga fyrir rannsóknina til að láta þau venjast umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni.

#### **Tilreiðsla skammta**

20. Mælt er með því að prófunaríðefnið sé gefið um munn nema aðrar íkomuleiðir séu taldar heppilegri. Þegar inngjöf um munn er valin er prófunaríðefnið yfirleitt gefið með magafóðrun; þó má að öðrum kosti gefa prófunaríðefni inn með fóðri eða drykkjarvatni.
21. Ef nauðsyn krefur er prófunaríðefnið leyst upp eða útbúin úr því svifblanda í heppilegu burðarefni. Mælt er með því að nota helst lausnir/svifblöndur í vatni, ef þess er kostur, en að öðrum kosti lausnir/ýrulausnir í olíu (t.d. maísolíu) en að þeim slepptum geta lausnir með öðrum burðarefnum komið til greina. Ef notuð eru önnur burðarefni en vatn skulu eitureiginleikar þeirra vera þekktir. Ákvarða skal stöðugleika og einsleitni prófunaríðefnisins í burðarefninu.

#### **VERKFERLI**

#### **Fjöldi og kyn dýra**

22. Mælt er með því að hver hópur innihaldi í upphafi a.m.k 10 karldýr og 12–13 kvendýr. Gangferill kvendýranna er metinn fyrir váhrif og þau dýr sem sýna ekki hefðbundinn 4–5 daga gangferil skulu ekki höfð með í rannsókninni; því er mælt með því að hafa aukakvendýr til að ná upp í 10 kvendýr í hvern hóp. Búist er við að þetta gefi a.m.k. 8 kvendýr með fangi í hverjum hóp, sem er venjulega sá lágmarksfjöldi sem telst viðunandi af kvendýrum með fangi í hverjum hóp, nema ef um er að ræða greinileg eiturrhif. Markmiðið er að fá fram nægilega margar þunganir og afkvæmi til að marktækt mat fái á mætti prófunaríðefnisins til að hafa áhrif á frjósemi, meðgöngu, atferli mæðra og mjólkurgjöf, vöxt og þroskun F1-afkvæmanna frá getnaði fram að 13. degi eftir got.

#### **Skammtur**

23. Almennt skal nota a.m.k. þrjú prófunarhópa og samanburðarhóp. Skammtastærðir geta verið byggðar á upplýsingum úr prófunum á bráðum eiturrhifum eða á niðurstöðum úr rannsóknum með endurteknum skömmtum. Dýrin í samanburðarhópnum skulu fá nákvæmlega sömu meðferð og dýrin í tilraunahópnum að öðru leyti en því að þau fá ekki prófunaríðefnið. Ef burðarefni er notað við inngjöf prófunaríðefnisins skal samanburðarhópurinn fá stærsta skammt sem er notaður af burðarefninu.
24. Velja skal skammtastærðir með hliðsjón af öllum tiltækum gögnum um eiturrhif og eiturefnahvörf. Einnig skal taka tillit til þess að það kann að vera munur á næmleika dýra með fangi og dýra sem eru ekki með fangi. Stærsta skammtastærðin skal valin með það fyrir augum að hún valdi eiturrhifum en ekki dauða eða miklum þjáningum. Eftir það skal velja röð stigminnkandi skammta til að sýna fram á vensl svörunar og mismunandi skammtastærða, ef einhver eru, og að engin merkjanleg, skaðleg áhrif komi fram við minnstu skammtastærð (NOAEL). Oft er ákjósanlegt að nota stuðulinn 2–4 þegar bil milli stigminnkandi skammta eru ákveðin og oft er betra að bæta fjórða prófunarhópnum við en að nota mjög stór bil á milli skammtastærða (t.d. stærri en sem nemur stuðlinum 10).

25. Ef almennra eiturrhifa verður vart (t.d. minni líkamsþyngd, áhrif á lifur, hjarta, lungu eða nýru o.s.frv.) eða annarra breytinga sem eru e.t.v. ekki eitrefnasvörum (t.d. minna fóðurát, stækkun lifur), skulu þau áhrif sem verður vart á næma endapunkta innkirtla túlkuð með fyrirvara.

### Markprófun

26. Ef rannsókn á gjöf um munn með einni skammtastærð sem er a.m.k. 1 000 mg/kg líkamsþyngdar á dag eða samsvarandi hundraðshluti í fóðri eða drykkjarvatni, þar sem notuð eru verkferlin sem lýst er fyrir þessa rannsókn, framkallar engin merkjanleg eiturrhif og ef eiturrhifa er ekki að vænta samkvæmt gögnum um efni með skylda efnabyggingu kann fullnaðarrannsókn með mörgum skammtastærðum að teljast ónauðsynleg. Markprófunin gildir nema þegar váhrif á menn benda til þess að gefa þurfi stærri skammt um munn. Þegar íkomuleið er önnur, t.d. innöndun eða um húð, ákvarðast sá hámarksstyrkur sem hægt er að ná oft af eðlisefnafræðilegum eiginleikum prófunaríðefnanna.

### Gjöf skammta

27. Dýrunum er gefið prófunaríðefnið daglega, sjö daga vikunnar. Ef prófunaríðefnið er gefið með magafóðrun skal það gert í einum skammti með magaslöngu eða heppilegri inngjafaröngu. Hámarksrúmmál vökva, sem gefa má í einu, ræðst af stærð tilraunadýrsins. Rúmmálið skal ekki vera meira en 1 ml/100 g líkamsþyngdar nema um sé að ræða vatnslausnir en þá má gefa 2 ml/100 g líkamsþyngdar. Ef ekki er um að ræða ertandi eða ætandi prófunaríðefni, sem venjulega hafa í för með sér þeim mun verri áhrif sem styrkleikinn er meiri, skal halda prófunarrúmmálinu sem jöfnustu með því að stilla styrkleikann þannig að rúmmálið haldist stöðugt við allar skammtastærðir.
28. Þegar um er að ræða prófunaríðefni sem er gefið inn með fóðri eða drykkjarvatni er mikilvægt að tryggja að magn prófunaríðefnisins raski ekki venjulegu næringar- eða vökvajafnvægi. Þegar prófunaríðefni er gefið inn með fóðri má nota annaðhvort fastan styrk (í milljónarhlutum) eða fasta skammtastærð, miðað við líkamsþyngd dýranna og skal taka það fram hvor leiðin er farin. Ef prófunaríðefnið er gefið með magafóðrun skal gefa skammtinn á svipuðum tíma á hverjum degi og stilla hann a.m.k. vikulega svo að skammtastærðin sé alltaf sú sama miðað við líkamsþyngd dýrsins.

### Tilraunaáætlun

29. Skömmtun hjá báðum kynjum skal hefjast a.m.k. tveimur vikum fyrir pörun eftir að þau hafa verið látin aðlagast aðstæðum í a.m.k. fimm daga og kvendýrin hafa verið skimuð fyrir eðlilegum gangferlum (á tveggja vikna formedferðartímabili). Rannsóknin skal skipulögð þannig að mat á gangferli hefjist fljótlega eftir að dýrin hafa náð fullum kynþroska. Þetta getur verið aðeins breytilegt milli mismunandi rottustofna á mismunandi rannsóknarstofum, t.d. hjá rottum af stofninum Sprague Dawley þegar þær eru 10 vikna gamlar og hjá rottum af stofninum Wistar þegar þær eru u.þ.b. 12 vikna gamlar. Mæður með afkvæmi skal aflífa á 13. degi eftir got eða stuttu síðar. Gotdagurinn (þ.e. þegar goti er lokið) er skilgreindur sem dagur 0 eftir got. Kvendýr sem sýna engin merki um mökun eru aflífuð 24–26 dögum eftir síðasta dag pörunartímabilsins. Skömmtun er haldið áfram hjá báðum kynjum á pörunartímabilinu. Karldýr skulu áfram fá skammta eftir pörunartímabilið a.m.k. þar til að lágmarki 28 daga heildarskömmtunartímabili hefur verið náð. Þau eru síðan aflífuð eða, að öðrum kosti, skömmtun er haldið áfram fyrir hugsanlega pörun í annað skipti ef ástæða þykir til.
30. Kvendýr af foreldrakynslóðinni skulu áfram fá daglega skammta meðan á meðgöngu stendur og a.m.k. fram að 13. degi eftir got og að honum meðtöldum eða þangað til daginn fyrir aflífun. Að því er varðar rannsóknir þar sem prófunaríðefnið er gefið við innöndun eða með íkomuleið um húð skal halda skömmtun áfram a.m.k. fram að 19. degi meðgöngu og að honum meðtöldum og hefja skal skömmtun aftur eins fljótt og auðið er og ekki síðar en á 4. degi eftir got.
31. Skýringarmynd af tilraunaáætluninni er að finna í 2. viðbæti.

### Pörunaraðferð

32. Að jafnaði skal nota 1:1 pörun (eitt karldýr fyrir hvert kvendýr) í þessari rannsókn. Frávik geta komið upp ef um er að ræða að karldýr drepast. Kvendýrið skal haft hjá sama karldýrinu þar til vísbendinga um mökun verður vart eða tvær vikur eru liðnar. Á hverjum morgni er leitað að sæði eða leggangatappa í kvendýrunum. Dagurinn þegar staðfestar vísbendingar eru um pörun (leggangatappi eða sæði finnst) telst vera dagur 0 á meðgöngu. Ef pörun mistekst má reyna að para kvendýrið saman við karldýr úr sama hópnum sem hefur reynst frjótt.

**Stærð gots**

33. Á 4. degi eftir got má aðlaga stærð hvers gots með því að fjarlægja aukaunga með slembivali til að eftir verði, eins nálægt því og mögulegt er, fjórir eða fimm ungar af hvoru kyni í hverju goti með hliðsjón af venjulegri gotstærð hjá þeim rottustofni sem er notaður. Taka skal blóðsýni úr tveimur umframungum, hópa þau og nota til að ákvarða magn T4 í sermi. Valvís fjarlæging unga, t.d. á grundvelli líkamsþyngdar eða bils milli endaparmsops og ytri kynfæra, er ekki viðeigandi. Þegar fjöldi karlkyns eða kvenkyns unga gefur ekki kost á fjórum eða fimm af hvoru kyni í hverjum goti má nota ófullkomna aðlögun (t.d. sex karldýr og fjögur kvendýr). Engir ungar skulu fjarlægðir þegar gotstærðin fer undir aflifunarviðmiðið (8 eða 10 ungar/got). Ef einungis er einn ungi umfram aflifunarviðmiðið skal einungis fjarlægja einn unga og nota til blóðsöfnunar fyrir hugsanlegt mat á T4 í sermi.
34. Ef gotstærð er ekki aðlöguð eru tveir ungar úr hverju goti aflífaðir á 4. degi eftir got og blóðsýni tekin til að mæla styrkleika skjaldkirtilshormóna í sermi. Ef hægt er skulu ungarnir tveir úr hverju goti vera kvendýr, til að geyma karlkynsungana fyrir mat á geymd geirvörtu, nema fjarlæging þessara unga verði til þess að engin kvendýr verði eftir fyrir mat við lok prófunarinnar. Ekki skal fjarlægja unga þegar gotstærð er undir 8 eða 10 ungar/got (með hliðsjón af venjulegri gotstærð hjá þeim rottustofni sem er notaður). Ef einungis er einn ungi umfram venjulega gotstærð skal einungis fjarlægja einn unga og nota til blóðsöfnunar fyrir hugsanlegt mat á T4 í sermi.

**Athuganir í lífi***Klínískar athuganir*

35. Almennar klínískar athuganir skulu gerðar a.m.k. einu sinni á dag allt prófunartímabilið og oftar ef merki hafa fundist um eiturrhif. Helst á að gera þær á sama tíma/sömu tímum á hverjum degi að teknu tilliti til þess hvenær vænta má hámarksáhrifa af skammtagjöfni. Skrá skal breytingar á atferli sem máli skipta, merki um erfitt eða langvarandi got og öll merki um eiturrhif, að dauða meðtöldum. Þessar skráningar skulu innihalda upplýsingar um merki um eiturrhif, hvenær þau koma fram, hve mikil þau eru og hve lengi þau vara.

*Líkamsþyngd og fóðurát/vatnsdrykkja*

36. Karl- og kvendýr skulu vigtuð á fyrsta degi skömmtnar, a.m.k. vikulega eftir það og við lok prófunar. Kvendýr skulu vigtuð á meðgöngunni á degi 0, á 7., 14. og 20. degi og innan 24 klst. eftir got (dagur 0 eða 1 eftir got) og a.m.k. á 4. og 13. degi eftir got. Þessar athuganir skal skrá fyrir hvert fullvaxta dýr um sig.
37. Mæla skal fóðurát a.m.k. vikulega á tímabilinu fyrir pörun, á meðgöngu og á mjólkurskeiði. Mælingar á fóðurráti á pörunartímabilinu eru valkvæðar. Einnig skal mæla vatnsdrykkju á þessum tímabilum þegar prófunariðefnið er gefið inn með drykkjarvatni.

*Gangferlar*

38. Vakta skal gangferla áður en meðferð hefst til að velja kvendýr með reglulega gangferla fyrir rannsóknina (sjá 22. lið). Strok úr leggöngum skal einnig vakta daglega frá upphafi meðferðartímabilsins þar til staðfest er að pörun hafi átt sér stað. Ef áhyggjur vakna af bráðum streituáhrifum, sem gætu breytt gangferlum, við upphaf skömmtnar geta rannsóknarstofur látið tilraunadýrin verða fyrir váhrifum í tvær vikur og síðan safnað stroki úr leggöngum daglega til að vakta gangferil í a.m.k. tvær vikur á tímabilinu fyrir pörun og haldið vöktun áfram á pörunartímabilinu þar til staðfest er að pörun hafi átt sér stað. Þegar frumur eru teknar úr leggöngum eða leghálsi skal gæta varúðar svo að ekki verði röskun á slímhúð sem gæti leitt til sýndarþungunar síðar (7.–8. heimild).

*Mælíþættir sem varða afkvæmi*

39. Lengd meðgöngutíma skal skráð og hún er reiknuð frá degi 0 á meðgöngu. Rannsaka skal hvert got eins fljótt og hægt er að loknu goti til að ákvarða fjölda og kyn unganna, fjölda andvana fæddra unga, fjölda lifandi unga, ófullburða unga (unga sem eru talsvert minni en samsvarandi samanburðarungar) og stórsæjan afbrigðileika.

40. Lifandi ungar skulu taldir og kyn þeirra ákvarðað og gotið skal vigtað innan 24 klst. eftir got (dagur 0 eða 1 eftir got) og a.m.k. á 4. og 13. degi eftir got. Auk athugananna sem er lýst í 35. lið skal skrá allt óeðlilegt atferli afkvæmanna.
41. Mæla skal bilið milli endaþarmsops og ytri kynfæra hvers unga á sama degi eftir got, á bilinu frá degi 0 eftir got fram til loka 4. dags eftir got. Mæla skal líkamsþyngd unganna sama dag og bilið milli endaþarmsops og ytri kynfæra er mælt og bilið milli endaþarmsops og ytri kynfæra skal staðlað miðað við mælieiningu fyrir stærð unga, helst þriðju rót af líkamsþyngd (9. heimild). Telja skal fjölda geirvartna/vörtubauga hjá karlkynsungum á 12. eða 13. degi eftir got, eins og mælt er með í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 151 (10. heimild).

### **Klínísk lífefnafræði**

42. Blóðsýni eru tekin úr skilgreindum stað á grundvelli eftirfarandi áætlunar:

- úr a.m.k. tveimur ungum í hverju goti á 4. degi eftir got ef fjöldi unga gerir það kleift (sjá 33.–34. lið)
- úr öllum mæðrum og a.m.k. tveimur ungum í hverju goti við lok prófunarinnar á 13. degi, og
- úr öllum fullvöxnum karldýrum við lok prófunarinnar.

Öll blóðsýni eru geymd við viðeigandi skilyrði. Blóðsýni úr ungum á 13. degi og fullvöxnum karldýrum eru metin m.t.t. styrkleika skjaldkirtilhormóna (T4) í sermi. Framkvæma skal frekara mat á T4 í blóðsýnum úr mæðrum og ungum á 4. degi, ef við á. Annar valkostur er að mæla önnur hormón, ef við á. Hægt er að hópa blóð úr ungum eftir goti til greiningar á skjaldkirtilhormónum. Skjaldkirtilhormóna (T4 og TSH) skal helst mæla sem eitt heildargildi.

43. Eftirfarandi þættir geta haft áhrif á breytileika og hreinan styrk við ákvörðun á hormónum:

- aflífunartími vegna daglegs breytileika í hormónastyrkleikum
- aðferð við aflífun til að koma í veg fyrir óþarfa álag á dýrin sem gæti haft áhrif á hormónastyrkleika
- prófunarsett fyrir ákvarðanir á hormónum sem geta haft mismunandi staðalferla.

44. Blóðvökvasýni, sem eru sérstaklega ætluð til ákvörðunar á hormónum, skal taka á svipuðum tíma dags. Tölugildin sem fást þegar hormónastyrkleikar eru greindir eru breytileg eftir því hver hinna ýmsu greiningarsetta á markaði eru notuð.

### **Meinafræði**

#### *Stórsæ krufning*

45. Skoða skal fullvöxnu dýrin með berum augum eftir aflífun eða ef dýrin drepast í rannsókninni til að leita að afbrigðileika eða sjúklegum breytingum. Gefa skal líffærum æxlunarkerfisins sérstakan gaum. Skrá skal fjölda tilvika hreiðrunar. Að morgni krufningardags skal skoða strok úr leggöngum til að ákvarða hvar dýrin eru stödd í gangferlinum og til að ná fram samsvörun við vefjameinafræðilega rannsókn á eggjastokkum.
46. Skera skal alla aðliggjandi vefi frá eistum og eistalyppum, sem og blöðruhálskirtli og sáðblöðrum með hlaupkirtlum í heild sinni, allra fullvaxinna karldýra, eftir því sem við á, og þessi líffæri skulu vigtuð blaut eins fljótt og hægt er eftir krufningu til að komast hjá því að þau þorni. Að auki er valkvætt að vigta fleiri líffæri s.s. lyftivöðva endaþarms og klumbu- og vattarvöðvann, klumbukirtla og reðurhúfu karldýra og eggjastokka (blautvigt) og leg (þ.m.t. legháls) kvendýra; ef þessar vigtanir eru hafðar með skulu þær framkvæmdar eins fljótt og hægt er eftir krufningu.
47. Dauða unga og unga sem eru aflífaðir á 13. degi eftir got eða stuttu síðar skal a.m.k. skoða vandlega m.t.t. stórsærra afbrigðileika. Gefa skal sérstakan gaum að ytri æxlunarfærum og skoða hvort þar sjáist merki um frávík frá eðlilegri þroskun. Á 13. degi skal varðveita skjaldkirtillinn úr 1 karlkynsungu og 1 kvenkynsungu í hverju goti.

48. Varðveita skal eggjastokka, eistu, aukalíffæri kynkerfis (leg og legháls, eistalyppu, blöðruhálskirtil, sáðblöðru með hlaupkirtlum), skjaldkirtil og öll líffæri, sem sýna stórsæjar vefjaskemmdir, úr öllum fullvöxnum dýrum. Ekki er mælt með formalíni sem festingu fyrir venjubundna rannsókn á eistum og eistalyppum. Notkun á Bouin-festiefni eða breyttu Davidsons-festiefni fyrir þessa vefi er ásættanleg aðferð (11. heimild). Gata má hvíthjúpinn varlega og grunnt með nál á báðum endum líffærisins til að auðvelda gegnumflæði festiefnisins.

#### *Vefjameinafræðileg rannsókn*

49. Framkvæma skal ítarlega vefjafræðilega rannsókn á eggjastokkum, eistum og eistalyppum (þar sem sérstök áhersla er lögð á stig sæðismyndunar og vefjameinafræðilega rannsókn á byggingu millifruma í eistum) dýranna í hópnum sem fékk stærsta skammtinn og samanburðarhópnum. Önnur varðveitt líffæri þ.m.t. skjaldkirtill úr ungunum og fullvöxnum dýrum, má rannsaka þegar þörf krefur. Þyngd skjaldkirtils er hægt að mæla eftir festingu. Einnig skal skorið frá með mikilli varúð og eingöngu eftir festingu til að koma í veg fyrir vefjaskemmdir. Vefjaskemmdir geta spilt vefjameinafræðilegri greiningu. Rannsóknirnar skulu einnig ná til dýra úr öðrum skammtahópum ef breytingar finnast í hópnum sem fær stærsta skammtinn. Í leiðbeiningum um vefjameinafræði (11. heimild) er að finna fleiri upplýsingar um krufningu, festingu, sneiðingu og vefjameinafræðilega rannsókn á innkirtlavefjum.

#### GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

##### **Gögn**

50. Skrá skal gögn um hvert einstakt dýr. Að auki skal taka öll gögn saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp, fjöldi dýra við upphaf prófunar, fjöldi dýra sem drápuð í prófuninni eða voru aflífuð af mannúðarástæðum, tími dauðsfalla eða aflífana af mannúðarástæðum, fjöldi frjórna dýra, fjöldi kvendýra með fangi, fjöldi dýra sem sýna merki um eiturrhif, lýsing á þeim merkjum sem koma fram um eiturrhif, þ.m.t. hvenær þau koma fram, hve lengi þau vara og hve alvarleg eiturrhifin eru og hvers konar vefjameinafræðilegar breytingar urðu, auk allra gagna um gotið sem máli skipta. Snið yfirlitsskýrslu í töfluformi, sem hefur reynst mjög gagnleg við mat á áhrifum á æxlun/þroskun, er að finna í 3. viðbæti.
51. Vegna takmarkaðs umfangs rannsóknarinnar hafa tölfræðilegar greiningar í formi prófana m.t.t. „marktækni“ takmarkað gildi að því er varðar marga endapunkta, einkum æxlunarendapunkta. Ef tölfræðilegar greiningar eru notaðar skal aðferðin, sem valin er, hæfa dreifingu breytanna sem rannsakaðar eru og hún skal valin áður en rannsóknin hefst. Tölfræðileg greining á bili milli endaparmsops og ytri kynfæra og á geymd geirvörtu skal byggjast á gögnum fyrir hvern unga, að teknu tilliti til áhrifa frá goti. Eftir því sem við á er gotið greiningareiningin. Tölfræðileg greining á líkamsþyngd unga skal byggjast á gögnum fyrir hvern unga, að teknu tilliti til stærðar gotsins. Sökum þess að hópurinn er lítil getur notkun á sögulegum samanburðargögnum (t.d. fyrir stærð gots), ef þau liggja fyrir, einnig verið gagnleg til að auðvelda túlkun á rannsókninni.

##### **Mat á niðurstöðum**

52. Meta skal niðurstöðurnar úr þessari rannsókn á eiturrhifum með tilliti til þeirra áhrifa sem verður vart, niðurstaðna úr krufningum og smásjárrannsóknum. Matið skal ná til tengsla milli skammtsins af prófunariðefninu annars vegar og þess hvort frávik koma fram eða ekki og tíðni og alvarleika afbrigðileika hins vegar, þ.m.t. stórsæjar vefjaskemmdir, tiltekin marklíffæri, ófrjósemi, klínísk frávik, áhrif á æxlun og got, breytingar á líkamsþyngd, áhrif á dánartíðni og öll önnur eiturrhif.
53. Sökum þess að meðferðartímabil karldýranna er stutt skal skoða vefjameinafræðilega rannsókn á eistum og eistalyppum ásamt frjósemisgögnunum þegar áhrif á æxlun karldýra eru metin. Notkun rannsóknarsögulegra samanburðargagna um æxlun/þróun (t.d. um stærð gots, bil milli endaparmsops og ytri kynfæra, geymd geirvörtu, magn T4 í sermi), ef þau liggja fyrir, getur einnig verið gagnleg til að auðvelda túlkun á rannsókninni.
54. Að því er varðar gæðaeftirlit er mælt með því að rannsóknarsögulegum samanburðargögnum verði safnað saman og að fráviksstuðull verði reiknaður út fyrir töluleg gögn, einkum fyrir mæliþættina sem tengjast greiningu á innkirtlatruflandi efnunum. Þessi gögn má nota til samanburðar þegar raunverulegar rannsóknir eru metnar.



**Prófunarskýrsla**

55. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

*Prófunaríðefni:*

- uppruni, lotunúmer, síðasti notkunardagur, ef hann liggur fyrir
- stöðugleiki prófunaríðefnisins, ef hann er þekktur.

Efni með einum efnisþætti:

- útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,
- efnafræðileg sannaingreining, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.

Fjölpáttæfni, UVCB-efni og blöndur:

- lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.

*Burðarefni (ef við á):*

- rök fyrir vali á burðarefni, ef það er ekki vatn.

*Tilraunadýr:*

- tegund eða stofn sem er notaður,
- fjöldi, aldur og kyn dýra,
- uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,
- þyngd hvers dýrs við upphaf prófunarinnar,
- rökstuðningur fyrir öðrum tegundum en rottum.

*Prófunarskilyrði:*

- rök fyrir vali á skammtastærð,
- upplýsingar um samsetningu prófunaríðefnisins eða blöndun þess í fóður, styrk sem náðist og stöðugleika og einsleitni blöndunnar,
- upplýsingar um það hvernig prófunaríðefnið er gefið,
- umreikningur á styrk prófunaríðefnisins (í milljónarhlutum) í fóðri/drykkjarvatni yfir í raunskammtastærð (mg/kg líkamsþyngdar á dag), ef við á,

- upplýsingar um gæði fódurs og vatns,
- nákvæm lýsing á verklagi við slembiröðun við val á ungum sem skal aflífa, ef aflífun fer fram.

*Niðurstöður:*

- líkamsþyngd/breytingar á líkamsþyngd,
- fódurát og vatnsdrykkja, ef það liggur fyrir,
- gögn um eiturefnasvörun eftir kyni og skammti, þ.m.t. frjósemi, meðganga og öll önnur merki um eiturrhrif,
- lengd meðgöngu,
- eiturrhrif eða önnur áhrif á æxlun, afkvæmi, vöxt eftir got o.s.frv.,
- eðli þeirra atriða sem koma fram við klíníska athugun, alvarleiki þeirra og varanleiki (hvort þau geta gengið til baka eða ekki),
- fjöldi fullvaxinna kvendýra með eðlilegan eða afbrigðilegan gangferil og gangferils lengd,
- fjöldi lifandi fæddra unga og fósturláta eftir hreiðrun,
- upplýsingar um líkamsþyngd unga,
- bil milli endaðarmsops og ytri kynfæra allra unga (og líkamsþyngd sama dag og bilið milli endaðarmsops og ytri kynfæra er mælt),
- geymd geirvörtu hjá karlkyns ungum,
- skjaldkirtilshormónagildi, ungar á 13. degi og fullvaxin karldýr (og mæður og ungar á 4. degi, ef mæld),
- fjöldi unga með stórsæjan afbrigðileika, almennt mat á ytri kynfærum, fjöldi ófullburða afkvæma,
- dauðastund í rannsókninni eða hvort dýrin lifa til loka rannsóknarinnar,
- fjöldi hreiðrana, gotstærð og þyngd gots á skráningartímanum,
- líkamsþyngd við aflífun og gögn um þyngd líffæra úr dýrum af foreldrakynslóð,
- niðurstöður krufningar,
- ítarleg lýsing á vefjameinafræðilegum niðurstöðum,

- gögn um frásög, liggi þau fyrir,
- tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna, eftir því sem við á.

*Um fjöllum um niðurstöður.*

*Ályktanir.*

### **Túlkun niðurstaðna**

56. Í þessari rannsókn eru eiturhrif á æxlun/þroskun metin í tengslum við endurtekna skammtagjöf (sjá 5. og 6. lið). Hún getur gefið vísbendingar um nauðsyn þess að gera frekari rannsóknir og veitir leiðbeiningar um útfærslu á síðari rannsóknnum. Styðjast skal við leiðbeiningarskjal Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 43 við túlkun niðurstaðna úr rannsóknnum á æxlun og þroskun (12. heimild). Í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 106 um vefjafræðilegt mat prófana á innkirtlum og æxlun nagdýra) (11. heimild) eru veittar upplýsingar um undirbúning og mat á (innkirtlum) líffærum og stroki úr leggöngum sem getur verið gagnlegt fyrir þessa viðmiðunarreglu.

### **HEIMILDIR**

- 1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic and Cooperation and Development, Paris.
- 2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Available Upon Request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Available Upon Request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 5) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 6) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.
- 8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.
- 9) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

- 10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No106), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

*I. viðbætur.*

SKILGREININGAR (SJÁ EINNIG LEIÐBEININGARSKJAL EFNAHAGS- OG FRAMFARASTOFNUNARINNAR NR. 150 (6. HEIMILD))

Andrógenvirkni: eiginleiki íðefnis til að virka eins og náttúrulegt andrógenhormón (t.d. testósterón) í spendýri.

(and)andrógenvirkni: eiginleiki íðefnis til að bæla niður virkni náttúrulegs andrógenhormóns (t.d. testósteróns) í spendýri.

(and)estrógenvirkni: eiginleiki íðefnis til að bæla niður virkni náttúrulegs estrógenhormóns (t.d. estradíóls 17β) í spendýri.

(and)skjaldkirtilsvirkni: eiginleiki íðefnis til að bæla niður virkni náttúrulegs skjaldkirtilshormóns (t.d. T3) í spendýri.

Íðefni: efni eða blanda.

Eiturhrif á þroskun: birtingarform eiturrhifa á æxlun í formi gerðarrasks (e. *structural disorder*) eða starfsemistruflunar hjá afkvæmunum fyrir fæðingu, í fæðingu eða eftir fæðingu.

Skömmtun: almennt hugtak sem er notað um skammt, hversu oft hann er gefinn og hve lengi.

Skammtur: það magn prófunaríðefnis sem er gefið. Skammturinn er gefinn upp sem þyngd prófunaríðefnis á hverja líkamsþyngdareiningu tilraunadýrs (t.d. mg/kg líkamsþyngdar á dag) eða sem stöðugur styrkur í fóðri.

Augljós eiturrhif: almennt hugtak sem lýsir greinilegum merkjum um eiturrhif í kjölfar þess að prófunaríðefni er gefið. Þau ættu að nægja fyrir hættumat og vera þess eðlis að búast megi við að aukning á gefnum skammti leiði til þess að merki um alvarlega eitrun komi fram og leiði líklega til dauða.

Skerðing á frjósemi: röskun á tímgunarstarfsemi eða tímgunargetu karl- eða kvendýra.

Eiturrhif á móður: skaðleg áhrif á kvendýr með fangi sem eiga sér stað annað hvort á sértækan hátt (bein áhrif) eða ósértækan hátt (óbein áhrif).

NOAEL: skammstöfun á „no observed adverse effect level“ sem merkir „mörk um engin merkjanleg, skaðleg áhrif“. Þetta er stærsta skammtastærðin sem veldur engum merkjanlegum, skaðlegum, meðferðartengdum áhrifum vegna meðferðarinnar.

Estrógenvirkni: eiginleiki íðefnis til að virka eins og náttúrulegt estrógenhormón (t.d. estradíól 17β) í spendýri.

Eiturhrif á æxlun: skaðleg áhrif á afkvæmi og/eða skerðing á tímgunarstarfsemi eða tímgunargetu karl- og kvendýra.

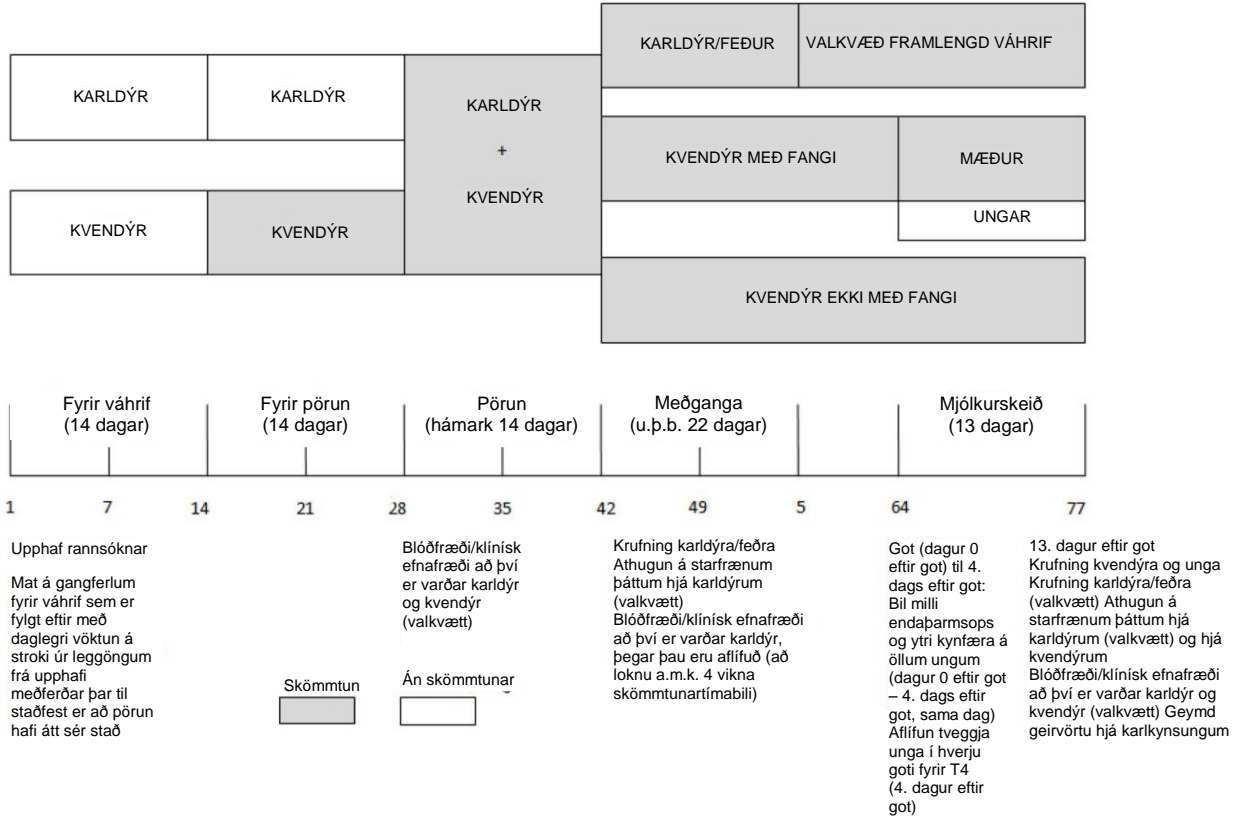
Prófunariðefni: sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

Skjaldkirtilsvirkni: eiginleiki íðefnis til að virka eins og náttúrulegt skjaldkirtilshormón (t.d. T3) í spendýri.

Fullgilding: vísindalegt ferli hannað til að lýsa rekstrarlegum kröfum og takmörkunum prófunaraðferðar og til að sýna fram á áreiðanleika og vægi í tilteknum tilgangi.

2. viðbætur.

SKÝRINGARMYND AF TILRAUNAÁÆTLUN SEM SÝNIR HÁMARKSLENGD RANNSÓKNAR, BYGGT Á HEILU 14 DAGA PÖRUNARTÍMABILI



## 3. viðbætur.

## YFIRLITSSKÝRSLA Í TÖFLUFORMI UM ÁHRIF Á ÆXLUN/ÞROSKUN

ATHUGANIR	GILDI				
	0 (samanburðarsýni)	...	...	...	...
Skammtur (einingar)					
Dýr sett saman í pör (N)					
Gangferill (a.m.k. meðallengd og tíðni óreglulegra ferla)					
Kvendýr sem sýna merki um mökun (N)					
Kvendýr sem hafa fest fang (N)					
Getnaður, dagar 1–5 (N)					
Getnaður, dagar 6–... ( <sup>1</sup> ) (N)					
Meðganga ≤ 21 dagur (N)					
Meðganga = 22 dagar (N)					
Meðganga ≥ 23 dagar (N)					
Mæður með lifandi nýfædda unga (N)					
Mæður með lifandi unga á 4. degi eftir got (N)					
Fang/móðir (meðaltal)					
Lifandi ungar/mæður við got (meðaltal)					
Lifandi ungar/mæður á 4. degi (meðaltal)					
Kynjahlutfall (kk/kvk) við got (meðaltal)					
Kynjahlutfall (kk/kvk) á 4. degi (meðaltal)					
Gotsþyngd við got (meðaltal)					
Gotsþyngd á 4. degi (meðaltal)					
Þyngd unga við got (meðaltal)					
Þyngd unga þegar bil milli endaparmsops og ytri kynfæra er mælt (meðaltal karldýra, meðaltal kvendýra)					



ATHUGANIR	GILDI				
Skammtur (einingar)	0 (samanburðarsýni)	...	...	...	...
Bil milli endaðarmsops og ytri kynfæra unga á sama degi eftir got, frá gotdegi – 4. dags (meðaltal karldýra, meðaltal kvendýra, athugasemdir á sama degi eftir got)					
Þyngd unga á 4. degi (meðaltal)					
Geymd geirvörtu hjá karlkynsungum á 13. degi (meðaltal)					
Þyngd unga á 13. degi (meðaltal)					

**AFBRIGÐILEGIR UNGAR**

Mæður með 0					
Mæður með 1					
Mæður með 2					

**TAP AFKVÆMA****Fyrir got/eftir hreiðrun (hreiðrun mínus lifandi fæddir ungar)**

Kvendýr með 0					
Kvendýr með 1					
Kvendýr með 2					
Kvendýr með 3					

**Eftir got (lifandi fæddir ungar mínus lifandi á 13. degi eftir got)**

Kvendýr með 0					
Kvendýr með 1					
Kvendýr með 2					
Kvendýr með 3					

(1) síðasti dagur þörunartímabilsins

**B.64 SAMEINUÐ RANNSÓKN Á EITURHRIFUM VIÐ ENDURTEKNA SKAMMTA OG SKIMUNARPRÓFUN FYRIR EITURHRIFUM Á ÆXLUN/ÞROSKUN**

## INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 422 um prófanir (2016). OECD-viðmiðunarreglurnar um prófun íðefna eru endurskoðaðar reglulega í ljósi framfara á sviði vísinda. Upprunaleg viðmiðunarregla 422 um skimunarprófanir var samþykkt 1996 á grundvelli aðferðarlýsingar fyrir „Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Screening Test“ (Sameinuð skimunarprófun við endurtekna skammta og eiturrhif á æxlun/þroskun) sem rædd var á tveimur fundum sérfræðinga í London 1990 (1. heimild) og í Tokyo 1992 (2. heimild).
2. Þessi prófunaraðferð sameinar hlutann um skimun fyrir eiturrhifum á æxlun/þroskun, sem byggir á fenginni reynslu í aðildarríkjunum af notkun upprunalegu aðferðarinnar fyrir fyrirliggjandi stórframleiðsluíðefni og í rannsóknarprófunum með jákvæðum samanburðarefnum (3. og 4. heimild), og hlutann um eiturrhif við endurtekna skammta í samræmi við OECD-viðmiðunarreglu 407 um prófanir (28 daga rannsókn á eiturrhifum hjá nagdýrum við endurtekna skammta um munn, kafli B.7 í þessum viðauka).
3. Þessi prófunaraðferð hefur verið uppfærð með endapunktum sem skipta máli fyrir innkirtlatruflandi efni sem eftirfylgni vegna forgangsaðgerðarinnar sem Efnahags- og framfarastofnunin hafði frumkvæði að árið 1998 til að endurskoða fyrirliggjandi viðmiðunarreglur um prófanir og til að þróa nýjar viðmiðunarreglur um prófanir fyrir skimun og prófun á hugsanlega innkirtlatruflandi efnum (5. heimild). Í þessu samhengi var viðmiðunarregla 407 (sem samsvarar kafla B.7 í þessum viðauka) bætt árið 2008 með viðeigandi mæliþáttum til að greina virkni prófunaríðefna á innkirtla. Markmiðið með uppfærslunni á viðmiðunarreglu 422 um prófanir var að taka með nokkra endapunkta sem skipta máli fyrir innkirtlatruflandi efni í viðmiðunarreglunum um skimunarprófanir þar sem váhrifatímabilin ná yfir nokkur af viðkvæmu þroskunartímabilunum (tímabilin fyrir eða fyrst eftir got).
4. Völdu viðbættu endapunktarnir sem skipta máli fyrir innkirtlatruflandi efni, sem eru einnig í viðmiðunarreglu 443 um prófanir (Framlengd einnar kynslóðar rannsókn á eiturrhifum á æxlun sem samsvarar kafla B.56 í þessum viðauka), voru felldir inn í viðmiðunarreglu 422 um prófanir á grundvelli hagkvæmniathugunar þar sem fjallað var um vísindalegar og tæknilegar spurningar í tengslum við innfellingu þeirra sem og hugsanlegar breytingar sem þyrfti að gera á tilhögun prófunarinnar vegna innfellingar þeirra (6. heimild).
5. Þessi prófunaraðferð er ætluð til að fá fram takmarkaðar upplýsingar varðandi áhrif prófunaríðefnis á tímgunargetu karl- og kvendýra s.s. kynkirtlastarfsemi, þörunarhegðun, getnað, þroskun fangs og got. Hún er hvorki annar valkostur né kemur í stað fyrirliggjandi prófunaraðferða B.31, B.34, B.35 eða B.56.

## ATRIDI SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

6. Við mat á eitureiginleikum prófunaríðefnis má ákvarða eiturrhif um munn með inngjöf endurtekinna skammta eftir að fyrstu upplýsinga um eiturrhif hefur verið aflað með prófunum á bráðum eiturrhifum. Með þessari rannsókn fást upplýsingar um hugsanlegar heilbrigðishættur vegna endurtekinna váhrifa í tiltölulega takmarkaðan tíma. Aðferðin felst í grunnrannsókn á eiturrhifum við endurtekna skammta sem hægt er að nota fyrir íðefni þar sem ekki er tilefni til að nota 90 daga rannsókn (t.d. þegar framleiðslumagnið fer ekki yfir tiltekin mörk) eða sem forrannsókn langtímarannsóknar. Þegar rannsóknin er gerð skal fylgja þeim leiðbeinandi meginreglum og atriðum sem lýst er í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 19 um kennsl, mat og notkun á klínískum einkennum sem mannúðlegum endapunktum fyrir tilraunadýr sem eru notuð við öryggismat (7. heimild).
7. Hún felur enn fremur í sér skimunarprófun fyrir eiturrhifum á æxlun/þroskun og er því hægt að nota hana til að fá fyrstu upplýsingar um hugsanleg áhrif á tímgunargetu karl- og kvendýra s.s. kynkirtlastarfsemi, mökunarhegðun, getnað, þroskun fangs og got, annaðhvort á fyrri stigum í mati á eiturefnafræðilegum eiginleikum íðefna eða á íðefnum sem gefa tilefni til áhyggna. Þessi prófunaraðferð veitir ekki tæmandi upplýsingar um alla þætti æxlunar og þroskunar. Einkum gefur hún einungis takmarkaða möguleika til að greina birtingarform sem tengjast váhrifum fyrir got, eftir gotið eða áhrif sem kunna að stafa af váhrifum eftir got. Vegna (m.a.) sérvirkni endapunktanna og þess hversu stutt rannsóknin stendur yfir er ekki hægt að nota þessa aðferð til að sanna afdráttarlaust fullyrðingar um að engin áhrif komi fram á æxlun/þroskun. Ef ekki liggja fyrir gögn úr öðrum prófunum á eiturrhifum á æxlun/þroskun eru jákvæðar niðurstöður þar að auki gagnlegar fyrir fyrsta hættumat og til að taka ákvarðanir að því er varðar nauðsyn þess að framkvæma viðbótarprófanir og um tímasetningu þeirra.

8. Niðurstöðurnar, sem fást með mæliþáttum sem tengjast innkirtlum, skal skoða í tengslum við „OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals“ (hugtakarammi Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir prófun og mat á innkirtlatruflandi íðefnum) (8. heimild). Í þessum hugtakaramma er bættri OECD-viðmiðunarreglu 422 um prófanir haldið á 4. þrepi eins og greiningu í lífi sem veitir upplýsingar um skaðleg áhrif á endapunkta í tengslum við innkirtla Innkirtlaboð (e. *endocrine signal*) telst þó e.t.v. ekki nægileg sönnun ein og sér um að prófunaríðefnið sé innkirtlatruflandi efni.
9. Í þessari prófunaraðferð er einnig lögð áhersla á taugafræðileg áhrif sem sérstakan endapunktur og áhersla er lögð á vandlegar klínískar athuganir á dýrunum til að fá fram eins miklar upplýsingar og unnt er. Aðferðin miðar að því að sanngreina íðefni sem geta valdið taugaeiturhrifum og slíkt getur gefið tilefni til meiri og ítarlegri rannsókna. Að auki getur aðferðin einnig veitt grunnáendingar um áhrif á ónæmiskerfið.
10. Ef ekki liggja fyrir gögn úr öðrum rannsóknum á altækum eiturhrifum, eiturhrifum á æxlun/þroskun, taugaeiturhrifum og/eða ónæmiseiturhrifum eru jákvæðar niðurstöður gagnlegar fyrir fyrsta hættumat og til að taka ákvarðanir að því er varðar nauðsyn þess að framkvæma viðbótarprófanir og um tímasetningu þeirra. Prófunin getur einkum verið gagnleg sem hluti af „OECD Screening Information Data Set“ (SIDS) (upplýsingagagnasafn OECD vegna skimunar) til að meta fyrirbyggjandi íðefni sem litlar eða engar eitrefnafræðilegar upplýsingar eru tiltækar fyrir og getur verið annar valkostur í stað þess að gera tvær aðskildar prófanir, annars vegar á eiturhrifum við endurtekna skammta (OECD-viðmiðunarregla 407 um prófanir, sem samsvarar kafla B.7 í þessum viðauka) og hins vegar á eiturhrifum á æxlun/þroskun (OECD-viðmiðunarregla 421 um prófanir, sem samsvarar kafla B.63 í þessum viðauka). Einnig er hægt að nota hana sem skammtastærðarannsókn fyrir ítarlegri rannsóknir á æxlun/þroskun eða þegar það telst viðeigandi af öðrum ástæðum.
11. Almennt er gert ráð fyrir að munur sé á næmleika dýra með fangi og dýra sem eru ekki með fangi. Af þessum sökum getur verið flóknara að ákvarða skammtastærðir í þessari sameinuðu prófun, sem eru fullnægjandi til að meta bæði almenn, altæk eiturhrif og tiltekin eiturhrif á æxlun/þroskun, en þegar sjálfstæðar prófanir eru framkvæmdar. Þar að auki getur túlkun niðurstaðna úr prófunum, að því er varðar almenn, altæk eiturhrif, verið erfiðari en þegar aðskilin rannsókn með endurteknum skömmtum er framkvæmd, einkum þegar breytur sem varða sermi og vefjameinafræðilegar athuganir eru ekki metnar á sama tíma í rannsókninni. Vegna þessa tæknilega flækjustígs þarf umtalsverða reynslu af prófunum á eiturhrifum til að framkvæma þessa sameinuðu skimunarprófun. Á hinn bóginn, að því undanskildu að færri dýr eru notuð, getur sameinaða prófunin boðið upp á betri leiðir til að greina á milli beinna áhrifa á æxlun/þroskun og áhrifa sem leiða af öðrum (altækum) áhrifum.
12. Í þessari prófun er skömmtunartímabilið lengra en í hefðbundinni 28 daga rannsókn með endurteknum skömmtum. Í henni eru þó notuð færri dýr af hvoru kyni í hvern hóp þegar borið er saman við ástandið þegar hefðbundin 28 daga rannsókn með endurteknum skömmtum er framkvæmd til viðbótar við skimunarprófun fyrir eiturhrifum á æxlun/þroskun.
13. Í þessari prófunaraðferð er gert ráð fyrir að prófunaríðefnið sé gefið um munn. Það getur reynst nauðsynlegt að gera breytingar ef aðrar váhrifaleiðir eru notaðar.
14. Áður en þessi aðferð til prófunar á blöndu, sem er framkvæmd til að fá gögn sem fyrirhugað er að nota í eftirlitsskyni, er notuð skal skoðað hvort, og þá af hverju, hún gæti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi. Ekki er þörf á slíkri skoðun ef prófun á blöndunni er krafa af hálfu eftirlitsyfirvalda.
15. Skilgreiningar sem eru notaðar eru gefnar upp í 1. viðbæti.

#### MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

16. Nokkrum hópum karl- og kvendýra er gefið prófunaríðefnið í stigskiptum skömmtum. Karldýr skulu fá skammta í a.m.k. fjórar vikur, til og með dagsins fyrir áætlaðan aflífundag (að lágmarki í tvær vikur fyrir þörun, á þörunartímabilinu og í u.þ.b. tvær vikur eftir þörun). Í ljósi þess hversu takmarkað skömmtunartímabilið er hjá karldýrum fyrir þörun er frjósemi e.t.v. ekki sérlega næmur mælikvarði á eiturhrif á eistu. Því er nauðsynlegt að framkvæma ítarlega, vefjafraðilega

rannsókn á eistunum. Samsetning tveggja vikna skömmunartímabils fyrir þörun og seinni athuganir á þörun/frjósemi ásamt heildarskömmunartímabili sem er a.m.k. fjórar vikur, sem er fylgt eftir með ítarlegri vefjameinafræðilegri rannsókn á kynkirtlum karldýranna, telst fullnægjandi til að gera kleift að greina meirihluta áhrifa á frjósemi karldýra og sæðismyndun.

17. Kvendýr skulu fá skammta meðan á rannsókninni stendur. Þetta nær yfir tvær vikur fyrir þörun (með það að markmiði að ná yfir a.m.k. tvo heila gangferla), breytilegan tíma fram að getnaði, lengd meðgöngunnar og a.m.k. þrettán daga að loknu goti, til og með dagsins fyrir áætlaðan aflífunardag.
18. Lengd rannsóknar eftir aðlögun og mat á gangferli fyrir skammtagjöf fer eftir háttalagi kvendýrsins og er u.þ.b. 63 dagar, [a.m.k. 14 dagar fyrir þörun, (allt að) 14 daga þörun, 22 daga meðgöngutími, 13 daga mjólkurskeið].
19. Dýrin eru skoðuð vandlega daglega á inngjafartímabilinu til að greina merki um eiturrhif. Dýr, sem drepast eða eru aflífuð meðan á prófun stendur, eru krufin og í lok prófunar eru eftirlifandi dýr aflífuð og krufin.

#### LÝSING Á AÐFERÐINNI

##### Val á dýrategund

20. Þessi prófunaraðferð er ætluð til prófunar á rottum. Ef mæliþættirnir, sem tilgreindir eru í þessari viðmiðunarreglu 422, eru rannsakaðir í öðrum nagdýrum skal rökstyðja það ítarlega. Í alþjóðlegu fullgildingaráætluninni til að greina innkirtlatruflandi efni, að því er varðar viðmiðunarreglu 407, var rottan eina tegundin sem var notuð. Ekki skal nota stofna ef frjósemi þeirra er lítil eða vitað er að þroskunargallar eru algengir. Nota skal heilbrigð dýr, sem hafa aldrei fengið fang, sem hafa ekki verið notuð áður við tilraunir. Tilgreina skal tegund, stofn, kyn, þyngd og aldur tilraunadýranna. Við upphaf rannsóknarinnar ætti breytileiki í þyngd dýranna, sem eru notuð, að vera í lágmarki og ekki víkja meira en  $\pm 20\%$  frá meðalþyngd hvors kyns um sig. Ef rannsóknin er gerð sem forrannsókn langtímarannsóknar eða rannsóknar á heilli kynslóð er ákjósanlegt að dýr af sama stofni og uppruna séu notuð í báðum rannsóknunum.

##### Aðbúnaður og fóðrun

21. Öll verkferli skulu vera í samræmi við staðbundna staðla um umönnun tilraunadýra. Hiti í vistarverum tilraunadýranna skal vera  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Rakastig skal vera a.m.k. 30% og helst ekki yfir 70%, nema við þrif á vistarverunum. Nota skal gervilýsingu og ljóslotan skal vera 12 klukkustundir af birtu og myrkur í 12 klukkustundir. Nota má hefðbundið rannsóknarstofufóður ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni. Val á fóðri kann að ráðast af því að hægt sé að blanda prófunaríðefni í fóðri á viðeigandi hátt þegar það er gefið með þessari aðferð.
22. Dýrin skulu vera í búri með litlum hópum af sama kyni en þau má hafa hvert í sínu búri ef færð eru vísindaleg rök fyrir því. Þegar dýr eru saman í búri skulu þau ekki vera fleiri en fimm í hverju búri. Þörun skal fara fram í búrum sem eru til þess hentug. Koma skal kvendýrum með fangi hverju fyrir sig í búr og láta þau fá efni til að gera sér bæli. Mjólkandi kvendýrum er komið hverju fyrir sig í búr ásamt afkvæmum þeirra.
23. Greina skal fóðrið reglulega með tilliti til aðskotaefna. Halda skal til haga sýni úr fæðunni þar til skýrslan er tilbúin.

##### Undirbúningur dýranna

24. Heilbrigð, ung, fullvaxin dýr eru valin af handahófi og skipað í meðferðarhópna og búrin. Koma skal búrunum þannig fyrir að staðsetning þeirra hafi sem minnst áhrif. Dýrin eru auðkennd, hvert um sig, á einkvæman hátt og höfð í búrum sínum í a.m.k. fimm daga fyrir rannsóknina til að láta þau venjast umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni.

##### Tilreiðsla skammta

25. Mælt er með því að prófunaríðefnið sé gefið um munn nema aðrar íkomuleiðir séu taldar heppilegri. Þegar inngjöf um munn er valin er prófunaríðefnið yfirleitt gefið með magafóðrun; þó má að öðrum kosti gefa prófunaríðefni inn með fóðri eða drykkjarvatni.

26. Ef nauðsyn krefur er prófunaríðefnið leyst upp eða útbúin úr því svifblanda í heppilegu burðarefni. Mælt er með því að nota helst lausnir/sviflausnir í vatni, ef þess er kostur, en að öðrum kosti lausnir/sviflausnir í olíu (t.d. máisolíu) en að þeim slepptum geta lausnir með öðrum burðarefnum komið til greina. Ef vatnslaus burðarefni eru notuð skulu eitureiginleikar þeirra vera þekktir. Ákvarða skal stöðugleika og einsleitni prófunaríðefnisins í burðarefninu.

#### VERKFERLI

#### Fjöldi og kyn dýra

27. Mælt er með því að hver hópur innihaldi í upphafi a.m.k. 10 karldýr og 12–13 kvendýr. Gangferill kvendýranna er metinn fyrir váhrif og þau dýr sem sýna ekki hefðbundinn 4–5 daga gangferil skulu ekki höfð með í rannsókninni; því er mælt með því að hafa aukakvendýr til að ná upp í 10 kvendýr í hvern hóp. Búið er við að þetta gefi a.m.k. 8 kvendýr með fangi í hverjum hóp, sem er venjulega sá lágmarksfjöldi sem telst viðunandi af kvendýrum með fangi í hverjum hóp, nema ef um er að ræða greinileg eiturrif. Markmiðið er að fá fram nægilega margar þunganir og afkvæmi til að marktækt mat fái á mætti prófunaríðefnisins til að hafa áhrif á frjósemi, meðgöngu, atferli mæðra og mjólkurgjöf, vöxt og þroskun F1-afkvæmanna frá getnaði fram að 13. degi eftir got. Ef áform eru um að aflífa dýr í tilrauninni skal fjölga tilraunadýrum sem nemur þeim fjölda dýra sem ætlunin er að aflífa fyrir lok tilraunarinnar. Vega skal og meta að bæta við fimm dýra fylgihóp af hvoru kyni í samanburðarhópinn og hópinn sem fær stærsta skammtinn svo að hægt sé að fylgjast með þeim í a.m.k. 14 daga eftir meðferð til að kanna hvort altæk eiturrif ganga til baka, eru þrávirk eða síðkomin. Dýr úr fylgihópunum eru ekki pöruð og af þeim sökum eru þau ekki notuð til að meta eiturrif á æxlun/þroskun.

#### Skammtur

28. Almenn skal nota a.m.k. þrjá prófunarhópa og samanburðarhóp. Ef ekki eru til viðeigandi gögn um almenn eiturrif er hægt að gera skammtastærðarrannsókn (með dýrum af sama stofni og uppruna) til að auðvelda ákvörðun á því hvaða skammta skuli nota. Dýrin í samanburðarhópnum skulu fá nákvæmlega sömu meðferð og dýrin í tilraunahópnum að öðru leyti en því að þau fá ekki prófunaríðefnið. Ef burðarefni er notað við inngjöf prófunaríðefnisins skal gefa samanburðarhópnum stærsta skammtinn af burðarefninu.
29. Velja skal skammtastærðir með hliðsjón af öllum tiltækum gögnum um eiturrif og eiturefnahvörf. Einnig skal taka tillit til þess að það kann að vera munur á næmleika dýra með fangi og dýra sem eru ekki með fangi. Stærsta skammtastærðin er valin með það fyrir augum að hún valdi eiturrifum en ekki dauða eða greinilegum þjáningum. Eftir það skal velja röð stigminnkandi skammta til að sýna fram á vensl svörunar og mismunandi skammtastærða, ef einhver eru, og að engin skaðleg áhrif komi fram við minnstu skammtastærð. Oft er ákjósanlegt að nota stuðulinn 2–4 og oft er betra að bæta fjórða prófunarhópnum við en að nota mjög stór bil milli skammtastærða (t.d. stærri en sem nemur stuðlinum 10).
30. Ef almennra eiturrifa verður vart (t.d. minni líkamsþyngd, áhrif á lifur, hjarta, lungu eða nýru o.s.frv.) eða annarra breytinga sem eru e.t.v. ekki eiturefnasvörun (t.d. minna fóðurát, stækkun lifur), skulu þau áhrif sem verður vart á næma endapunkta innkirtla túlkuð með fyrirvara.

#### Markprófun

31. Ef rannsókn á gjöf um munn með einni skammtastærð, sem er a.m.k. 1 000 mg/kg líkamsþyngdar á dag eða samsvarandi hundraðshluti í fóðri (byggist á ákvörðun líkamsþyngdar), þar sem notuð eru verkferlin sem lýst er fyrir þessa rannsókn, framkallar engin merkjanleg eiturrif og ef eiturrifa er ekki að vænta samkvæmt gögnum um efni með skylda efnabyggingu kann fullnaðarrannsókn með mörgum skammtastærðum að teljast ónauðsynleg. Markprófunin gildir nema þegar váhrif á menn benda til þess að nota þurfi stærri skammtastærð. Þegar íkomuleið er önnur, t.d. innöndun eða um húð, ákvarðast hámarksváhrif sem hægt er að ná oft af eðlisefnafræðilegum eiginleikum prófunaríðefnanna.

#### Gjöf skammta

32. Dýrunum er gefið prófunaríðefnið daglega, sjö daga vikunnar. Ef prófunaríðefnið er gefið með magafóðrun skal það gert í einum skammti með magaslöngu eða heppilegri inngjafaröngu. Hámarksrúmmál vökva, sem gefa má í einu, ræðst af stærð tilraunadýrsins. Rúmmálið skal ekki að vera meira en 1 ml/100 g líkamsþyngdar nema um sé að ræða vatnslausnir

en þá má gefa 2 ml/100 g líkamsþyngdar . Ef ekki er um að ræða ertandi eða ætandi prófunaríðefni, sem venjulega hafa í för með sér þeim mun verri áhrif sem styrkleikinn er meiri, skal halda prófunarrúmmálinu sem jöfnustu með því að stilla styrkleikann þannig að rúmmálið haldist stöðugt við allar skammtastærðir.

33. Þegar um er að ræða prófunaríðefni sem eru gefin inn með fóðri eða drykkjarvatni er mikilvægt að tryggja að magn prófunaríðefnisins raski ekki venjulegu næringar- eða vökvajafnvægi. Þegar prófunaríðefni er gefið inn með fóðri má nota annaðhvort fastan styrk (í milljónarhlutum) eða fasta skammtastærð, miðað við líkamsþyngd dýranna og skal taka það fram hvor leiðin er farin. Ef prófunaríðefnið er gefið með magafóðrun skal gefa skammtinn á svipuðum tíma á hverjum degi og stilla hann a.m.k. vikulega svo að skammtastærðin sé alltaf sú sama miðað við líkamsþyngd dýrsins. Ef sameinuð rannsókn er undanfari langtíma- eða fullnaðarrannsóknar á eiturhrifum á æxlun skal fóðrið vera það sama í báðum rannsóknum.

### Tilraunaáætlun

34. Skömmtun hjá báðum kynjum skal hefjast tveimur vikum fyrir pörun eftir að þau hafa verið látin aðlagast aðstæðum í a.m.k fimm daga og kvendýrin hafa verið skimuð fyrir eðlilegum gangferlum (á tveggja vikna formeðferðartímabili). Rannsóknin skal skipulögð þannig að mat á gangferli hefjist fljótlega eftir að dýrin hafa náð fullum kynþroska. Þetta getur verið aðeins breytilegt milli mismunandi rottustofna á mismunandi rannsóknarstofum, t.d. hjá rottum af stofninum Sprague Dawley þegar þær eru 10 vikna gamlar og hjá rottum af stofninum Wistar þegar þær eru u.þ.b. 12 vikna gamlar. Mæður með afkvæmi skal aflífa á 13. degi eftir got eða stuttu síðar. Til að gera það kleift að láta mæður fasta nóttina fyrir blóðsöfnun (ef þessi kostur er valinn) er ekki nauðsynlegt að aflífa mæðurnar og afkvæmi þeirra á sama degi. Gotdagurinn (þ.e. þegar goti er lokið) er skilgreindur sem dagur 0 eftir got. Kvendýr sem sýna engin merki um mökun eru aflífud 24–26 dögum eftir síðasta dag pörunartímabilsins. Skömmtun er haldið áfram hjá báðum kynjum á pörunartímabilinu. Karldýr skulu áfram fá skammta eftir pörunartímabilið a.m.k. þar til að lágmarki 28 daga heildarskömmtunartímabili hefur verið náð. Þau eru síðan aflífud eða, að öðrum kosti, skömmtun er haldið áfram fyrir hugsanlega pörun í annað skipti ef ástæða þykir til.
35. Kvendýr af foreldrakynslóðinni skulu áfram fá daglega skammta meðan á meðgöngu stendur og a.m.k. fram að 13. degi eftir got og að honum meðtöldum eða þangað til daginn fyrir aflífun. Að því er varðar rannsóknir þar sem prófunaríðefnið er gefið við innöndun eða með íkomuleið um húð skal halda skömmtun áfram a.m.k. fram að 19. degi meðgöngu og að honum meðtöldum og hefja skal skömmtun aftur eins fljótt og auðið er og ekki síðar en á 4. degi eftir got.
36. Dýr úr fylgihópi sem er ætlaður til eftirfylgniathugana, ef hann er hafður með, skulu ekki pöruð. Þeim skal haldið í a.m.k. 14 daga til viðbótar eftir fyrstu áætlaða aflífun mæðra, án meðferðar, til að kanna hvort eiturhrifin eru síðkomin, þrávirk eða ganga til baka.
37. Skýringarmynd af tilraunaáætluninni er að finna í 2. viðbæti.

### Gangferlar

38. Vakta skal gangferla áður en meðferð hefst til að velja kvendýr með reglulega gangferla fyrir rannsóknina (sjá 27. lið). Strok úr leggöngum skal einnig vakta daglega frá upphafi meðferðartímabilsins þar til staðfest er að pörun hafi átt sér stað. Ef áhyggjur vakna af bráðum streituáhrifum, sem gætu breytt gangferlum, við upphaf skömmtunar geta rannsóknarstofur látið tilraunadýrin verða fyrir váhrifum í tvær vikur og síðan safnað stroki úr leggöngum daglega til að vakta gangferil í a.m.k. tvær vikur á tímabilinu fyrir pörun og haldið vöktun áfram á pörunartímabilinu þar til staðfest er að pörun hafi átt sér stað. Þegar frumur eru teknar úr leggöngum eða leghálsi skal gæta varúðar svo að ekki verði röskun á slímhúð sem gæti leitt til sýndarþungunar síðar (8.–9. heimild).

### Pörunaraðferð

39. Að jafnaði skal nota 1:1 pörun (eitt karldýr fyrir hvert kvendýr) í þessari rannsókn. Frávik geta komið upp ef um er að ræða að karldýr drepast. Kvendýrið skal haft hjá sama karldýrinu þar til vísbendinga um mökun verður vart eða tvær vikur eru liðnar. Á hverjum morgni er leitað að sæði eða leggangatappa í kvendýrunum. Dagurinn þegar staðfestar vísbendingar eru um pörun (leggangatappi eða sæði finnst) telst vera dagur 0 á meðgöngu. Ef pörun mistekst má reyna að para kvendýrið á ný saman við karldýr úr sama hópnum sem hefur reynst frjótt.

**Stærð gots**

40. Á 4. degi eftir got má aðlaga stærð hvers gots með því að fjarlægja aukaunga með slembivali til að eftir verði, eins nálægt því og mögulegt er, fjórir eða fimm ungar af hvoru kyni í hverju goti með hliðsjón af venjulegri gotstærð hjá þeim rottustofni sem er notaður. Taka skal blóðsýni úr tveimur umframungum, hópa þau og nota til að ákvarða magn T4 í sermi. Valvís fjarlæging unga, t.d. á grundvelli líkamsþyngdar eða bils milli endaparmsops og ytri kynfæra, er ekki viðeigandi Þegar fjöldi karlkyns eða kvenkyns unga gefur ekki kost á fjórum eða fimm af hvoru kyni í hverjum goti má nota ófullkomna aðlögun (t.d. sex karldýr og fjögur kvendýr). Engir ungar skulu fjarlægðir þegar gotstærðin fer undir aflífunarviðmiðið (8 eða 10 ungar/got). Ef einungis er einn ungi umfram aflífunarviðmiðið skal einungis fjarlægja einn unga og nota til blóðsöfnunar fyrir hugsanlegt mat á T4 í sermi.
41. Ef gotstærð er ekki aðlöguð eru tveir ungar úr hverju goti aflífaðir á 4. degi eftir got og blóðsýni tekin til að mæla styrkleika skjaldkirtilshormóna í sermi. Ef hægt er skulu ungarnir tveir úr hverju goti vera kvendýr, til að geyma karlkynsungana fyrir mat á geymd geirvörtu, nema fjarlæging þessara unga verði til þess að engin kvendýr verði eftir fyrir mat við lok prófunarinnar. Ekki skal fjarlægja unga þegar gotstærð er undir 8 eða 10 ungar/got (með hliðsjón af venjulegri gotstærð hjá þeim rottustofni sem er notaður). Ef einungis er einn ungi umfram venjulega gotstærð skal einungis fjarlægja einn unga og nota til blóðsöfnunar fyrir hugsanlegt mat á T4 í sermi.

**Athuganir**

42. Almennar klínískar athuganir skulu gerðar a.m.k. einu sinni á dag, helst á sama tíma eða sömu tímum á hverjum degi og með það í huga hvenær vænta má hámarksáhrifa af skammtagjöfnni. Skrá skal heilbrigðisástand dýranna. Öll dýr eru skoðuð a.m.k. tvisvar á dag með tilliti til dánar- og veikindatilvika.
43. Gera skal ítarlegar klínískar athuganir á öllum dýrum af foreldrakynslóð, í eitt skipti á undan fyrstu váhrifum (til að koma megi við samanburði hjá hverju einstöku dýri), og a.m.k. vikulega eftir það. Þessar athuganir skulu fara fram í stöðluðu rými utan búrs dýranna og helst alltaf á sama tíma daglega. Þær skulu vandlega skráðar og helst skal styðjast við stigakerfi sem prófunarstofan hefur skilgreint vandlega. Áriðandi er að tryggja að prófunarskilyrði séu sem jöfnust og æskilegt er að þeir sem athuga dýrin þekki ekki til meðferðarinnar. Merki sem fylgst er með skulu fela í sér, en ekki takmarkast við, breytingar í húð, feldi, augum og slímhúð, tilvik af seytingu og úrgangslausun og ósjálfráðri starfsemi (t.d. taramyndun, hárrisi, stærð augasteins og óvenjulegu öndunarmynstri). Einnig skal skrá breytingar á göngulagi, líkamsstöðu og viðbrögð við meðhöndlun, svo og vöðvakippi og vöðvaspennu, staðnað atferli (t.d. ef dýrin snyrta sig í sífellu eða ganga stöðugt í hringi), erfitt eða langvarandi got eða afbrigðilegt atferli (t.d. sjálfssköddun eða ef dýrin ganga aftur á bak) (10. heimild).
44. Einu sinni meðan á rannsókninni stendur skal meta skynviðbrögð við áreiti af ýmsu tagi (t.d. hljóð- og sjónrænu áreiti og áreiti á stöðu- og hreyfiskynfæri) (8.–9. og 11. heimild), mat á gripstyrk (12. heimild) og mat á hreyfistarfsemi (13. heimild) hjá fimm karldýrum og fimm kvendýrum sem eru valin af handahófi úr hverjum hópi. Nánari lýsing á verkferlum, sem fylgja má, er að finna í þeim heimildum sem vísað er til. Hins vegar má einnig nota annars konar verkferli en þau sem vísað er til. Hjá karldýrum skal gera þessar athuganir á starfrænum þáttum undir lok skömmunartímabils þeirra, skömmu fyrir áætlaðan aflífunardag en fyrir blóðsýnatöku fyrir blóðfræði eða klínísku efnafræði (sjá 53.–56. lið, þ.m.t. 1. neðanmálsgreini.) Kvendýr skulu vera í svipuðu lífeðlisfræðilegu ástandi meðan á þessum starfrænu prófunum stendur og skal helst framkvæma prófanir á þeim einu sinni í síðustu viku mjólkurskeiðsins (t.d. á 6.–13. mjólkurskeiðsdegi), skömmu fyrir áætlaðan aflífunardag. Lágmarka skal aðskilnaðartíma mæðra og unga að því marki sem mögulegt er.
45. Sleppa má athugunum á starfrænum þáttum, sem gerðar eru einu sinni undir lok rannsóknarinnar, þegar um er að ræða forrannsókn sem er gerð sem undanfari 90 daga rannsóknar á hálflangvinnum eiturhrifum eða langtímarannsóknar. Í þeim tilvikum ættu athuganir á starfrænum þáttum að vera hluti af síðari rannsókninni. Hins vegar geta upplýsingar um athuganir á starfrænum þáttum úr þessari rannsókn með endurteknum skammti auðveldað valið á skammtastærðum fyrir síðari rannsóknir á hálflangvinnum eiturhrifum eða langtímarannsóknir.
46. Í undantekningartilvikum má einnig sleppa athugun á starfrænum þáttum þegar um er að ræða hópa sem sýna svo greinileg merki um eiturhrif að það myndi hafa veruleg áhrif á niðurstöður úr prófunum á starfrænum þáttum.
47. Lengd meðgöngutíma skal skráð og hún er reiknuð frá degi 0 á meðgöngu. Rannsaka skal hvert got eins fljótt og hægt er að loknu goti til að ákvarða fjölda og kyn unganna, fjölda andvana fæðdra unga, fjölda lifandi unga, ófullburða unga (unga sem eru talsvert minni en samsvarandi samanburðarungar) og stórsæjan afbrigðileika.
48. Lifandi ungar skulu taldir og kyn þeirra ákvarðað og gotið skal vigtað innan 24 klst. eftir got (dagur 0 eða 1 eftir got) og a.m.k. á 4. og 13. degi eftir got. Auk athugana á dýrum af foreldrakynslóð (sjá 43. og 44. lið) skal skrá allt óeðlilegt atferli afkvæmanna.

49. Mæla skal bilið milli endaparmsops og ytri kynfæra hvers unga á sama degi eftir got, á bilinu frá degi 0 eftir got fram til loka 4. dags eftir got. Mæla skal líkamsþyngd unganna sama dag og bilið milli endaparmsops og ytri kynfæra er mælt og bilið milli endaparmsops og ytri kynfæra skal staðlað miðað við mælieiningu fyrir stærð unga, helst þriðju rót af líkamsþyngd (14. heimild). Telja skal fjölda geirvartna/vörtubauga hjá karlkynsungum á 12. eða 13. degi eftir got, eins og mælt er með í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 151 (15. heimild).

#### Líkamsþyngd og fóðurát/vatnsdrykkja

50. Karl- og kvendýr skulu vigtuð á fyrsta degi skömmtnar, a.m.k. vikulega eftir það og við lok prófunar. Kvendýr skulu vigtuð á meðgöngunni á degi 0, á 7., 14. og 20. degi og innan 24 klst. eftir got (dagur 0 eða 1 eftir got) og a.m.k. á 4. og 13. degi eftir got. Þessar athuganir skal skrá fyrir hvert fullvaxta dýr um sig.
51. Mæla skal fóðurát a.m.k. vikulega á tímabilinu fyrir pörun, á meðgöngu og á mjólkurskeiði. Mælingar á fóðurráti á pörunartímabilinu eru valkvæðar. Einnig skal mæla vatnsdrykkju á þessum tímabilum þegar prófunaríðefnið er gefið inn með þeim miðli.

#### Blóðfræði

52. Blóðrannsóknir varðandi eftirfarandi þætti skulu fara fram einu sinni meðan á rannsókninni stendur á fimm karldýrum og fimm kvendýrum sem eru valin af handahófi úr hverjum hópi: blóðkornaskil, blóðrauðastyrkur, rauðkornafjöldi, netfrumur, heildarhvítkornafjöldi og deilitalning hvítkorna, blóðflögufjöldi og mæling á storknunarátíma og storkunarhæfni blóðs. Aðrar ákvarðanir, sem skulu gerðar ef prófunaríðefnið eða meint umbrotsefni þess hafa eða eru grunuð um að hafa oxunareiginleika, eru m.a. ákvarðanir á methemóglóbínstyrk og Heinz-innlyksum (e. *Heinz bodies*).
53. Taka skal blóðsýni á tilteknum stað. Kvendýr skulu vera í svipuðu lífeðlisfræðilegu ástandi meðan á sýnatöku stendur. Í því skyni að forðast örðugleika í framkvæmd í tengslum við breytileika við upphaf meðgöngu er hægt að safna blóði úr kvendýrum í lok tímabilsins áður en pörun á sér stað í stað söfnunar rétt fyrir eða í tengslum við aflifun dýranna. Blóðsýni úr karldýrum skal helst taka rétt fyrir eða í tengslum við aflifun dýranna. Að öðrum kosti er einnig er hægt að safna blóði úr karldýrum í lok tímabilsins áður en pörun á sér stað ef sá tímunktur var valinn fyrir kvendýr.
54. Geyma skal öll blóðsýni við viðeigandi skilyrði.

#### Klínísk lífefnafræði

55. Gera skal klínískar, lífefnafræðilegar mælingar á blóðsýnum, sem tekin eru úr þeim fimm karldýrum og fimm kvendýrum sem valin eru úr hverjum hópi, til að rannsaka helstu eiturrhif í vefjum, einkum áhrif á nýru og lifur. Mælt er með því að dýrin séu látin fasta nóttina áður en blóðsýnin eru tekin <sup>(1)</sup>. Rannsóknir á blóðvökva eða sermi skulu ná yfir natríum, kalíum, glúkósa, heildarkólesteról, þvagefni, kreatínín, heildarprótín og albúmín, a.m.k. tvö ensím sem geta bent til áhrifa á lifrarfrumur (t.d. alanínámínótransferasa, aspartatámínótransferasa og sorbitólvetnissvipti) og gallsíru. Mælingar á fleiri ensímum (úr lifur eða öðrum líffærum) og gallrauða geta í sumum tilvikum gefið gagnlegar upplýsingar.
56. Blóðsýni eru tekin úr skilgreindum stað á grundvelli eftirfarandi áætlunar:
- úr a.m.k. tveimur ungum í hverju goti á 4. degi eftir got ef fjöldi unga gerir það kleift (sjá 40.–41. lið)
  - úr öllum mæðrum og a.m.k. tveimur ungum í hverju goti við lok prófunarinnar á 13. degi, og
  - úr öllum fullvöxnum karldýrum við lok prófunarinnar.

Öll blóðsýni eru geymd við viðeigandi skilyrði. Blóðsýni úr ungum á 13. degi og fullvöxnum karldýrum eru metin m.t.t. styrkleika skjaldkirtilshormóna (T4) í sermi. Framkvæma skal frekara mat á T4 í blóðsýnum úr mæðrum og ungum á 4. degi ef við á. Annar valkostur er að mæla önnur hormón, ef við á. Hægt er að hópa blóð úr ungum eftir goti til greiningar á skjaldkirtilshormónum. Skjaldkirtilshormóna (T4 og TSH) skal helst mæla sem eitt heildargildi.

<sup>(1)</sup> Við allmargar mælingar á sermi og blóðvökva, einkum þegar glúkósi er mældur, er betra að láta dýrin fasta yfir nótt. Aðalástæðan er sú að óhjákvæmilega verða niðurstöður breytilegri ef dýrin eru ekki látin fasta og það getur falið þau áhrif sem eru lítt áberandi og gert túlkun erfðari. Á hinn bóginn gæti fasta yfir nótt haft áhrif á almenn efnaskipti dýranna (með fangi), truflað mjólkurmyndun og gjöf, og það gæti einkum truflað dagleg váhrif frá prófunaríðefninu, einkum í rannsóknum þar sem efnið er gefið með fóðri. Ef dýrin eru látin fasta yfir nótt skulu klínískar, lífefnafræðilegar mælingar gerðar eftir að athuganir á starfrænum þáttum hjá karldýrum í 4. viku rannsóknarinnar hafa farið fram. Mæðrum skal haldið eftir í einn dag til viðbótar eftir að ungarnir eru fjarlægðir, t.d. á 13. degi eftir got. Mæðrum skulu látin fasta yfir nótt frá 13.–14. mjólkurskeiðsdegi og blóðið frá lokum rannsóknarinnar er notað sem þættir í klínískri lífefnafræði.



57. Valkvætt er hvort eftirfarandi greiningar eru gerðar á þvagsýnum sem tekin eru með tímasettri söfnun þvags úr fimm karldýrum, sem eru valin af handahófi úr hverjum hópi, í síðustu viku rannsóknarinnar til ákvörðunar á: útliti, rúmmáli, osmólalstyrk eða eðlisþyngd, pH-gildi, prótíni, glúkósa og blóði/blóðkornum.
58. Að auki kemur til álita að rannsaka sermimerki sem benda til almennra vefjaskemmda. Aðrar mælingar sem ætti að gera ef þekktir eiginleikar prófunariðefnisins geta haft, eða grunur leikur á að þeir hafi, áhrif á tilsvarende efnaskiptamynstur eru mælingar á kalsíumi, fosfati, þríglýseríði við föstu og glúkósa við föstu, tilteknum hormónum, methemóglóbíni og kólínesterasa. Þetta þarf að greina í hverju tilviki um sig.
59. Eftirfarandi þættir geta haft áhrif á breytileika og hreinan styrk við ákvörðun á hormónum:
- aflífunartími vegna daglegs breytileika í hormónastyrkleikum
  - aðferð við aflífun til að koma í veg fyrir óþarfa álag á dýrin sem gæti haft áhrif á hormónastyrkleika
  - prófunarsett fyrir ákvarðanir á hormónum sem geta haft mismunandi staðalferla.
60. Blóðvökvásýni, sem eru sérstaklega ætluð til ákvörðunar á hormónum, skal taka á svipuðum tíma dags. Tölugildin sem fást þegar hormónastyrkleikar eru greindir eru breytileg eftir því hver hinna ýmsu greiningarsetta á markaði eru notuð.
61. Ef rannsóknarsöguleg grunngögn eru ófullnægjandi skal yfirvega að mæla blóðfræðilegar og klínískar, lífefnafræðilegar breytur áður en skammtagjöf hefst eða, sem væri ákjósanlegast, hjá hópi dýra sem eru ekki í tilraunahópunum. Að því er varðar kvendýr verða gögnin að koma frá mjólkandi dýrum.

#### MEINAFRÆÐI

#### Stórsæ krufning

62. Framkvæma skal gagngera, stórsæja krufningu á öllum fullvöxnum dýrum í rannsókninni og skal m.a. rannsaka vandlega yfirborð líkamans, öll op og einnig kúpuhol, brjósthol og kviðarhol og innihald þeirra. Gefa skal líffærum æxlunarkerfisins sérstakan gaum: Skrá skal fjölda tilvika hreiðrunar. Á krufningardegi er skoðað strok úr leggöngum til að ákvarða hvar dýrin eru stödd í gangferlinum og til að ná fram samsvörun við vefjameinafræðilega rannsókn á æxlunarfærum kvendýra.
63. Skera skal alla aðliggjandi vefi frá eistum og eistalyppum, sem og blóðruhálskirtli og sáðblöðrum með hlaupkirtlum í heild sinni, allra fullvaxinna karldýra, eftir því sem við á, og þessi líffæri skulu vigtuð blaut eins fljótt og hægt er eftir krufningu til að komast hjá því að þau þorni. Að auki er valkvætt að vigta fleiri líffæri s.s. lyftivöðva endaparms og klumbu- og vattarvöðvann, klumbukirtla og reðurhúfu karldýra og eggjastokka (blautvigt) og leg (þ.m.t. legháls) kvendýra; ef þessar vigtanir eru hafðar með skulu þær framkvæmdar eins fljótt og hægt er eftir krufningu. Varðveita skal eggjastokka, eistu, eistalyppur, aukalíffæri kynkerfis og öll líffæri sem sýna stórsæjar vefjaskemmdir úr öllum fullvöxnum dýrum.
64. Varðveita skal skjaldkirtil úr öllum fullvöxnum karl- og kvendýrum og úr einum karldýrsunga og einum kvendýrsunga á 13. degi úr hverju goti í þeim festingarmiðli sem er heppilegastur fyrir fyrirhugaðar vefjameinafræðilegar rannsóknir. Þyngd skjaldkirtils er hægt að mæla eftir festingu. Einnig skal skorið frá með mikilli varúð og eingöngu eftir festingu til að koma í veg fyrir vefjaskemmdir. Vefjaskemmdir geta spillt vefjameinafræðilegri greiningu. Taka skal blóðsýni á tilteknum stað, rétt áður en eða um leið og dýrin eru aflífuð, og geyma þau við viðeigandi skilyrði (sjá 56. lið).
65. Að því er varðar a.m.k. fimm fullorðin karldýr og kvendýr, sem eru valin af handahófi úr hverjum hópi (að undanskildum þeim sem finnast dauðvona og/eða eru aflífuð áður en rannsókninni lýkur), skal þar að auki skera alla aðliggjandi vefi frá lifur, nýrum, nýrnahettum, hóstakirtli, milta, heila og hjarta, eftir því sem við á, og þessi líffæri skulu vigtuð blaut eins fljótt og hægt er eftir krufningu til að komast hjá því að þau þorni. Eftirfarandi vefir skulu varðveittir í þeim festingarmiðli sem er heppilegastur, bæði fyrir viðkomandi tegund vefjar og fyrirhugaðar, vefjameinafræðilegar rannsóknir: allar stórsæjar vefjaskemmdir, heili (helstu svæði, þar á meðal stórheili, litli heili og heilabru), mæna, augu, magi, garnir og þarmar (þar á meðal fjöleitlingar (e. *Peyer's patches*)), lifur, nýru, nýrnahettur, milta, hjarta, hóstarkirtill, barki og lungu (varðveitt með fyllingu af festiefni og síðan ídyfingu), kynkirtlar (eistu og eggjastokkar), aukalíffæri kynkerfis (leg og

legháls, eistalyppur, blöðruhálskirtill, sáðblöðrur og hlaupkirtlar), leggöng, þvagblaðra, eitlar (auk nærlægasta dreneitils er rétt að taka annan eitel ef það er reynsla rannsóknarstofunnar (16. heimild)), úttaug (set- eða sköflungstaug), helst í námunda við vöðvann, beinagrindarvöðvi og bein, með beinmergi (sneið eða, að öðrum kosti, nýlegt beinmergssýni). Mælt er með því að eistu séu fest með ídýfingu í Bouin-festiefni eða breytt Davidson-festiefni (16.–18. heimild); ekki er mælt með formalíni sem festingu fyrir þessa vefi. Gata má hvíthjúpinn varlega og grunnt með nál á báðum endum líffærisins til að auðvelda gegnumflæði festiefnisins. Niðurstöður, bæði klínískar og aðrar, geta bent til þess að rannsaka þurfi fleiri vefi. Einnig skal varðveita öll líffæri sem líkur eru á að séu marklíffæri út frá þekktum eiginleikum prófunariðefnisins.

66. Eftirfarandi vefir kunna að veita mikilvægar vísbendingar um innkirtlatengd áhrif: Kynkirtlar (eggjastokkar og eistu), aukalíffæri kynkerfis (leg, þ.m.t. legháls, eistalyppur, sáðblöðrur með hlaupkirtlum, bak-, hliðar- og kviðlægur blöðruhálskirtill), leggöng, heiladingull, mjólkurkirtill úr karldýri og nýrnaheitta. Breytingar á mjólkurkirtlum í karldýrum hafa ekki verið nægilega skjalfestar en þessi mælipáttur getur verið afar næmur fyrir efnum með estrógenvirkni. Athugun á líffærum/vefjum sem ekki eru skráðir í 65. lið er valkvæð.
67. Dauða unga og unga sem eru aflífaðir á 13. degi eftir got eða stuttu síðar skal a.m.k. skoða vandlega m.t.t. stórsærra afbrigðileika. Gefa skal sérstakan gaum að ytri æxlunarfærum og skoða hvort þar sjáist merki um frávik frá eðlilegri þroskun.

#### **Vefjameinafræðileg rannsókn**

68. Framkvæma skal fulla vefjameinafræðilega rannsókn á varðveittum líffærum og vefjum valinna dýra í samanburðarhópnum og hópnum sem fær stærsta skammtinn (þar sem sérstök áhersla er lögð á stig sæðismyndunar í kynkirtlum karldýra og vefjameinafræðilega rannsókn á byggingu millifruma í eistum). Skjaldkirtill úr ungum og fullvöxnum dýrum, sem eftir eru, má rannsaka þegar þörf krefur. Þessar rannsóknir skulu einnig ná til dýra úr öðrum skammtahópum ef meðferðartengdar breytingar koma fram í hópnum sem fær stærsta skammtinn. Í leiðbeiningum um vefjameinafræði (10. heimild) er að finna fleiri upplýsingar um krufningu, festingu, sneiðingu og vefjameinafræðilega rannsókn á innkirtlavefjum.
69. Rannsaka skal allar stórsæjar vefjaskemmdir. Til að fá skýrari vitneskju um mörk um engin merkjanleg, skaðleg áhrif skal rannsaka marklíffæri í öðrum skammtahópum, einkum í hópum sem eru taldir sýna mörk um engin merkjanleg, skaðleg áhrif.
70. Ef notaður er fylgihópur skal gera vefjameinafræðilega rannsókn á þeim vefjum og líffærum þar sem merki finnast um eiturrhif í meðferðarhópnum.

#### **GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF**

##### **Gögn**

71. Skrá skal gögn um hvert einstakt dýr. Að auki skal taka öll gögn saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp, fjöldi dýra við upphaf prófunar, fjöldi dýra sem drápuð í prófuninni eða voru aflífuð af mannúðarástæðum, tími dauðsfalla eða aflífana, fjöldi frjórra dýra, fjöldi kvendýra með fangi, fjöldi dýra sem sýna merki um eiturrhif, lýsing á þeim merkjum sem koma fram um eiturrhif, þ.m.t. hvenær þau koma fram, hve lengi þau vara og hve alvarleg eiturrhifin eru og hvers konar vefjameinafræðilegar breytingar urðu, auk allra gagna um gotið sem máli skipta. Snið yfirlitsskýrslu í töfluforni, sem hefur reynst mjög gagnleg við mat á áhrifum á æxlun/þroskun, er að finna í 3. viðbæti.
72. Ef unnt er skal meta tölulegar niðurstöður með heppilegri og almennt viðurkenndri, tölfræðilegri aðferð. Við samanburð á áhrifum á tilteknu skammtabili skal forðast notkun á mörgum t-prófunum. Velja skal tölfræðiaðferðirnar á hönnunarstigi rannsóknarinnar. Tölfræðileg greining á bili milli endaparmsops og ytri kynfæra og á geymd geirvörtu skal byggjast á gögnum fyrir hvern unga, að teknu tilliti til áhrifa frá goti. Eftir því sem við á er gotið greiningareiningin. Tölfræðileg greining á líkamsþyngd unga skal byggjast á gögnum fyrir hvern unga, að teknu tilliti til stærðar gotsins. Vegna takmarkaðs umfangs rannsóknarinnar hafa tölfræðilegar greiningar í formi prófana m.t.t. „marktækni“ takmarkað gildi að því er varðar marga endapunkta, einkum æxlunarendapunkta. Sumar þeirra aðferða sem oftast eru notaðar, einkum stikabundin próf til að mæla miðlægt gildi, eiga ekki við. Ef tölfræðilegar greiningar eru notaðar skal aðferðin, sem valin er, hæfa dreifingu breytanna sem rannsakaðar eru og hún skal valin áður en rannsóknin hefst.

**Mat á niðurstöðum**

73. Meta skal niðurstöðurnar úr þessari rannsókn á eiturhrifum með tilliti til þeirra áhrifa sem verður vart, niðurstaðna úr krufningum og smásjárrannsóknum. Matið skal ná til tengsla milli skammtsins af prófunaríðefninu annars vegar og þess hvort frávik koma fram eða ekki og tíðni og alvarleika afbrigðileika hins vegar, þ.m.t. stórsæjar vefjaskemmdir, tiltekin marklíffæri, ófrjósemi, klínísk frávik, áhrif á æxlun og got, breytingar á líkamsþyngd, áhrif á dánartíðni og öll önnur eiturhrif.
74. Sökum þess að meðferðartímabil karldýranna er stutt skal skoða vefjameinafræðilega rannsókn á eistum og eistalyppum ásamt frjósemisgögnunum þegar áhrif á æxlun karldýra eru metin. Notkun rannsóknarsögulegra samanburðargagna um æxlun/þróun (t.d. um stærð gots, bil milli endaparmsops og ytri kynfæra, geymd geirvörtu, magn T4 í sermi), ef þau liggja fyrir, getur einnig verið gagnleg til að auðvelda túlkun á rannsókninni.
75. Að því er varðar gæðæftirlit þá er mælt með því að rannsóknarsögulegum samanburðargögnum verði safnað saman og að fráviksstuðull verði reiknaður út fyrir töluleg gögn, einkum fyrir mælipættina sem tengjast greiningu á innkirtlatruflandi efnum. Þessi gögn má nota til samanburðar þegar raunverulegar rannsóknir eru metnar.

**Prófunarskýrsla**

76. Eftirtaldir upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

*Prófunaríðefni:*

- uppruni, lotunúmer, síðasti notkunardagur, ef hann liggur fyrir
- stöðugleiki prófunaríðefnisins, ef hann er þekktur.

*Efni með einum efnisþætti:*

- útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,
- efnafræðileg sanngreining, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.

*Fjölpáttæfni, UVCB-efni og blöndur:*

- lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.

*Burðarefni (ef við á):*

- rök fyrir vali á burðarefni, ef það er ekki vatn.

*Tilraunadýr:*

- tegund eða stofn sem er notaður,
- fjöldi, aldur og kyn dýra,
- uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,
- þyngd hvers dýrs við upphaf prófunarinnar,

- rökstuðningur fyrir öðrum tegundum en rottum.

*Prófunarskýrði:*

- rök fyrir vali á skammtastærð,
- upplýsingar um samsetningu prófunariðfnisins eða blöndun þess í fóður, styrk sem náðist og stöðugleika og einsleitni blöndunnar,
- upplýsingar um það hvernig prófunariðefnið er gefið,
- umreikningur á styrk prófunariðfnisins (í milljónarhlutum) í fóðri/drykkjarvatni yfir í raunskammtastærð (mg/kg líkamsþyngdar á dag), ef við á,
- upplýsingar um gæði fóðurs og vatns,
- nákvæm lýsing á verklagi við slembiröðun við val á ungum sem skal aflífa, ef aflífun fer fram.

*Niðurstöður:*

- líkamsþyngd/breytingar á líkamsþyngd,
- fóðurát og vatnsdrykkja, ef við á,
- gögn um eiturefnasvörun eftir kyni og skammti, þ.m.t. frjósemi, meðganga og öll önnur merki um eiturrif,
- lengd meðgöngu,
- eiturrif eða önnur áhrif á æxlun, afkvæmi, vöxt eftir got o.s.frv.,
- eðli þeirra atriða sem koma fram við klíniska athugun, alvarleiki þeirra og varanleiki (hvort þau geta gengið til baka eða ekki),
- mat á starfsemi skynfæra, gripstyrk og hreyfistarfsemi,
- blóðprófanir með viðkomandi viðmiðunargildum,
- klínískar, lífefnafræðilegar prófanir með viðeigandi viðmiðunargildum,
- fjöldi fullvaxinna kvendýra með eðlilegan eða afbrigðilegan gangferil og gangferils lengd,
- fjöldi lifandi fæddra unga og fósturláta eftir hreiðrun,
- fjöldi unga með stórsæjan afbrigðileika, almennt mat á ytri kynfærum, fjöldi ófullburða afkvæma,
- dauðastund í rannsókninni eða hvort dýrin lifa til loka rannsóknarinnar,

- fjöldi hreiðrana, gotstærð og þyngd gots á skráningartímanum,
- upplýsingar um líkamsþyngd unga,
- bil milli endaparmsops og ytri kynfæra allra unga (og líkamsþyngd sama dag og bilið milli endaparmsops og ytri kynfæra er mælt),
- geymd geirvörtu hjá karlkynsungum,
- skjaldkirtilshormónagildi, ungar á 13. degi og fullvaxin karldýr (og mæður og ungar á 4. degi, ef mæld),
- líkamsþyngd við aflifun og gögn um þyngd líffæra úr dýrum af foreldrakynslóð,
- niðurstöður krufningar,
- ítarleg lýsing á vefjameinafræðilegum niðurstöðum,
- gögn um frásög, liggi þau fyrir,
- tölfraðileg úrvinnsla niðurstaðna, eftir því sem við á.

*Um fjöllum um niðurstöður.*

*Ályktanir.*

#### **Túlkun niðurstaðna**

77. Í þessari rannsókn eru eiturhrif á æxlun/þroskun metin í tengslum við endurtekna skammtagjöf. Þar eð áhersla er bæði lögð á endapunkta fyrir almenn eiturhrif og eiturhrif á æxlun/þroskun gera niðurstöðurnar úr rannsókninni einkum kleift að greina á milli þeirra áhrifa á æxlun/þroskun, sem koma fram þótt ekki sé um almenn eiturhrif að ræða, og áhrifa sem koma aðeins fram þegar skammtarnir eru einnig eittraðir fyrir dýr af foreldrakynslóðinni (sjá 7.–11. lið). Hún getur gefið vísbendingar um nauðsyn þess að gera frekari rannsóknir og getur veitt leiðbeiningar um útfærslu á síðari rannsóknum Styðjast skal við leiðbeiningarskjal Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 43 við túlkun niðurstaðna úr rannsóknum á æxlun og þroskun (19. heimild). Í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 106 um vefjafræðilegt mat prófana á innkirtlum og æxlun nagdýra (16. heimild) eru veittar upplýsingar um undirbúning og mat á (innkirtlum) líffærum og stroki úr leggöngum sem getur verið gagnlegt fyrir þessa prófunaraðferð.

#### **HEIMILDIR**

- 1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
- 2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
- 3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M., Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. and Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). J. Toxicol, Sci., 19, 141-149.
- 4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. and Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. Fundam. Appl. Toxicol., 18, 89-95.

- 5) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
- 6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.
- 9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (Eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.
- 10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (No 60).
- 11) Moser V.C., McDaniel K.M. and Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.
- 12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. and Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233-236.
- 13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599-609.
- 14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds. (1999). "Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights", Reproductive Toxicology, 13: 383-390.
- 15) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 15) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 106) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 17) Hess RA and Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. Í: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.
- 18) Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.
- 19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

*I. viðbætur*

SKILGREININGAR (SJÁ EINNIG (20. HEIMILD) LEIÐBEININGARSKJAL EFNAHAGS- OG FRAMFARASTOFNUNARINNAR NR. 150)

Andrógenvirgni: eiginleiki íðefnis til að virka eins og náttúrulegt andrógenhormón (t.d. testósterón) í spendýri.

(and)andrógenvirgni: eiginleiki íðefnis til að bæla niður virkni náttúrulegs andrógenhormóns (t.d. testósteróns) í spendýri.

(and)estrógenvirgni: eiginleiki íðefnis til að bæla niður virkni náttúrulegs estrógenhormóns (t.d. estradíóls 17β) í spendýri.

(and)skjaldkirtilsvirkni: eiginleiki íðefnis til að bæla niður virkni náttúrulegs skjaldkirtilshormóns (t.d. T3) í spendýri.

Íðefni: efni eða blanda.

Eiturhrif á þroskun: birtingarform eiturrhifa á æxlun í formi gerðarrasks (e. *structural disorder*) eða starfsemistruflunar hjá afkvæmunum fyrir fæðingu, í fæðingu eða eftir fæðingu.

Skammtur: það magn prófunariðefnis sem er gefið. Skammturinn er gefinn upp sem þyngd prófunariðefnis á hverja líkamsþyngdareiningu tilraunadýrs (t.d. mg/kg líkamsþyngdar á dag) eða sem stöðugur styrkur í fóðri.

Skömmtun: almennt hugtak sem er notað um skammt, hversu oft hann er gefinn og hve lengi.

Augljós eiturrhrif: almennt hugtak sem lýsir greinilegum merkjum um eiturrhrif í kjölfar þess að prófunariðefni er gefið. Þau ættu að nægja fyrir hættumat og vera þess eðlis að búast megi við að aukning á gefnum skammti leiði til þess að merki um alvarlega eitrun komi fram og leiði líklega til dauða.

Skerðing á frjósemi: röskun á tímgunarstarfsemi eða tímgunargetu karl- eða kvendýra.

Eiturrhrif á móður: skaðleg áhrif á kvendýr með fangi sem eiga sér stað annað hvort á sértækan hátt (bein áhrif) eða ósértækan hátt (óbein áhrif) og tengjast því ástandi að vera með fangi.

NOAEL: skammstöfun á „no observed adverse effect level“ sem merkir „mörk um engin merkjanleg, skaðleg áhrif“. Þetta er stærsta skammtastærðin sem veldur engum merkjanlegum, skaðlegum, meðferðartengdum áhrifum vegna meðferðarinnar.

Estrógenvirgni: eiginleiki íðefnis til að virka eins og náttúrulegt estrógenhormón (t.d. estradíól 17β) í spendýri.

Eiturhrif á æxlun: skaðleg áhrif á afkvæmi og/eða skerðing á tímgunarstarfsemi eða tímgunargetu karl- og kvendýra.

Prófunariðefni: sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

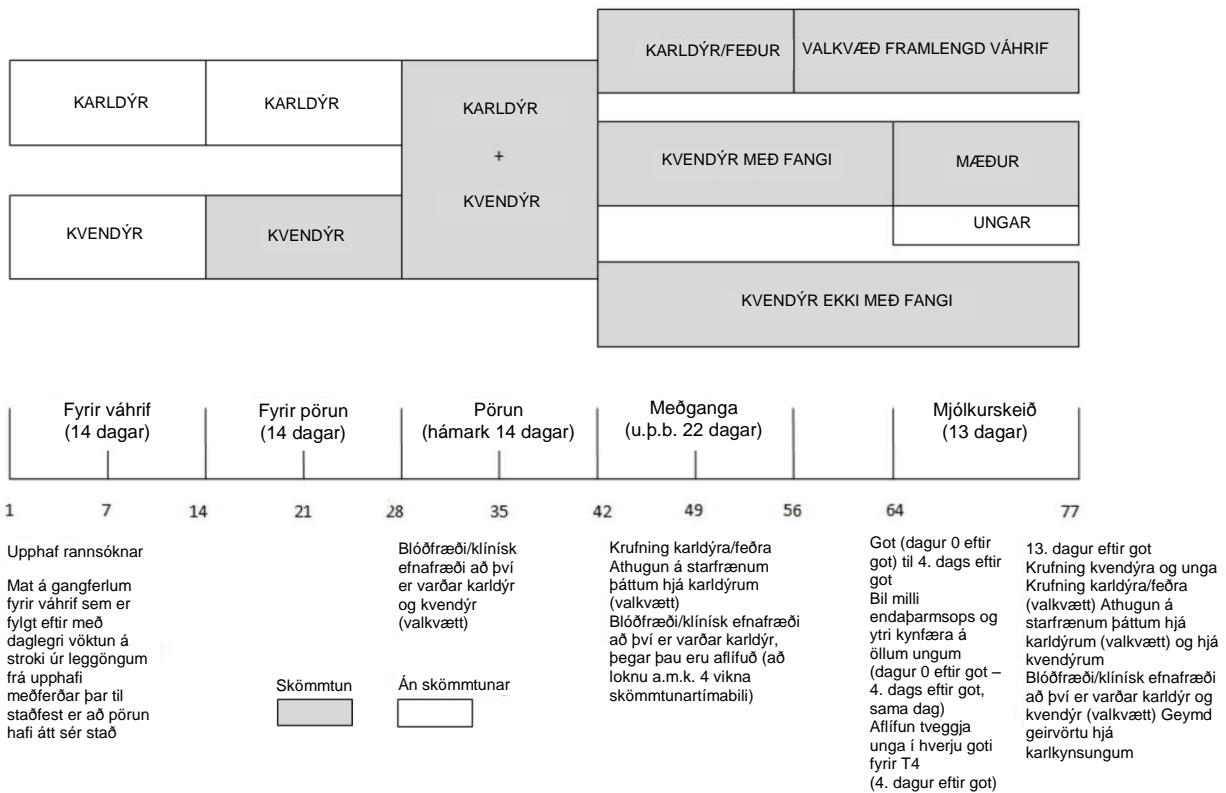
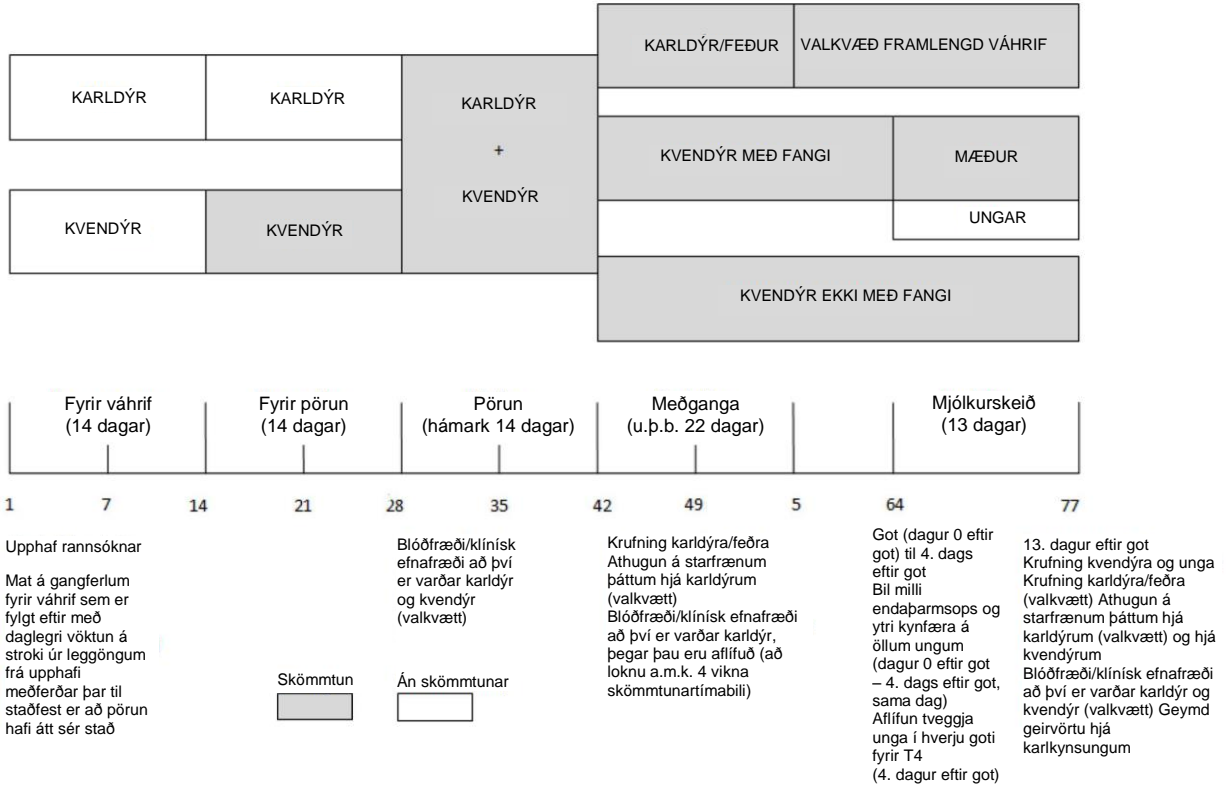
Skjaldkirtilsvirkni: eiginleiki íðefnis til að virka eins og náttúrulegt skjaldkirtilshormón (t.d. T3) í spendýri.

Fullgilding: vísindalegt ferli hannað til að lýsa rekstrarlegum kröfum og takmörkunum prófunaraðferðar og til að sýna fram á áreiðanleika og vægi í tilteknum tilgangi.



2. viðbætur

SKÝRINGARMYND AF TILRAUNAÁÆTLUN SEM SÝNIR HÁMARKSLENGD RANNSÓKNAR, BYGGT Á HEILU 14 DAGA ÞÖRUNARTÍMABILI



## 3. viðbætur

## YFIRLITSSKÝRSLA Í TÖFLUFORMI UM ÁHRIF Á ÆXLUN/ÞROSKUN

ATHUGANIR	GILDI				
	0 (samanburðarsýni)	...	...	...	...
Skammtur (einingar).....					
Dýr sett saman í pör (N)					
Gangferill (a.m.k. meðallengd og tíðni óreglulegra ferla)					
Kvendýr sem sýna merki um mökun (N)					
Kvendýr sem hafa fest fang (N)					
Getnaður, dagar 1–5 (N)					
Getnaður, dagar 6–... (1) (N)					
Meðganga ≤ 21 dagar (N)					
Meðganga = 22 dagar (N)					
Meðganga ≥ 23 dagar (N)					
Mæður með lifandi nýfædda unga (N)					
Mæður með lifandi unga á 4. degi eftir got (N)					
Fang/móðir (meðaltal)					
Lifandi ungar/mæður við got (meðaltal)					
Lifandi ungar/mæður á 4. degi (meðaltal)					
Kynjahlutfall (kk/kvk) við got (meðaltal)					
Kynjahlutfall (kk/kvk) á 4. degi (meðaltal)					
Gotsþyngd við got (meðaltal)					
Gotsþyngd á 4. degi (meðaltal)					
Þyngd unga við got (meðaltal)					
Þyngd unga þegar bil milli endaparmsops og ytri kynfæra er mælt (meðaltal karldýra, meðaltal kvendýra)					
Bil milli endaparmsops og ytri kynfæra unga á sama degi eftir got, frá gotdegi – 4. dags (meðaltal karldýra, meðaltal kvendýra, athugasemdir á sama degi eftir got)					

ATHUGANIR	GILDI				
Þyngd unga á 4. degi (meðaltal)					
Þyngd unga á 13. degi (meðaltal)					
Geymd geirvörtu hjá karlkynsungum á 13. degi (meðaltal)					
<b>AFBRIGÐILEGIR UNGAR</b>					
Mæður með 0					
Mæður með 1					
Mæður með $\geq 2$					
<b>TAP AFKVÆMA</b>					
<b>Fyrir got (hreiðrun mínus lifandi fæddir ungar)</b>					
Kvendýr með 0					
Kvendýr með 1					
Kvendýr með 2					
Kvendýr með $\geq 3$					
<b>Eftir got (lifandi fæddir ungar mínus lifandi á 13. degi eftir got)</b>					
Kvendýr með 0					
Kvendýr með 1					
Kvendýr með 2					
Kvendýr með $\geq 3$					
(1) síðasti dagur þörunartímabilsins					

B.65 **VITRO MEMBRANE BARRIER TEST METHOD FOR SKIN CORROSION**

## INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 435 um prófanir (2015). Með húðætingu er átt við varanlega skemmd í húð, sem birtist sem sýnilegt drep sem nær í gegnum húðþekjuna og niður í leðurhúðina, eftir að prófunariðefni hefur verið borið á hana, samkvæmt skilgreiningu í hnattsamræmdu kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK) (1. heimild) og reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun (reglugerðin um flokkun, merkingu og pökkun) <sup>(1)</sup>. Þessi prófunaraðferð, sem jafngildir uppfærðri OECD-viðmiðunarreglu 435 um prófanir, er prófunaraðferð *í glasi* með tálma úr himnu sem hægt er að nota til að greina ætandi íðefni. Í prófunaraðferðinni er notuð gervihimna sem er hönnuð til að bregðast við ætandi íðefnum á svipaðan hátt og dýraskinn á staðnum.
2. Húðætandi eiginleikar hafa venjulega verið metnir með því að bera prófunariðefnið á húð lifandi dýrs og meta þannig umfang vefjaskemmdanna eftir ákveðinn tíma (2. heimild). Auk núverandi prófunaraðferðar hafa nokkrar aðrar aðferðir við prófanir *í glasi* verið notaðar sem staðgöngukostir (3. og 4. heimild) fyrir staðlaða aðferð við prófun *í lífi* á kanínuhúð (Kafli B.4 í þessum viðauka, jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 404 um prófanir), sem hægt er að nota til að greina ætandi íðefni (2. heimild). Í stigskiptri prófunar- og matsáætlunin fyrir mat og flokkun á húðætandi eiginleikum og leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um samþættar aðferðir við prófun og mat (IATA) á húðertingu/ætingu er mælt með notkun á fullgiltum og viðurkenndum aðferðum til prófana *í glasi* samkvæmt einingum 3 og 4 (1. og 5. heimild). Í leiðbeiningarskjalinu um samþættar aðferðir við prófun og mat er lýst nokkrum einingum sem samflokka upplýsingaveitur og greiningartæki, og i. veittar leiðbeiningar um hvernig skal samþætta og nota fyrirbyggjandi prófunargögn og önnur gögn til að meta húðertingar- og húðætingarmátt íðefna, og ii. lagðar til nálganir þegar þörf er á frekari prófunum, þ.m.t. þegar niðurstöður reynast neikvæðar (5. heimild). Í þessari nálgun í einingum er hægt að nota jákvæðar niðurstöður úr aðferðum við prófanir *í glasi* til að flokka íðefni sem ætandi efni án þess að þörf sé á prófunum á dýrum og þannig er dregið úr notkun á dýrum og hún milduð og komist hjá sársauka og þjáningu sem kann að fylgja því ef dýr eru notuð í þessum tilgangi.
3. Fullgildingarrannsóknnum hefur verið lokið fyrir líkan með tálma úr himnu *í glasi*, sem fæst á almennum markaði undir heitinu Corrositex® (6.–8. heimild), þar sem heildarnákvæmni við að spá fyrir um húðætingu er 79% (128/163), næmi er 85% (76/89) og sértæki er 70% (52/74) fyrir gagnagrunn með 163 efnum og blöndum (7. heimild). Á grundvelli þessarar viðurkenndu fullgildingar er þessi fullgilta viðmiðunar aðferð ráðlögð til notkunar sem hluti af stigskiptri prófunaráætlun til að meta húðætingarmátt íðefna (5. og 7. heimild). Áður en hægt er að nota líkan með tálma úr himnu *í glasi* fyrir húðætingu í eftirlitsskyni skal ákvarða áreiðanleika þess, gildi (nákvæmni) og takmarkanir vegna fyrirhugaðrar notkunar til að tryggja að það sé svipað fullgiltu viðmiðunar aðferðinni (9. heimild), í samræmi við fyrirframskilgreinda nothæfisstaðla (10. heimild). Gagnkvæma samþykkt gagna, samkvæmt samkomulagi Efnahags- og framfarastofnunarinnar, er aðeins hægt að tryggja eftir að búið er að endurskoða og fella inn í jafngilda OECD-viðmiðunarreglu um prófanir allar tillagðar, nýjar eða uppfærðar aðferðir samkvæmt nothæfisstöðlunum. Sem stendur fellur aðeins ein aðferð *í glasi* undir OECD-viðmiðunarreglu 435 um prófanir og þessi prófunaraðferð, líkanið sem fæst á almennum markaði undir heitinu Corrositex®.
4. Aðrar prófunaraðferðir fyrir húðætingu byggjast á notkun á endurgerðri mannshúð (OECD-viðmiðunarregla 431 um prófanir) (3. heimild) og einangræðri húð af rottum (OECD-viðmiðunarregla 430 um prófanir) (4. heimild). Í þessum viðmiðunarreglum um prófanir er einnig kveðið á um undirflokkun ætandi íðefna í þrjá undirflokka fyrir ætandi eiginleika í HSK SP og þrjá pökkunarflokka SP fyrir flutning vegna hættu af völdum ætandi eiginleika. Þessar viðmiðunarreglur um prófanir voru upphaflega samþykktar árið 2006 og uppfærðar árið 2015 til að vísa til leiðbeiningarskjalsins um samþættar aðferðir við prófun og mat (IATA) og uppfæra skrána yfir hæfnisefnin.

## SKILGREININGAR

5. Skilgreiningar, sem eru notaðar, eru gefnar upp í viðbætinum.

## ATRÍÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFI Í HUGA Í UPPHAFI

6. Prófunin, sem er lýst í þessari prófunaraðferð, gerir kleift að sanngreina ætandi prófunariðefni og að undirflokka ætandi prófunariðefni samkvæmt HSK SP/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun (tafla 1). Að auki er hægt að nota slíka prófunaraðferð til að taka ákvarðanir varðandi ætandi og óætandi eiginleika tiltekinna flokka íðefna, t.d. lífrænna og ólífrænna sýra, sýruafleiða <sup>(2)</sup> og sem grunn fyrir tilteknar prófanir á flutningi (7. og 11.–12. heimild). Í þessari

<sup>(1)</sup> Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1272/2008 frá 16. desember 2008 um flokkun, merkingu og pökkun efna og blandna, um breytingu og niðurfellingu á tilskipunum 67/548/EBE og 1999/45/EB og um breytingu á reglugerð (EB) nr. 1907/2006 (Stjftð. ESB L 353, 31.12.2008, bls. 1).

<sup>(2)</sup> „Sýruafleiða“ er ósérhæft flokksheiti og er í meginatriðum skilgreint sem íðefni sem er framleitt úr sýru annað hvort beint eða með breytingum eða útskiptingu að hluta til. Þessi flokkur nær yfir anhýdríð, halógensýrur, sölt og aðrar gerðir íðefna.

prófunaraðferð er lýst almennri aðferð sem er svipuð og fullgilta viðmiðunarprófunaraðferðin (7. heimild). Þó að þessi prófunaraðferð veiti ekki fullnægjandi upplýsingar um húðertingu skal það tekið fram að prófunaraðferð B.46 (sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 439 um prófanir) varðar sérstaklega rannsókn *í glasi* á áhrifum húðertingar á heilbrigði (13. heimild). Fyrir fullt mat á staðbundnum áhrifum á húð eftir váhrif á húð í eitt skipti er mælt með því að fletta upp í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um samþættar aðferðir við prófun og mat (5. heimild).

Tafla 1

**Undirflokkur og undirundirflokkar fyrir húðætingu í HSK SP<sup>(1)</sup>**

Undirflokkur fyrir ætandi áhrif (1. Undirflokkur) (fyrir yfirvöld sem nota ekki undirundirflokka)	Mögulegir undirundirflokkar fyrir ætandi áhrif <sup>(1)</sup> (fyrir yfirvöld sem nota undirundirflokka, þ.m.t. reglugerðin um flokkun, merkingu og pökkun)	Ætandi áhrif á $\geq 1$ af 3 dýrum	
		Váhrif	Athugun
Ætandi	Undirundirflokkur 1A fyrir ætandi áhrif	$\leq 3$ mínútur	$\leq 1$ klukkustund
	Undirundirflokkur 1B fyrir ætandi áhrif	$> 3$ mínútur / $\leq 1$ klukkustund	$\leq 14$ dagar
	Undirundirflokkur 1C fyrir ætandi áhrif	$> 1$ klukkustund / $\leq 4$ klukkustundir	$\leq 14$ dagar

(<sup>1</sup>) Að því er varðar ESB þá gildir reglugerðin um flokkun, merkingu og pökkun um undirundirflokka þrjá fyrir húðætingu, 1A, 1B og 1C.

7. Sú takmörkun er á fullgiltu tilvísunaraðferðinni (7. heimild) að mörg óætandi íðefni og nokkur ætandi íðefni uppfylla e.t.v. ekki skilyrði fyrir prófun á grundvelli niðurstaðnanna úr upphaflegu samhæfisprófuninni (sjá 13. lið). Vatnskennd íðefni með pH-gildi á styrkbilinu 4,5 til 8,5 uppfylla oft ekki skilyrði fyrir prófun; þó voru 85% íðefna sem voru prófuð á þessu pH-styrkbili óætandi í prófunum á dýrum (7. heimild). Hægt er að nota aðferðina *í glasi* með tálma úr himnu til að prófa föst efni (leysanleg eða óleysanleg í vatni), vökva (vatnskenndir eða ekki vatnskenndir) og ýrulausnir. Prófunaríðefni sem valda ekki greinanlegum breytingum í samhæfisprófuninni (þ.e. litabreytingu í efnagreinerki fullgiltu viðmiðunarprófunaraðferðarinnar) er þó ekki hægt að prófa með aðferðinni með tálma úr himnu og skal gera prófanir á þeim með öðrum prófunaraðferðum.

## MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

8. Prófunarkerfið samanstendur af tveimur þáttum: tilbúnum tálma úr líffræðilegum stórsameindum og efnagreinerki (CDS); með þessari prófunaraðferð eru greindar, fyrir milligöngu efnagreinerkisins, skemmdir á tálmanum með himnunni af völdum ætandi prófunaríðefna eftir að prófunaríðefnið hefur verið sett á yfirborð tilbúna tálmans úr himnunni úr stórsameindum (7. heimild), sem gera má ráð fyrir að stafi af sömu ætingarvirkni og hefur áhrif á lifandi húð.
9. Gagnþrengingu himnutálma (eða gegndræpi) er hægt að mæla með margs konar aðferðum eða efnagreinerki, þ.m.t. breytingu á litarefni pH-litvísisleysilítar eða á öðrum eiginleikum litvísislausnarinnar undir tálmanum.
10. Ákvarða skal að tálminn úr himnu sé fullgiltur, þ.e. viðeigandi og áreiðanlegur, fyrir fyrirhugaða notkun. Í þessu felst að tryggja að samræmi sé í mismunandi efnablöndum að því er varðar eiginleika tálmans, t.d. geti viðhaldið tálma gagnvart óætandi íðefnum, og að hægt sé að flokka ætingareiginleika íðefnanna í samræmi við mismunandi undirundirflokka HSK SP fyrir ætandi eiginleika. Viðkomandi flokkun byggir á þeim tíma sem það tekur íðefni að þrengja sér í gegnum tálmann með himnunni yfir í litvísislausnina.

## SÝNT FRAM Á HÆFNI

11. Áður en aðferðin *í glasi* með tálma úr himnu, sem fylgir þessari prófunaraðferð, er tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur staðfesta tæknilega hæfni sína með því að flokka með réttum hætti hæfnisefni tólf sem mælt er með í töflu 2. Ef efni á skránni fæst ekki, eða þegar slíkt er réttlætjanlegt, má nota annað efni þar sem tiltæk eru fullnægjandi tilvísunargögn *í lifni* og *í glasi* (t.d. af skránni yfir viðmiðunaríðefni (10. heimild)) að því tilskildu að sömu hæfiskröfum eins og lýst er í töflu 1 sé beitt.

Tafla 2

Hæfnisefni <sup>(1)</sup>

Efni <sup>(2)</sup>	CAS-númer	Íðefnaflokkur	Undirundirflokkur HSK SP í lífi <sup>(3)</sup>	Undirundirflokkur HSK SP í glasi <sup>(3)</sup>
Bórtrífluóríðdíhýdrat	13319-75-0	Ólífrænar sýrur	1A	1A
Saltpéturssýra	7697-37-2	Ólífrænar sýrur	1A	1A
Fosfórpentaklóríð	10 026-13-8	Forefni ólífrænna sýra	1A	1A
Valerýlklóríð	638-29-9	Sýruklóríð	1B	1B
Natríumhýdroxíð	1 310-73-2	Ólífrænir basar	1B	1B
1-(2-amínóetýl)píperasín	140-31-8	Alifatísk amín	1B	1B
Bensensúlfónýlklóríð	98-09-9	Sýruklóríð	1C	1C
N,N-dímetylbensýlamín	103-83-3	Anilín	1C	1C
Tetraetýlenpentamín	112-57-2	Alifatísk amín	1C	1C
Evgenól	97-53-0	Fenól	NC	NC
Nónýlakrýlat	2 664-55-3	Akrýlöt/metakrýlöt	NC	NC
Natríumbíkarbónat	144-55-8	Ólífræn sölt	NC	NC

(<sup>1</sup>) Efnin tólf, sem eru tilgreind hér að framan, innihalda þrjú efni úr hverjum af þeim þremur undirundirflokkum HSK SP fyrir ætandi efni og þrjú efni sem eru óætandi efni, sem greiður aðgangur er að hjá utanaðkomandi birgjum, og undirundirflokkur HSK SP byggir á niðurstöðum úr rannsóknum *í lífi* af háum gæðum. Þessi efni eru tekin af skránni yfir 40 viðmiðunarefni, sem eru í lágmarksskránni yfir íðefni sem eru tilgreind til að sýna fram á nákvæmni og áreiðanleika prófunaraðferðanna sem eru sambærilegar fullgiltu viðmiðunarprófunaraðferðinni að því er varðar byggingu og virkni, og voru valin úr þeim 163 viðmiðunariðefnum sem voru upphaflega notuð til að fullgilda viðmiðunarprófunaraðferðina (Corrositex<sup>®</sup>) (7., 10. og 14. heimild). Markmiðið með þessu valferli var að ná yfir, að því marki sem unnt var, íðefni sem: voru dæmigerð fyrir svörunarsvið ætingar (t.d. óætandi, ætandi samkvæmt pökkunarflokkum SP I, II og III) sem fullgiltu viðmiðunarprófunaraðferðin getur mælt eða spáð fyrir um; voru dæmigerð fyrir íðefnaflokkana sem voru notaðir í fullgildingarferlinu; hafa vel skilgreinda efnafræðilega byggingu; kölluðu fram endurtakanlegar niðurstöður í fullgiltu viðmiðunarprófunaraðferðinni; kölluðu fram endanlegar niðurstöður í viðmiðunarprófuninni *í lífi*; voru fáanleg á markaði; og fylgdi ekki óásættanlegur förgunarkostnaður (14. heimild).

(<sup>2</sup>) Efnin prófuð óblönduð eða með 90% hreinleika.

(<sup>3</sup>) Samsvarandi pökkunarflokkar SP eru I, II og III, eftir því sem við á, fyrir undirundirflokka 1A, 1B og 1C samkvæmt HSK SP. NC: óætandi.

## VERKFERLI

12. Í eftirfarandi liðum er lýst þáttum og verkferli að því er varðar prófunaraðferð með tálma úr gervihimnu til að meta ætandi eiginleika (7. og 15. heimild), byggt á núverandi fullgiltu viðmiðunarprófunaraðferð þ.e. Corrositex<sup>®</sup>, sem fæst á almennum markaði. Himnutálmann og samhæfis-/litvísislausnir og flokkunarlausnir er hægt að búa til, tilreiða eða fá á almennum markaði, s.s. þegar um er að ræða fullgiltu viðmiðunarprófunaraðferðina Corrositex<sup>®</sup>. Aðferðarlýsing fyrir prófunaraðferð við sýnatöku fyrir fullgiltu viðmiðunarprófunaraðferðina er aðgengileg (7. heimild). Prófanir skulu fara fram við umhverfishita (17–25 °C) og þættirnir skulu uppfylla eftirfarandi skilyrði.

## Samhæfisprófun fyrir prófunariðefni

13. Áður en prófun með tálma úr himnu er framkvæmd skal gera samhæfisprófun til að ákvarða hvort unnt er að greina prófunariðefnið með efnagreiningarkerfinu. Ef efnagreiningarkerfið greinir ekki prófunariðefnið hentar prófunaraðferðin með tálma úr himnu ekki til að meta hugsanlega ætingareiginleika þess tiltekna prófunariðefnis og nota skal aðra prófunaraðferð. Efnagreiningarkerfið og váhrifaðstæður í samhæfisprófuninni skulu endurspegla váhrifin í síðari prófunum með tálma úr himnu.

**Flokkaprófun með tímamörkum fyrir prófunaríðefni**

14. Ef það á við um prófunaraðferðina skal prófunaríðefni, sem hefur verið samþykkt með samhæfisprófuninni, gangast undir flokkaprófun með tímamörkum, þ.e. skimunarprófun til að greina milli veikra og sterkra sýra eða basa. Í fullgiltu viðmiðunarprófunaraðferðinni er flokkunarprófun með tímamörkum t.d. notuð til að sýna hvor tímamörkin skal nota, byggt á því hvort umtalsverður sýru- eða basaförði greinist. Nota skal tvö mismunandi gegndræpitímamörk til að ákvarða ætandi eiginleika og undirundirflokka HSK SP fyrir húðætingu, sem byggja á sýru- eða basaförða prófunaríðefnisins.

ÞÆTTIR PRÓFUNARAÐFERÐAR MED TÁLMA ÚR HIMNU

**Tálmi úr himnu**

15. Himnutálminn samanstendur af tveimur þáttum: prótínríku vatnskenndu hlaupi úr stórsameindum og gegndræpri stuðningshimnu. Prótínríka hlaupið skal vera ógegndræpt fyrir vökva og föst efni en það skal vera hægt að tæra það og gera gegndræpt. Tilbúinn himnutálma skal geyma við fyrir fram ákveðin skilyrði sem sýnt hefur verið fram á að komi í veg fyrir skemmdir á hlaupinu, t.d. þurrkun, vöxtur örvera, tilfærsla eða sprungumyndun, sem myndi draga úr nothæfi þess. Ákvarða skal viðunandi geymslutíma og ekki skal nota himnutálmana að þeim tíma loknum.
16. Gegndræpa stuðningshimnan veitir prótínríka hlaupinu stuðning meðan á hleypingu og váhrifum af völdum prófunaríðefnisins stendur. Stuðningshimnan skal koma í veg fyrir að hlaupið falli saman eða færist til og geta hleypt öllum prófunaríðefnunum í gegn.
17. Prótínríka hlaupið sem samanstendur af prótíni, t.d. hornefni, kollageni eða blöndum af prótíni, myndar efnivið úr hlaupi sem prófunaríðefninu er miðað að. Prótínríka efninu er komið fyrir á yfirborði stuðningshimnunnar og látið verða að hlaupi áður en himnutálminn er settur ofan á litvísislausnina. Prótínríka hlaupið skal allt vera jafnt að þykkt og þéttleika og engar loftbólur eða gallar skulu vera til staðar sem gætu haft áhrif á starfrænan heilleika þess.

**Efnagreinikerfi (CDS)**

18. Litvísislausnin, sem er sama lausn og notuð er fyrir samhæfisprófunina, á að sýna svörun við tilvist prófunaríðefnis. Nota skal pH-litvísisleysilit eða leysilítasamsetningu, t.d. kresólrauðan og metýlappelsínugulan, sem sýnir litabreytingar sem svörun við tilvist prófunaríðefnisins. Mælikerfið getur verið sjónrænt eða rafrænt.
19. Greinikerfi sem eru þróuð til að greina flutning prófunaríðefnis í gegnum himnutálmann skulu metin m.t.t. gildis og áreiðanleika, til að sýna fram á það svið íðefna sem hægt er að greina og magngreiningarmörkin.

FRAMKVÆMD PRÓFUNAR

**Samsetning þátta prófunaraðferðarinnar**

20. Tálmanum úr himnunni er komið fyrir í hettuglasi (eða röri) sem inniheldur litvísislausnina þannig að öll stuðningshimnan er í snertingu við litvísislausnina og engar loftbólur eru til staðar. Þess skal gætt að tryggja að heilleika tálmans sé viðhaldið.

**Prófunaríðefni sett á**

21. Hæfilegu magni af prófunaríðefninu, t.d. 500 µl af vökva eða 500 mg af fínt muldu föstu efni (7. heimild), er komið gætilega fyrir í lögum á efri hluta yfirborðs himnutálms og því dreift jafnt. Viðeigandi fjöldi samhliða prófana, t.d. fjórar (7. heimild), er undirbúinn fyrir hvert prófunaríðefni og samsvarandi samanburði (sjá 23.–25. lið). Skrá skal tímamörk þegar prófunaríðefnið er sett á himnutálmann. Til að tryggja rétta skráningu á stuttum ætingartíma skal prófunaríðefnið sett á mismunandi tíma í hettuglösun með samhliða prófununum.

### Mæling á gegnþrengingu himnutálma

22. Hvert hettuglas skal vaktað með viðeigandi hætti og skrá skal hvenær fyrsta breyting á litvísisláusninni á sér stað, þ.e. gegnþrenging tálmans, og ákvarða tímamál milli ísetningar og gegnþrengingar himnutálmans.

### Samanburðir

23. Í prófunum þar sem notað er burðarefni eða leysir með prófunaríðefninu skal burðarefnið eða leysirinn vera samhæfð himnutálmakerfinu, þ.e. ekki breyta heilleika himnutálmakerfisins, og skal ekki breyta ætandi eiginleikum prófunaríðefnisins. Þegar við á skal prófa samanburðinn með leysi (eða burðarefni) samskeiða prófunaríðefninu til að sýna fram á samhæfi leysisins við himnutálmakerfið.
24. Prófa skal jákvæðan (ætandi) samanburð með ætandi virkni í meðallagi, t.d.  $110 \pm 15$  mg natríumhýdroxíð (undirundirflokkur 1B í HSK SP fyrir ætandi efni) (7. heimild), samskeiða prófunaríðefninu til að meta hvort prófunarkerfið virkar með viðunandi hætti. Það kann að vera gagnlegt að prófa annan jákvæðan samanburð, sem er úr sama íðefnaflokki og prófunaríðefnið, til að meta hlutfallslegan ætingarmátt ætandi prófunaríðefnis. Velja skal jákvæða(n) samanburð(i) sem er(u) í meðallagi ætandi (t.d. undirundirflokkur 1B í HSK SP) til að greina breytingar á gegnþrengingartíma sem kann að vera óásættanlega mikið lengri eða styttri en sett viðmiðunargildi og gefur þannig vísbendingar um að prófunarkerfið virki ekki sem skyldi. Í þessum tilgangi koma mjög ætandi (undirundirflokkur 1A í HSK SP) eða óætandi íðefni að takmörkuðum notum. Ætandi íðefni í undirundirflokki 1B í HSK SP myndu gera kleift að greina gegndræpitíma sem er of hraður eða of hægur. Hægt væri að nota lítillaga ætandi efni (undirundirflokkur 1C í HSK SP) sem jákvæðan samanburð til að mæla getu prófunaraðferðarinnar til að greina með samræmdum hætti milli lítillaga ætandi og óætandi íðefna. Óháð því hvaða aðferð er notuð skal þróa viðunandi svörunarsvið fyrir jákvæðan samanburð á grundvelli rannsóknarsögulegra gagna um gegndræpitíma fyrir jákvæða samanburðinn sem er notaður, s.s. meðaltal  $\pm 2-3$  staðalfrávik. Í hverri rannsókn skal ákvarða nákvæman gegndræpitíma fyrir jákvæða samanburðinn svo að hægt sé að greina frávik sem eru utan viðunandi sviðs.
25. Einnig skal prófa neikvæðan (óætandi) samanburð, t.d. 10% sítrónusýra, 6% própansýra (7. heimild), samskeiða prófunaríðefninu sem annars konar gæðaeftirlit til að sýna fram á starfrænan heilleika himnutálms.

### Viðmiðanir fyrir ásættanleika rannsóknar

26. Samkvæmt settum tímamæliþáttum fyrir hvern undirundirflokk HSK SP fyrir ætandi eiginleika er tíminn (í mínútum), sem líður frá því að prófunaríðefnið er sett á himnutálmann og þar til gegnþrenging tálms á sér stað, notaður til að spá fyrir um ætingareiginleika prófunaríðefnisins. Til að rannsókn geti talist viðunandi skal samskeiða jákvæði samanburðurinn sýna þann gegnþrengingartíma sem búist er við (t.d. 8–16 mínútna gegndræpitíma fyrir natríumhýdroxíð, ef það er notað sem jákvæður samanburður), skal samskeiða neikvæði samanburðurinn ekki vera ætandi, og skal samskeiða samanburður með leysi, ef hann er hafður með, hvorki vera ætandi né geta breytt ætingarmætti prófunaríðefnisins. Áður en aðferðin, sem fylgir þessari prófunaraðferð, er tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur sýna fram á tæknilega hæfni hennar með því að nota efni tólf sem ráðlögð eru í töflu 2. Nota skal fyrirframskilgreinda nothæfisstaðla fyrir nýjar hliðstæðar aðferðir, sem eru hannaðar samkvæmt þessari prófunaraðferð og samsvara fullgiltu viðmiðunaraðferðinni (14. heimild) hvað skipulag og virkni varðar, til að sýna fram á áreiðanleika og nákvæmni nýju aðferðarinnar áður en hún er notuð til prófana vegna eftirlits (10. heimild).

### Túlkun niðurstaðna og ætingarflokkun fyrir prófunaríðefni

27. Tíminn (í mínútum) sem líður milli þess að prófunaríðefnið er sett á himnutálmann og gegnþrenging himnu á sér stað er notaður til að flokka prófunaríðefnið með tilliti til undirundirflokka HSK SP fyrir ætandi efni (1. heimild) og, ef við á, pökkunarflokks SP (16. heimild). Þröskuldstímagildi fyrir þessa þrjá undirundirflokka fyrir ætandi efni eru ákvörðuð fyrir hverja tillagða prófunaraðferð. Við endanlega ákvörðun varðandi þröskuldstímagildi skal taka tillit til þarfarinnar til að lágmarka vanflokkan að því er varðar hættu á ætingu (þ.e. röng, neikvæð niðurstaða). Í núverandi viðmiðunarreglum um prófanir skal nota þröskuldstímagildi Corrositex®, eins og lýst er í töflu 3, þar eð sú aðferð er sem stendur eina prófunaraðferðin sem fellur undir viðmiðunarreglurnar um prófanir (7. heimild).



Tafla 3

## Spálíkan Corrositex®

Meðalgegnðræpitími (mín.)		Spá HSK SP <sup>(3)</sup>
Prófunaríðefni í 1. Undirflokki <sup>(1)</sup> (ákvarðað með flokkunarprófun aðferðarinnar)	Prófunaríðefni í 2. Undirflokki <sup>(2)</sup> (ákvarðað með flokkunarprófun aðferðarinnar)	
0–3 mín.	0–3 mín.	Ætandi, valkvæður undirundirflokkur 1A
> 3 til 60 mín.	> 3 til 30 mín.	Ætandi, valkvæður undirundirflokkur 1B
> 60 til 240 mín.	> 30 til 60 mín.	Ætandi, valkvæður undirundirflokkur 1C
> 240 mín.	> 60 mín.	Óætandi

(<sup>1</sup>) Prófunaríðefni með mikinn sýru-/basafórða (6. heimild)  
(<sup>2</sup>) Prófunaríðefni með litinn sýru-/basafórða (6. heimild)  
(<sup>3</sup>) Undirundirflokkur 1A, 1B og 1C í HSK SP samsvara þökkunarflokkum SP I, II og III eftir því sem við á.

## GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

## Gögn

28. Tíminn (í mínútum), sem líður milli þess að prófunaríðefnið og jákvæði samanburðurinn eru sett á og gegnþrenging himnu á sér stað, skal settur fram í töfluformi sem stök gögn úr samhlíða prófun, sem og meðaltal  $\pm$  staðalfrávik fyrir hverja prófun.

## Prófunarskýrsla

29. Eftirtaldir upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

## Prófunaríðefni og samanburðarefni:

- efni með einum efnisþætti: efnafræðileg samngreining, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.,
- fjölþáttaefni, UVCB-efni og blanda: lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér að framan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.
- útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,
- uppruni, lotunúmer, ef það liggur fyrir,
- meðhöndlun prófunaríðefnisins/samanburðarefnisins fyrir prófunina, ef við á (t.d. hitun og mölun),
- stöðugleiki prófunaríðefnisins, síðasti notkunardagur eða dagsetning endurgreiningar, ef hún er þekkt,
- geymsluskilyrði.

*Ökutæki:*

- auðkenni, styrkur (ef við á) og rúmmál efnis sem er notað,
- rök fyrir vali á burðarefni.

*Líkan með tálma úr himnu í glasi og aðferðarlýsing sem notuð eru, þ.m.t. sönnuð nákvæmni og áreiðanleiki*

*Prófunaraðstæður:*

- lýsing á tækinu og verklagsreglum við undirbúning sem notuð eru,
- uppruni og samsetning tálma úr himnu í glasi sem er notaður,
- samsetning og eiginleikar litvísislausnarinnar,
- aðferð við greiningu,
- magn prófunaríðefnis og samanburðarefnis,
- fjöldi samhliða prófana,
- lýsing á og rök fyrir flokkaprófun með tímamörkum,
- notkunaraðferð,
- athugunartími,
- lýsing á þeim matsviðmiðunum og flokkunarviðmiðunum sem eru notaðar,
- sýnt fram á hæfni við framkvæmd prófunaraðferðarinnar fyrir reglubundna notkun með prófunum á hæfnisefnunum.

*Niðurstöður:*

- töflusetning einstakra óunninna gagna úr einstökum prófunum og samanburðarsýnum fyrir hverja samhliða prófun,
- lýsingar á öðrum áhrifum sem fram komu,
- afleidd flokkun með tilvísun í spálíkanið/ákvörðunarviðmiðanir sem eru notaðar.

*Umfjöllun um niðurstöðurnar**Niðurstöður***HEIMILDIR**

- 1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Aðgengilegt á: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev05/05files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html)
- 2) Kafli B.4 í þessum viðauka, Bráð húðerting/æting.
- 3) Kafli B.40a í þessum viðauka, Rannsókn í glasi á húðætingu: prófunaraðferð með endurgerðri húðþekju manns (RhE)

- 4) Kafli B.40 í þessum viðauka, Rannsókn í glasi á húðætingu: prófunaraðferð við mælingar á rafviðnámi gegnum húð (TER)
- 5) OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicology In Vitro* 12, 483-524.
- 7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495.)
- 8) Gordon V.C., Harvell J.D. and Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. *Alternative Methods in Toxicology* 10, 37-45.
- 9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (No 34).
- 10) OECD (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Aðgengilegt á: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf>.
- 11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. *ATLA* 29, 96-97.
- 12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (September 20, 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.
- 13) Kafli B.46 í þessum viðauka, Rannsókn í glasi á húðertingu: Prófunaraðferð með endurgerðri húðþekju manns. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Aðgengilegt á: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal\\_docs/ps/ps044510.pdf](http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf).
- 14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Aðgengilegt á: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf>.
- 15) United Nations (UN) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Aðgengilegt á: [http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18\\_Volume1\\_Part2.pdf](http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf).

## Viðbætur

## SKILGREININGAR

**Nákvæmni:** Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktu viðmiðunargildi niðurstaða úr prófun er. Nákvæmni er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferða og einn þáttur gildis. Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli réttra niðurstaðna úr prófunaraðferð (9. heimild).

**Íðefni:** Efni eða blanda.

**Efnagreinerkerfi (CDS):** Sjónrænt eða rafrænt mælikerfi með litvísislausn sem sýnir svörun við tilvist prófunaríðefnis, t.d. með breytingu á pH-litvísisleysilit eða leysilítasamsetningu sem sýnir litabreytingu sem svörun við tilvist prófunaríðefnisins eða með annars konar efnafræðilegum eða rafefnafræðilegum viðbrögðum.

**Samsvörun:** Samsvörun er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferðar, þegar um er að ræða prófunaraðferðir sem gefa afdráttarlausar niðurstöður, og er einn þáttur gildis. Hugtakið er stundum notað í stað hugtaksins „nákvæmni“ og er skilgreint sem hlutfall allra prófaðra íðefna sem eru rétt flokkuð sem jákvæð eða neikvæð. Samsvörun er að miklu leyti háð því hversu algeng jákvæð svörun er í þeim gerðum prófunaríðefna sem rannsakaðar eru (9. heimild).

**HSK (hnattsamræmda kerfið til flokkunar og merkingar á íðefnum):** Kerfi til flokkunar íðefna (efna og blandna), samkvæmt stöðluðum tegundum og stigum eðlisrænnar hættu, heilbrigðishættu og umhverfishættu, sem tekur til samsvarandi hættubóðsatriða, s.s. skýringarmynda, viðvörunarorða, hættusetninga, varnaðarsetninga og öryggisblaða til að miðla upplýsingum um skaðleg áhrif þeirra til verndar fólki (þ.m.t. vinnuveitendur, starfsmenn, flytjendur, neytendur og bráðaliðar) og umhverfinu (1. heimild).

**IATA:** Samþættar aðferðir við prófun og mat (e. *Integrated Approach on Testing and Assessment*).

**Blanda:** Blanda eða lausn tveggja eða fleiri efna.

**Efni með einum efnisþætti:** Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi að a.m.k. 80% (massahlutfall).

**Fjölþáttaefni:** Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem fleiri en einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi í styrk sem nemur  $\geq 10\%$  (massahlutfall) og  $< 80\%$  (massahlutfall). Fjölþáttaefni er afleiðing af framleiðsluferli. Mismunurinn á blöndu og fjölþáttaefni er sá að blandan fæst með blöndun tveggja eða fleiri efna án efnahvarfs. Fjölþáttaefni er afleiðing af efnahvarfi.

**NC:** Óætandi.

**Nothæfisstaðlar:** Staðlar, byggðir á fullgilti prófunaraðferð, sem eru grundvöllur fyrir mat á samanburðarhæfi tillagðrar prófunaraðferðar sem er samsvarandi fullgiltu aðferðinni með tilliti til verkunarmáta og virkni. Meðal þeirra eru i. grundvallarþættir prófunaraðferðarinnar, ii. lágmarksskrá yfir viðmiðunariðefni sem valin eru úr þeim íðefnum sem voru notuð til að sýna fram á ásettanlegt nothæfi fullgiltu prófunaraðferðarinnar og iii. gildi fyrir áreiðanleika og nákvæmni sem eru svipuð þeim sem fengust með fullgiltu prófunaraðferðinni og sem eiga að fást með tillögðu prófunaraðferðinni þegar hún er metin út frá lágmarksskránni yfir viðmiðunariðefni (9. heimild).

**Gildi:** Lýsing á sambandi prófunaraðferðarinnar og áhrifanna, sem miðað er við, og hvort sambandið hefur merkingu og er gagnlegt miðað við tiltekinn tilgang. Gildið lýsir því að hvaða marki prófunaraðferðin nær að mæla rétt eða spá fyrir um líffræðilegu áhrifin sem miðað er við. Gildi felur í sér umfjöllun um nákvæmni (samsvörun) prófunaraðferðar (9. heimild).

**Áreiðanleiki:** Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma prófunaraðferð með samanburðarnákvæmni hjá hverri rannsóknarstofu og hjá mismunandi rannsóknarstofum í tiltekinn tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Áreiðanleiki er metinn með því að reikna út einseturssamanburðarnákvæmni og fjölsetra samanburðarnákvæmni (9. heimild).

**Næmi:** Hlutfall allra jákvæðra/virkra íðefna sem eru rétt flokkuð með prófunaraðferðinni. Næmi er mælikvarði á nákvæmni prófunaraðferðar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunaraðferðar (9. heimild).

**Húðæting í lífi:** Varanleg skemmd í húð sem kemur fram eftir að prófunariðefni hefur verið á húðinni í allt að fjórar klukkustundir, þ.e. sýnilegt drep sem nær í gegnum húðþekjuna og niður í leðurhúðina. Ætandi svörun einkennist af sárum, blæðingu, blæðandi hrúðri og, í lok 14 daga athugunartímabilsins, upplitun þegar húðin fölnar, hárlausum blettum og örum. Til greina kemur að gera vefjameinafræðilegar athuganir til að meta vefjaskemmdir sem vafi leikur á um.

**Sértæki:** Hlutfall allra neikvæðra/óvirkra íðefna sem eru rétt flokkuð með prófunaraðferðinni. Sértæki er mælikvarði á nákvæmni prófunaraðferðar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunaraðferðar (9. heimild).

**Efni:** Frumefni og efnasambönd þess, náttúruleg eða unnin með framleiðsluferlum, þ.m.t. öll aukefni, sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika þess, og öll óhreinindi, sem stafa frá vinnslunni, en þó ekki leysiefni sem skilja má frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess.

**Prófunariðefni:** Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

**UVCB-efni:** Efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.

**B.66 GREINING Í GLASI MEÐ STÖÐUGRI, INNLEIDDRI AÐVIRKJUN TIL AÐ GREINA ESTRÓGENVIÐTAKAÖRVA OG -BLOKKA**

## ALMENNUR INNGANGUR

**Viðmiðunarregla OECD um prófanir byggð á nothæfi**

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 455 um prófanir (2016). Viðmiðunarregla 455 um prófanir er viðmiðunarregla um prófanir byggð á nothæfi (PBTG) þar sem lýst er aðferðafræði greininga í glasi með stöðugri, innleiddri aðvirkjun (e. *transactivator*) til að greina estrógenviðtakaörva og -blokka (ER TA-greiningar). Hún samanstendur af nokkrum prófunaraðferðum með samsvarandi verkunarmáta og virkni til greiningar á estrógenviðtakaörva og -blokka (þ.e. ER $\alpha$ , og/eða ER $\beta$ ) og skal auðvelda þróun nýrra samsvarandi eða breyttra prófunaraðferða í samræmi við meginreglurnar um fullgildingu sem settar eru fram í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um fullgildingu og alþjóðlega staðfestingu á nýjum eða uppfærðum prófunaraðferðum fyrir hættumat (1. heimild). Fullgiltu viðmiðunarprófunaraðferðirnar (2. viðbætur og 3. viðbætur) sem leggja grunninn að þessari viðmiðunarreglu um prófanir byggða á nothæfi eru:

- STTA-greiningin (greining á aðvirkjun stöðugar innleiðslu) (2. heimild) þar sem notuð er frumulínan (h) ER $\alpha$ -HeLa-9903 og
- VM7Luc ER TA-greiningin (3. heimild) þar sem notuð er frumulínan VM7Luc4E2 (1) sem tjáir einkum hER $\alpha$  og að hluta hER (4. og 5. heimild).

Nothæfisstaðlar (6. og 7. heimild) eru tiltækir fyrir þróun og fullgildingu samsvarandi greininga fyrir sömu endapunkta hættu og þá skal nota. Þeir gefa færi á tímanlegum breytingum á viðmiðunarreglu 455 um prófanir byggða á nothæfi þannig að hægt sé að bæta nýjum, samsvarandi greiningum við uppfærða viðmiðunarreglu um prófanir byggða á nothæfi en þó verður samsvarandi greiningum einungis bætt við eftir endurskoðun og samþykki Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir því að nothæfisstaðlarnir séu uppfylltir. Unnt er að nota hverja sem er af greiningunum sem er að finna í viðmiðunarreglu 455 um prófanir til að uppfylla kröfur aðildarlanda um niðurstöður úr prófunum á aðvirkjun estrógenviðtaka og njóta um leið góðs af kerfi Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir gagnkvæmt samþykki gagna.

**Bakgrunnur og meginreglur greininganna sem falla undir þessa prófunaraðferð**

2. Efnahags- og framfarastofnunin hafði frumkvæði að forgangsáðgerð árið 1998 til að endurskoða fyrirbyggjandi viðmiðunarreglur fyrir prófanir og þróa nýjar viðmiðunarreglur fyrir skimun og prófun á hugsanlega innkirtlatruflandi efnunum. Hugtakarammi Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir prófun og mat á innkirtlatruflandi íðefnum var endurskoðaður árið 2012. Upphaflega og endurskoðaða hugtakarammann er að finna sem viðauka í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um staðlaðar viðmiðunarreglur um prófanir til að meta íðefni með tilliti til innkirtlatruflandi eiginleika (8. heimild). Hugtakaramminn samanstendur af fimm stigum, hvert stig samsvarar mismunandi stigi líffræðilegs margbreytileika. ER TA-greiningarnar sem lýst er í þessari prófunaraðferð tilheyra 2. stigi sem felur í sér greiningar í glasi sem veita upplýsingar um valið eða valin gangvirki/valinn eða valda ferla innkirtlastarfsemi. Þessi prófunaraðferð er fyrir greiningar í glasi með aðvirkjun og er ætluð til að greina estrógenviðtakaörva og -blokka.
3. Víxlverkun estrógens við estrógenviðtaka (ER) getur haft áhrif á umritun estrógenstýrðra gena sem geta leitt til vakningar eða heftingar á frumferlum, þ.m.t. þau sem eru nauðsynleg fyrir frumfjölgun, eðlilegan fósturþroska og æxlunarfærsemi (9.–11. heimild). Truflun á eðlilegum estrógenvirkum kerfum getur e.t.v. komið af stað skaðlegum áhrifum á eðlilega þroskun (einstaklingsmyndun), frjósemisheilbrigði og heilleika æxlunarfæranna.
4. TA-greiningar í glasi byggjast á beinni eða óbeinni víxlverkun efnanna við tiltekinn viðtaka sem stýrir umritun vísigensafurðar. Slíkar greiningar hafa verið mikið notaðar til að meta genatjáningu sem er stýrt af tilteknum kjarnaviðtökum, s.s. estrógenviðtökum (12.–16. heimild). Lagt hefur verið til að þær séu notaðar við greiningu á aðvirkjun estrógens sem er stýrt af estrógenviðtakanum (ER) (17.–19. heimild). Að minnsta kosti tvær mikilvægar undirtegundir kjarnaestrógenviðtaka eru til staðar,  $\alpha$  og  $\beta$ , sem eru kóðaðir með mismunandi genum. Viðkomandi prótín hafa mismunandi líffræðileg hlutverk sem og mismunandi dreifingu í vef og bindisækni bindils (20.–26. heimild).  $\alpha$ -kjarnaestrógenviðtakar miðla hefðbundinni estrógensvörun (27.–30. heimild) og því eiga flest líkön sem verið er að þróa til að mæla estrógenviðtakavirkjun eða -heftingu sérstaklega við um ER $\alpha$ . Greiningarnar eru notaðar til að greina íðefni sem virkja (eða hefta) estrógenviðtaka í kjölfar bindingar bindils en eftir það binst viðtaka- og bindilsflókinn tilteknum DNA-

svörunarþáttum og aðvirkjar vísigen sem leiðir til aukinnar frumutjánningar merkíprótíns. Hægt er að nota mismunandi svörun vísigena í þessum greiningum. Í kerfum sem byggjast á lúsíferasa umbreytir lúsíferasaensímið lúsíferasahvarf-efninu í lífljómunarafurð sem hægt er að mæla meginlega með ljósmæli. Önnur dæmi um algenga viðtaka eru flúrljómunarprótín og LacZ-geinið sem kóðar  $\beta$ -galaktósíðasa, ensím sem getur umbreytt litlausa hvarfefninu X-gal (5- brómó-4-klóró-indólýl-galaktópýranósíð) í bláa afurð sem hægt er að magngreina með litrófsmæli. Hægt er að meta þessa viðtaka á fljótan og ódýran hátt með prófunarsettum sem fást á almennum markaði.

5. Sýnt hefur verið fram á mikilvægi og áreiðanleika STTA- og VM7Luc TA-greininga fyrir ætlaðan tilgang þeirra með fullgildingarrannsóknnum (3., 4., 5. og 30. heimild). Nothæfisstaðla fyrir ljómunarmiðaðar ER TA-greiningar þar sem notaðar eru brjóstafrumulínur er að finna í matsskýrslu ICCVAM-nefndarinnar „ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals“ (3. heimild). Þessum nothæfisstöðlum hefur verið breytt til að hægt sé að nota þá fyrir bæði STTA- og VM7Luc TA-greiningar (2. heimild).
6. Skilgreiningar og skammstafanir sem notaðar eru í þessari prófunaraðferð eru settar fram í 1. viðbæti.

#### Gildissvið og takmarkanir í tengslum við TA-greiningar

7. Lagt er til að þessar greiningar séu notaðar við skimun og forgangsöröðun en þær geta einnig veitt upplýsingar um gangvirki sem hægt er að nota við greiningu á vægi rökstuddra vísibendinga. Þær greina aðvirkjun af völdum efnafraðilegrar bindingar við estrógenviðtaka með prófun *í glasi*. Niðurstöðurnar skal því ekki yfirfæra beint á flókin boð og stýringu óskaddaðs innkirtlakerfisins í lífi.
8. Aðvirkjun miðlað með estrógenviðtaka telst eitt af helstu gangvirkjum innkirtlatruflunar (IT) þó að það séu önnur gangvirki sem geta framkallað innkirtlatruflun, þ.m.t. i. víxlverkun við aðra viðtaka og ensímkerfi innan innkirtlakerfisins, ii. hormónamyndun, iii. efnaskiptavirkjun og/eða -óvirkjun hormóna, iv. dreifing hormóna í markvefjum, og v. úthreinsun úr líkamanum. Engin greininganna í þessari prófunaraðferð varðar þá verkunarhætti.
9. Þessi prófunaraðferð varðar getu íðefnanna til að virkja (þ.e. virka sem örvar) og einnig til að bæla niður (þ.e. virka sem blokkar) ER-háða umritun. Sum íðefni geta, háð frumugerð, sýnt virkni bæði sem örvar og blokkar og eru þekkt sem efni sem hafa valbundin áhrif á estrógenviðtaka (e. *selective estrogen receptor modulators* (SERM)). Íðefni sem eru neikvæð í þessum greiningum mætti meta með ER-bindinggreiningu áður en sú ályktun er dregin að íðefnið bindist ekki viðtakanum. Vegna takmarkaðrar efnaskiptagetu frumkerfa *í glasi* eru greiningarnar að auki eingöngu líklegar til að upplýsa um virkni móðursameindarinnar. Að teknu tilliti til þess að einungis stök efni voru notuð í fullgildingunni hefur ekki verið fjallað um nothæfið fyrir prófunarblöndur. Fræðilega séð telst prófunaraðferðin samt sem áður nothæf til prófunar á fjölpáttæfnum, UVCB-efnum og blöndum. Áður en þessi aðferð til prófunar á fjölpáttæfni, UVCB-efni eða blöndu er notuð til að fá gögn sem fyrirhugað er að nota í eftirlitsskyni skal skoðað hvort, og þá af hverju, hún gæti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi. Ekki er þörf á slíkri skoðun ef prófun á blöndunni er krafa af hálfu eftirlitsyfirvalda.
10. Niðurstöður örvaprófunar fyrir þau 34 efni sem voru prófuð í báðum fullgiltu viðmiðunaraðferðunum sem lýst er í þessari prófunaraðferð eru gefnar upp í töflu 1 í upplýsingaskyni. Byggt á birtum skýrslum, þ.m.t. um greiningar *í glasi* fyrir ER-bindingu og TA og/eða greininguna á legörvandi áhrifum, eru 26 af þessum efnunum flokkuð sem afdráttarlausir ER-blokkar og 8 neikvæð (2., 3., 18., 31.–34. heimild). Niðurstöður blokkaprófunar fyrir þau 15 efni sem voru prófuð í báðum fullgiltu viðmiðunaraðferðunum sem lýst er í þessari prófunaraðferð eru gefnar upp í töflu 2. Byggt á birtum skýrslum, þ.m.t. um greiningar *í glasi* fyrir ER-bindingu og TA og/eða greininguna á legörvun, eru 4 af þessum efnunum flokkuð sem afdráttarlausir/álitnir ER-blokkar og 10 neikvæð (2., 3., 18. og 31. heimild). Að því er varðar gögnin sem eru tekin saman í töflu 1 og töflu 2 var 100% samkvæmni milli viðmiðunarprófunaraðferðanna tveggja í flokkun allra efnanna með blokkagreiningu, fyrir utan eitt (Mifepristone), og hvert efni var rétt flokkað sem ER-örvar/blokkar eða neikvætt. Viðbótarupplýsingar um þennan flokk íðefna, sem og um fleiri íðefni sem voru prófuð í STTA- og VM7Luc ER TA-greiningunum í fullgildingarrannsóknunum, koma fram í nothæfisstöðlum fyrir ER TA-greininguna (6. og 7. heimild) í 2. viðbæti (töflur 1, 2 og 3).

Tafla 1

Yfirlit yfir niðurstöður úr STTA- og VM7Luc ER TA-greiningum fyrir efni sem eru prófuð í báðum greiningum á örvum og flokkuð sem ER-örvar (POS) eða neikvæð (NEG)

	Efni	CAS-númer	STTA-greining <sup>(1)</sup>			VM7Luc ER TA-greining <sup>(2)</sup>		Gagnagjafi fyrir flokkun <sup>(4)</sup>		
			ER TA-virkni	PC10-gildi (M)	PC50-gildi <sup>(b)</sup> (M)	ER TA-virkni	EC50-gildi <sup>(b)</sup> , <sup>(c)</sup> (M)	Aðrar ER TA-greiningar <sup>(c)</sup>	ER-binding	Legörvandi
1	17β-estradíól <sup>(a)</sup>	50-28-2	POS	$<1,00 \times 10^{-11}$	$<1,00 \times 10^{-11}$	POS	$5,63 \times 10^{-12}$	POS (227/227)	POS	POS
2	17α-estradíól <sup>(a)</sup>	57-91-0	POS	$7,24 \times 10^{-11}$	$6,44 \times 10^{-10}$	POS	$1,40 \times 10^{-9}$	POS(11/11)	POS	POS
3	17α-etínýlestradíól <sup>(a)</sup>	57-63-6	POS	$<1,00 \times 10^{-11}$	$<1,00 \times 10^{-11}$	POS	$7,31 \times 10^{-12}$	POS(22/22)	POS	POS
4	17β-trenbólón	10161-33-8	POS	$1,78 \times 10^{-8}$	$2,73 \times 10^{-7}$	POS	$4,20 \times 10^{-8}$	POS (2/2)	NT	NT
5	19-nortestósterón <sup>(a)</sup>	434-22-0	POS	$9,64 \times 10^{-9}$	$2,71 \times 10^{-7}$	POS	$1,80 \times 10^{-6}$	POS(4/4)	POS	POS
6	4-kúmýlfenól <sup>(a)</sup>	599-64-4	POS	$1,49 \times 10^{-7}$	$1,60 \times 10^{-6}$	POS	$3,20 \times 10^{-7}$	POS(5/5)	POS	NT
7	4-tert-oktylfenól <sup>(a)</sup>	140-66-9	POS	$1,85 \times 10^{-9}$	$7,37 \times 10^{-8}$	POS	$3,19 \times 10^{-8}$	POS(21/24)	POS	POS
8	Apígenín <sup>(a)</sup>	520-36-5	POS	$1,31 \times 10^{-7}$	$5,71 \times 10^{-7}$	POS	$1,60 \times 10^{-6}$	POS(26/26)	POS	NT



	Efni	CAS-númer	STTA-greining <sup>(1)</sup>			VM7Luc ER TA-greining <sup>(2)</sup>		Gagnagjafi fyrir flokkun <sup>(4)</sup>		
			ER TA-virkni	PC10-gildi (M)	PC50-gildi <sup>(b)</sup> (M)	ER TA-virkni	EC50-gildi <sup>(b)</sup> , <sup>(3)</sup> (M)	Aðrar ER TA-greiningar <sup>(c)</sup>	ER-binding	Legörvandi
9	Atrasín <sup>(a)</sup>	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Bisfenól A <sup>(a)</sup>	80-05-7	POS	$2,02 \times 10^{-8}$	$2,94 \times 10^{-7}$	POS	$5,33 \times 10^{-7}$	POS(65/65)	POS	POS
11	Bisfenól B <sup>(a)</sup>	77-40-7	POS	$2,36 \times 10^{-8}$	$2,11 \times 10^{-7}$	POS	$1,95 \times 10^{-7}$	POS(6/6)	POS	POS
12	Bútýlbensýlþalat <sup>(a)</sup>	85-68-7	POS	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	POS	$1,98 \times 10^{-6}$	POS(12/14)	POS	NEG
13	Kortikósterón <sup>(a)</sup>	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG(6/6)	NEG	NT
14	Kúmestról <sup>(a)</sup>	479-13-0	POS	$1,23 \times 10^{-9}$	$2,00 \times 10^{-8}$	POS	$1,32 \times 10^{-7}$	POS(30/30)	POS	NT
15	Daídsein <sup>(a)</sup>	486-66-8	POS	$1,76 \times 10^{-8}$	$1,51 \times 10^{-7}$	POS	$7,95 \times 10^{-7}$	POS(39/39)	POS	POS
16	Díetýlstilbóestról <sup>(a)</sup>	56-53-1	POS	$<1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	POS	$3,34 \times 10^{-11}$	POS(42/42)	POS	NT
17	Dí-n-bútýlþalat	84-74-2	POS	$4,09 \times 10^{-6}$		POS	$4,09 \times 10^{-6}$	POS(6/11)	POS	NEG
18	Etýlparaben	120-47-8	POS	$5,00 \times 10^{-6}$	(án PC50)	POS	$2,48 \times 10^{-5}$	POS		NT
19	Estrón <sup>(a)</sup>	53-16-7	POS	$3,02 \times 10^{-11}$	$5,88 \times 10^{-10}$	POS	$2,34 \times 10^{-10}$	POS(26/28)	POS	POS
20	Genistein <sup>(a)</sup>	446-72-0	POS	$2,24 \times 10^{-9}$	$2,45 \times 10^{-8}$	POS	$2,71 \times 10^{-7}$	POS(100/102)	POS	POS

	Efni	CAS-númer	STTA-greining <sup>(1)</sup>			VM7Luc ER TA-greining <sup>(2)</sup>		Gagnagjafi fyrir flokkun <sup>(4)</sup>		
			ER TA-virkni	PC10-gildi (M)	PC50-gildi <sup>(b)</sup> (M)	ER TA-virkni	EC50-gildi <sup>(b)</sup> , <sup>(3)</sup> (M)	Aðrar ER TA-greiningar <sup>(c)</sup>	ER-binding	Legörvandi
21	Halóperídól	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
22	Kampferól <sup>(a)</sup>	520-18-3	POS	$1,36 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-6}$	POS	$3,99 \times 10^{-6}$	POS(23/23)	POS	NT
23	Kepón <sup>(a)</sup>	143-50-0	POS	$7,11 \times 10^{-7}$	$7,68 \times 10^{-6}$	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	POS(14/18)	POS	NT
24	Ketókónasól	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
25	Línúrón <sup>(a)</sup>	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG (8/8)	NEG	NT
26	mesó-Hexestról <sup>(a)</sup>	84-16-2	POS	$<1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	POS	$1,65 \times 10^{-11}$	POS(4/4)	POS	NT
27	Metýltestósterón <sup>(a)</sup>	58-18-4	POS	$1,73 \times 10^{-7}$	$4,11 \times 10^{-6}$	POS	$2,68 \times 10^{-6}$	POS(5/6)	POS	NT
28	Mórin	480-16-0	POS	$5,43 \times 10^{-7}$	$4,16 \times 10^{-6}$	POS	$2,37 \times 10^{-6}$	POS(2/2)	POS	NT
29	Nóretýnóðrel <sup>(a)</sup>	68-23-5	POS	$1,11 \times 10^{-11}$	$1,50 \times 10^{-9}$	POS	$9,39 \times 10^{-10}$	POS(5/5)	POS	NT
30	p,p'-Metoxýklór <sup>(a)</sup>	72-43-5	POS	$1,23 \times 10^{-6}$	(án PC50) <sup>(b)</sup>	POS	$1,92 \times 10^{-6}$	POS(24/27)	POS	POS
31	Fenóbarbítal <sup>(a)</sup>	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG(2/2)	NEG	NT

	Efni	CAS-númer	STTA-greining <sup>(1)</sup>			VM7Luc ER TA-greining <sup>(2)</sup>		Gagnagjafi fyrir flokkun <sup>(4)</sup>		
			ER TA-virkni	PC10-gildi (M)	PC50-gildi <sup>(b)</sup> (M)	ER TA-virkni	EC50-gildi <sup>(b)</sup> , <sup>(3)</sup> (M)	Aðrar ER TA-greiningar <sup>(c)</sup>	ER-binding	Legörvandi
32	Reserpín	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG(4/4)	NEG	NT
33	Spírónólaktón <sup>(a)</sup>	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG(4/4)	NEG	NT
34	Testósterón	58-22-0	POS	$2,82 \times 10^{-8}$	$9,78 \times 10^{-6}$	POS	$1,75 \times 10^{-5}$	POS(5/10)	POS	NT

Skammstafanir: CAS-númer = Skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um iðefni; M = mól; EC50 = hálfur hámarkshrifstyrkur prófunarefnis; NEG = neikvætt; POS = jákvætt; NT = ekki prófað (e. *Not tested*); PC10 (og PC<sub>50</sub>) = styrkur prófunarefnis þar sem svörin er 10% (eða 50% fyrir PC50) af svörininni sem jákvæði samanburðurinn framkallar (E2 1nM) í hverjum bakka.

<sup>(a)</sup> Algeng efni prófuð í STTA- og VM7Luc ER TA-greiningunum sem voru tiltekin sem estrógenörvar eða neikvæð og notuð til að meta nákvæmni í VM7Luc ER TA-fullgildingarrannsókninni (ICCVAM VM7Luc ER TA Evaluation Report, tafla 4-1 (3)).

<sup>(b)</sup> Hámarksstyrkur prófaður án takmarkana vegna frumueiturhrifa eða óuppleysanleika var  $1 \times 10^{-5}$  M (STTA-greining) og  $1 \times 10^{-3}$  M (VM7Luc ER TA-greining).

<sup>(c)</sup> Fjöldi innan sviga stendur fyrir prófunarniðurstöður sem flokkast sem jákvæðar (POS) eða neikvæðar (NEG) af heildarfjölda rannsókna sem vísað er til.

<sup>(1)</sup> Gildi tilkynnt í *Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line* (2. heimild).

<sup>(2)</sup> Matsskýrsla ICCVAM-nefndarinnar um „LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists“ (3. heimild)

<sup>(3)</sup> Meðalgildi EC50 voru reiknuð út frá gildum skráðum af rannsóknarstofunum í VM7Luc ER TA-fullgildingarrannsókninni (XDS, ECVAM og Hiyoshi).

<sup>(4)</sup> Flokkun sem ER-örvi eða ekki var byggð á upplýsingum í bakgrunnsskjölunum vegna endurskoðunar samræmingarnefndar stofnana um fullgildingu staðgönguáðferða á prófunaraðferðum (ICCVAM-nefndin) á prófunaraðferðum vegna ER-bindingar og aðvirkunar (TA) (31. heimild) sem og á upplýsingum úr ritum sem eru birt og rýnd eftir að bakgrunnsskjöl ICCVAM-nefndarinnar vegna endurskoðunarinnar voru tilbúin (2., 3., 18., 31., 33. og 34. heimild). Athugasemdir: Ekki hafa allar greiningar í þessari prófunaraðferð sömu mælingar. Í sumum tilvikum er ekki hægt að reikna út EC50 þar sem ekki kemur fram svörunarferill fyrir fullan skammt. Í STTA-greiningunni er PC10-gildið helsta mælingin en það kunna einnig að vera fleiri dæmi þar sem PC<sub>x</sub> veitir gagnlegar upplýsingar.

Tafla 2

Samanburður á niðurstöðum úr STTA- og VM7Luc ER TA-greiningum fyrir efni sem eru prófuð í báðum blokkagreiningum og flokkuð sem ER-blokkar (POS) eða neikvæð (NEG)

	Efni <sup>(a)</sup>	CAS-númer	ER STTA-greining <sup>(1)</sup>		VM7Luc ER TA-greining <sup>(2)</sup>		Væntanleg áhrif ER STTA <sup>(4)</sup>	ICCVAM-flokkun sem sammæli er um <sup>(5)</sup>	MeSH-íðefnaflokkur <sup>(6)</sup>	Vöruflokkur <sup>(7)</sup>
			ER TA-virkni	IC <sub>50</sub> -gildi <sup>(b)</sup> (M)	ER TA-virkni	IC <sub>50</sub> -gildi <sup>(b)</sup> , <sup>(3)</sup> (M)				
1	4-hýdroxýtamoxífén	68047-06-3	POS	$3,97 \times 10^{-9}$	POS	$2,08 \times 10^{-7}$	POS, í meðallagi	POS	Vetniskolefni (hringað)	Lyf
2	Díbensó[a,h]antrasén	53-70-3	POS	Án IC <sub>50</sub>	POS	Án IC <sub>50</sub>	POS	PP	Fjölhringa efnasamband	Rannsóknarstofuíðefni, náttúruvara
3	Mífepriстон	84371-65-3	POS	$5,61 \times 10^{-6}$	NEG	—	POS, vægt	NEG	Steri	Lyf
4	Raloxífén vetniskloríð	82640-04-8	POS	$7,86 \times 10^{-10}$	POS	$1,19 \times 10^{-9}$	POS, í meðallagi	POS	Vetniskolefni (hringað)	Lyf
5	Tamoxífén	10540-29-1	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	POS	$8,17 \times 10^{-7}$	POS	POS	Vetniskolefni (hringað)	Lyf
6	17β-estradíól	50-28-2	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Steri	Lyf, efni til dýralækninga
7	Apígenín	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Heturhringliða samband	Leysilítur, náttúruvara, lyfjamilliefni

	Efni <sup>(*)</sup>	CAS-númer	ER STTA-greining <sup>(1)</sup>		VM7Luc ER TA-greining <sup>(2)</sup>		Væntanleg áhrif ER STTA <sup>(4)</sup>	ICCVAM-flokkun sem sammæli er um <sup>(5)</sup>	MeSH-íðefnaflokkur <sup>(6)</sup>	Vöruflokkur <sup>(7)</sup>
			ER TA-virkni	IC <sub>50</sub> -gildi <sup>(b)</sup> (M)	ER TA-virkni	IC <sub>50</sub> -gildi <sup>(b)</sup> , <sup>(3)</sup> (M)				
8	Atrasín	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Heturhringliða samband	Illgresiseyðir
9	Dí-n-bútýlþalat	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Estri, þalsýra	Innihaldsefni í snyrtivörum, iðnefni, mýkiefni
10	Fenarímól	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	ekki prófað	PN	Heturhringliða samband, pýrimídín	Sveppaeyðir
11	Flavón	525-82-6	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Flavonóíð, heturhringliða samband	Náttúruvara, lyf
12	Flútamíð	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Amíð	Lyf, efni til dýralækninga
13	Genistein	446-72-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Flavonóíð, heturhringliða samband	Náttúruvara, lyf
14	p-n-nónýlfenól	104-40-5	NEG	—	NEG	—	ekki prófað	NEG	Fenól	Milliefni

	Efni <sup>(a)</sup>	CAS-númer	ER STTA-greining <sup>(1)</sup>		VM7Luc ER TA-greining <sup>(2)</sup>		Væntanleg áhrif ER STTA <sup>(4)</sup>	ICCVAM-flokkun sem sammæli er um <sup>(5)</sup>	MeSH-iðefnaflokkur <sup>(6)</sup>	Vöruflokkur <sup>(7)</sup>
			ER TA-virkni	IC <sub>50</sub> -gildi <sup>(b)</sup> (M)	ER TA-virkni	IC <sub>50</sub> -gildi <sup>(b)</sup> , <sup>(3)</sup> (M)				
15	Resveratról	501-36-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Vetniskolefni (hringað)	Náttúruvara

Skammstafanir: CAS-númer = Skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um iðefni; M = mól; IC50 = hálfur hámarksheftistyrkur prófunariðefnis; NEG = neikvætt, PN = álitíð neikvætt; POS = jákvætt; PP = álitíð jákvætt.

<sup>(a)</sup> Algeng efni prófuð í STTA- og VM7Luc ER TA-greiningunum sem voru tiltekin sem estrógenörvar eða neikvæð og notuð til að meta nákvæmni í VM7Luc ER TA-fullgildingarrannsókninni (2. og 3. heimild).

<sup>(b)</sup> Hámarksstyrkur prófaður án takmarkana vegna frumueiturhrifa eða óuppleysanleiki var  $1 \times 10^{-3}$  M (STTA-greining) og  $1 \times 10^{-5}$  M (VM7Luc ER TA-greining).

<sup>(1)</sup> Fullgildingarskýrslan fyrir „Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity“, B-hluti

<sup>(2)</sup> Matskýrsla ICCVAM-nefndarinnar um „LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists“ (3. heimild).

<sup>(3)</sup> Meðaltal IC50-gilda voru reiknuð út frá gildum sem rannsóknarstofurnar í VM7Luc ER TA-fullgildingarrannsókninni (XDS, ECVAM og Hiyoshi) skráðu.

<sup>(4)</sup> ER STTA-virkni sem gert er ráð fyrir út frá skráðum áhrifum í rannsóknarsögulegu gögnunum um ER-viðtakagreiningu í CERi-greiningunni, greiningunni á legörvandi áhrifum og upplýsingum sem er samraðað úr aðgengilegum heimildum (2. heimild).

<sup>(5)</sup> Flokkun sem ER-blokki eða ekki var byggð á upplýsingum í bakgrunnsskjölum vegna endurskoðunar ICCVAM-nefndarinnar á greiningum á ER-bindingu og TA-greiningum (31. heimild) sem og á upplýsingum úr ritum sem eru birt og rýnd eftir að bakgrunnsskjöl ICCVAM-nefndarinnar vegna endurskoðunarinnar voru tilbúin (2., 3., 18. og 31. heimild).

<sup>(6)</sup> Efnunum var skipað í einn eða fleiri iðefnaflokka með því að nota alþjóðlega viðurkennt flokkunarkerfi U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) (aðgengilegt á: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

<sup>(7)</sup> Efnunum var skipað í einn eða fleiri vöruflokka með því að nota gagnabanka U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances (aðgengilegt á: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>)

ÞÆTTIR ER TA-GREININGAR

### Grundvallarþættir greiningar

11. Þessi prófunaraðferð gildir um greiningar þar sem notaður er ER $\alpha$ -viðtaki sem er stöðugt innleiddur eða er innrænn og stöðugt innleidd vísigensmíð sem er stjórnað af einum eða fleiri estrógensvörunarþáttum; aðrir viðtakar s.s. ER $\beta$  kunna þó að vera til staðar. Þetta eru grundvallarþættir greiningar.

### Samanburður

12. Lýsa skal grundvellingum fyrir tillögðum samskeiða viðmiðunarstöðlum fyrir hverja greiningu á örvum og blokkum. Samskeiða samanburður (neikvæður, með leysi og jákvæður), eins og við á, skal gefa vísbendingu um að greiningin sé virk við prófunarskilyrðin og er grundvöllur fyrir samanburði á tilraunum; hann er yfirleitt hluti af viðmiðununum fyrir ásættanleika vegna viðkomandi tilraunar (1. heimild).

### Staðlað verklag við gæðaeftirlit

13. Staðlað verklag við gæðaeftirlit skal vera eins og lýst er fyrir hverja greiningu til að tryggja að frumulínan haldist stöðug í gegnum margar umsáningar, helst laus við berfryminga (þ.e. laus við bakteríusmit) og halda getunni til að veita hina tilætluðu ER-miðluðu svörun til lengri tíma. Hafa skal frekara eftirlit með frumulínum að því er varðar rétt kenni og að því er varðar önnur aðskotaefni (t.d. sveppir, gersveppir og veirur).

### Sýnt fram á hæfni rannsóknarstofu

14. Áður en óþekkt íðefni eru prófuð með einhverri af greiningunum í þessari prófunaraðferð skal hver rannsóknarstofa sýna fram á hæfni við notkun greiningarinnar. Til að sýna fram á hæfni skal hver rannsóknarstofa prófa hæfnisefni 14 sem tilgreind eru í töflu 3 fyrir greiningu á örva og 10 hæfnisefni í töflu 4 fyrir greiningu á blokka. Þessi hæfnisprófun mun einnig staðfesta svörunargetu prófunarkerfisins. Skráin yfir hæfnisefni er undirmengi viðmiðunarefnanna sem eru tilgreind í nothæfisstöðlunum fyrir ER TA-greiningarnar (6. heimild). Þessi efni fást á almennum markaði, eru úr þeim flokkum íðefna sem eru almennt tengdir ER-blokkunar- og örvunarvirgni, sýna viðeigandi máttarsvið fyrir þann styrk sem búist var við ER-örva/blokka (þ.e. mikinn yfir í lítinn) og ná yfir neikvæð efni. Prófun á hæfnisefnunum skal endurtaka a.m.k. tvisvar á mismunandi dögum. Sýnt er fram á hæfni með réttri flokkun (jákvætt/neikvætt) á hverju hæfnisefni. Hver tækimaður skal endurtaka hæfnisprófun þegar hann lærir á greiningarnar. Sum þessara hæfnisefna geta, háð frumugerð, hagað sér eins og efni sem hafa valbundin áhrif á estrógenviðtaka (SERM) og sýnt virkni sem bæði örvar og blokkar. Hæfnisefni eru þó flokkuð í töflum 3 og 4 eftir þekktri ráðandi virkni sem skal notuð við hæfnismatið.
15. Til að sýna fram á nothæfi og m.t.t. gæðaeftirlits skal hver rannsóknarstofa taka saman rannsóknarsögulega gagnagrunna fyrir örva og blokka með viðmiðunarstöðlum (t.d. 17 $\beta$ -estradiólí og tamoxífeni), jákvæð og neikvæð samanburðariðefni og samanburð með leysi (t.d. DMSO). Í upphafi skal gagnagrunnurinn myndaður úr a.m.k. 10 sjálfstæðum keyrslum með örva (t.d. 17 $\beta$ -estradiólí) og 10 sjálfstæðum keyrslum með blokka (t.d. tamoxífen). Niðurstöðum úr greiningum í framtíðinni á þessum viðmiðunarstöðlum og samanburðum með leysi skal bætt við til að stækka gagnagrunninn og tryggja þannig samræmi og nothæfi lífgreiningarinnar á rannsóknarstofunni til lengri tíma.

Tafla 3

Skrá yfir (14) hæfnisefni fyrir greiningu á örva <sup>(8)</sup>

Nr. <sup>(7)</sup>	Efni	CAS-númer	Svörun sem búist er við <sup>(1)</sup>	STTA-greining			VM7Luc ER TA-greining		MeSH- íðefnaflokkur <sup>(5)</sup>	Vöruflokkur <sup>(6)</sup>
				PC10-gildi (M) <sup>(2)</sup>	PC50-gildi (M) <sup>(2)</sup>	Styrkbil prófunar (M)	VM7Luc EC50-gildi (M) <sup>(3)</sup>	Hæsti styrkur við ákvörðun á styrkbili (M) <sup>(4)</sup>		
14	Díetýlstilbóestról	56-53-1	POS	$<1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} - 10^{-8}$	$3,34 \times 10^{-11}$	$3,73 \times 10^{-4}$	Vetniskolefni (hringað)	Lyf, efni til dýralækninga
12	17 $\alpha$ -estradíól	57-91-0	POS	$4,27 \times 10^{-11}$	$6,44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,40 \times 10^{-9}$	$3,67 \times 10^{-3}$	Steri	Lyf, efni til dýralækninga
15	mesó-Hexestról	84-16-2	POS	$<1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,65 \times 10^{-11}$	$3,70 \times 10^{-3}$	Vetniskolefni (hringað), fenól	Lyf, efni til dýralækninga
11	4-tert-oktýlfenól	140-66-9	POS	$1,85 \times 10^{-9}$	$7,37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3,19 \times 10^{-8}$	$4,85 \times 10^{-3}$	Fenól	Milliefni
9	Genistein	446-72-0	POS	$2,24 \times 10^{-9}$	$2,45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2,71 \times 10^{-7}$	$3,70 \times 10^{-4}$	Flavonóíð, heturhringliða samband	Náttúruvara, lyf
6	Bisfenól A	80-05-7	POS	$2,02 \times 10^{-8}$	$2,94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$5,33 \times 10^{-7}$	$4,38 \times 10^{-3}$	Fenól	Milliefni



Nr. <sup>(7)</sup>	Efni	CAS-númer	Svörun sem búist er við <sup>(1)</sup>	STTA-greining			VM7Luc ER TA-greining		MeSH-íðefnaflokkur <sup>(5)</sup>	Vöruflokkur <sup>(6)</sup>
				PC10-gildi (M) <sup>(2)</sup>	PC50-gildi (M) <sup>(2)</sup>	Styrkbil prófunar (M)	VM7Luc EC50-gildi (M) <sup>(3)</sup>	Hæsti styrkur við ákvörðun á styrkbili (M) <sup>(4)</sup>		
2	Kampferól	520-18-3	POS	$1,36 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3,99 \times 10^{-6}$	$3,49 \times 10^{-3}$	Flavonóíð, heturhringliða samband	Náttúruvara
3	Bútýlbensýlþalat	85-68-7	POS	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,98 \times 10^{-6}$	$3,20 \times 10^{-4}$	Karboxýlsýra, estri, þalsýra	Mýkiefni, iðnefni
4	p,p'-metoxyklór	72-43-5	POS	$1,23 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-6}$	$2,89 \times 10^{-3}$	Vetniskolefni (halógenað)	Varnarefni, efni til dýralækninga
1	Etylparaben	120-47-8	POS	$5,00 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2,48 \times 10^{-5}$	$6,02 \times 10^{-3}$	Karboxýlsýra, fenól	Lyf, rotvarnarefni
17	Atrasín	1912-24-9	NEG	—	—	$10^{-10} - 10^{-4}$	—	$4,64 \times 10^{-4}$	Heturhringliða samband	Illgresiseyðir
20	Spírónólaktón	52-01-7	NEG	—	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	—	$2,40 \times 10^{-3}$	Laktón, steri	Lyf

Nr. (7)	Efni	CAS-númer	Svörun sem búist er við (1)	STTA-greining			VM7Luc ER TA-greining		MeSH-iðefnaflokkur (5)	Vöruflokkur (6)
				PC10-gildi (M) (2)	PC50-gildi (M) (2)	Styrkbil prófunar (M)	VM7Luc EC50-gildi (M) (3)	Hæsti styrkur við ákvörðun á styrkbili (M) (4)		
21	Ketókonasól	65277-42-1	NEG	—	—	10 <sup>-11</sup> – 10 <sup>-5</sup>	—	9,41 × 10 <sup>-5</sup>	Heturhringliða samband	Lyf
22	Reserpín	50-55-5	NEG	—	—	10 <sup>-11</sup> – 10 <sup>-5</sup>	—	1,64 × 10 <sup>-3</sup>	Heturhringliða samband, indól	Lyf, efni til dýralækninga

Skammstafanir: CAS-númer = Skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um iðefni; EC50 = hálfur hámarkskrifstyrkur prófunarefnis; NEG = neikvætt; POS = jákvætt; PC10 (og PC50) = styrkur prófunarefnis þar sem svörunin er 10% (eða 50% fyrir PC50) af svöruninni sem jákvæði samanburðurinn framkallar (E2 1nM) í hverjum bakka.

- (1) Flokkun í jákvætt eða neikvætt vegna ER-örvavirkni var byggð á bakgrunnsskjölum vegna endurskoðunar ICCVAM-nefndarinnar á ER-bindingu og TA-greiningum (31. heimild) sem og á gögnum sem byggð eru á athugunum og öðrum upplýsingum úr birtum og rýndum rannsóknum sem vísað er til eftir að bakgrunnsskjöl ICCVAM-nefndarinnar vegna endurskoðunarinnar voru tilbúin (2., 3., 18., 31., 32., 33. og 34. heimild).
- (2) Gildi tilkynnt í *Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line* (30. heimild).
- (3) Meðaltal EC50-gilda voru reiknuð út frá gildum sem rannsóknarstofurnar í VM7Luc ER TA-fullgildingarrannsókninni (XDS, ECVAM og Hiyoshi) skráðu.
- (4) Tilgreindir styrkleikar voru hæstu styrkleikar sem voru prófaðir (ákvörðun á styrkbili) við fullgildingu VM7Luc ER TA-greiningarinnar. Ef styrkleikar voru mismunandi milli rannsóknarstofanna eru hæstu styrkleikarnir tilgreindir. Sjá töflu 4–10 í matsskýrslu ICCVAM-nefndarinnar „ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell@ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals“ (3. heimild).
- (5) Efnunum var skipað í einn eða fleiri iðefnaflokka með því að nota alþjóðlega viðurkennt flokkunarkerfi U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) (aðgengilegt á: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).
- (6) Efnunum var skipað í einn eða fleiri vöruflokka með því að nota gagnagrunn U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Database (aðgengilegt á: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>)
- (7) Í töflu 1 (skrá yfir viðmiðunariðefni (22) fyrir mat á nákvæmni ER-örva) í nothæfisstöðlunum (6. heimild).
- (8) Ef hæfnisefni fæst ekki lengur á almennum markaði er hægt að nota efni með sömu flokkun og er sambærilegt að því er varðar mátt, verkunarhátt og iðefnaflokk.

Tafla 4

## Skrá yfir (10) hæfnisefni fyrir greiningu á blokka

	Efni <sup>(a)</sup>	CAS-númer	ER STTA-greining <sup>(1)</sup>			VM7Luc ER TA-greining <sup>(2)</sup>			Væntanleg áhrif ER STTA <sup>(1)</sup>	Samþykkt flokkun ICCVAM <sup>(3)</sup>	MeSH-iðefnaflokkur <sup>(6)</sup>	Vöruflokkur <sup>(7)</sup>
			ER TA-virkni	IC <sub>50</sub> (M)	Styrkbil prófunar (M)	ER TA-virkni	IC <sub>50</sub> <sup>(3)</sup> (M)	Hæsti styrkur við ákvörðun á styrkbili (M) <sup>(4)</sup>				
1	4-hýdroxýtamoxífén	68047-06-3	POS	$3,97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POS	$2,08 \times 10^{-7}$	$2,58 \times 10^{-4}$	POS, í meðallagi	POS	Vetniskolefni (hringað)	Lyf
2	Raloxífén vetnisklórið	82640-04-8	POS	$7,86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POS	$1,19 \times 10^{-9}$	$1,96 \times 10^{-4}$	POS, í meðallagi	POS	Vetniskolefni (hringað)	Lyf
3	Tamoxífén	10540-29-1	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} - 10^{-5}$	POS	$8,17 \times 10^{-7}$	$2,69 \times 10^{-4}$	POS	POS	Vetniskolefni (hringað)	Lyf
4	17β-estradíól	50-28-2	NEG	—	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	—	$3,67 \times 10^{-3}$	séu neikvæð (*)	PN	Steri	Lyf, efni til dýralækninga
5	Apígenín	520-36-5	NEG	—	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	—	$3,70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heturhringliða samband	Leysilítur, náttúruvara, lyfjamilliefni
6	Dí-n-bútýlþalat	84-74-2	NEG	—	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	—	$3,59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Estri, þalsýra	Innihaldsefni í snyrtivörum, iðnefni, mýkiefni

	Efni <sup>(4)</sup>	CAS-númer	ER STTA-greining <sup>(1)</sup>			VM7Luc ER TA-greining <sup>(2)</sup>			Væntanleg áhrif ER STTA <sup>(1)</sup>	Samþykkt flokkun ICCVAM <sup>(5)</sup>	MeSH-iðefnaflokkur <sup>(6)</sup>	Vöruflokkur <sup>(7)</sup>
			ER TA-virkni	IC <sub>50</sub> (M)	Styrkbil prófunar (M)	ER TA-virkni	IC <sub>50</sub> <sup>(3)</sup> (M)	Hæsti styrkur við ákvörðun á styrkbili (M) <sup>(4)</sup>				
7	Flavón	525-82-6	NEG	—	10 <sup>-8</sup> – 10 <sup>-3</sup>	NEG	—	4,50 × 10 <sup>-4</sup>	séu neikvæð (*)	PN	Flavonóíð, heturhringliða samband	Náttúruvara, lyf
8	Genistein	446-72-0	NEG	—	10 <sup>-9</sup> – 10 <sup>-4</sup>	NEG	—	3,70 × 10 <sup>-4</sup>	séu neikvæð (*)	NEG	Flavonóíð, heturhringliða samband	Náttúruvara, lyf
9	p-n-nónýlfenól	104-40-5	NEG	—	10 <sup>-9</sup> – 10 <sup>-4</sup>	NEG	—	4,54 × 10 <sup>-4</sup>	ekki prófað	NEG	Fenól	Milliefni
10	Resveratról	501-36-0	NEG	—	10 <sup>-8</sup> – 10 <sup>-3</sup>	NEG	—	4,38 × 10 <sup>-4</sup>	séu neikvæð (*)	NEG	Vetniskolefni (hringað)	Náttúruvara

Skammstafanir: CAS-númer = skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um iðefni; M = mól; IC50 = hálfur hámarksheftistyrkur prófunariðefnis; NEG = neikvætt, PN = álitid neikvætt; POS = jákvætt.

(\*) Flokkað sem neikvætt samkvæmt fræðilegri samantekt (2. heimild).

(4) Algeng efni prófuð í STTA- og VM7Luc ER TA-greiningunum sem voru tiltekin sem estrógenörvar eða neikvæð og notuð til að meta nákvæmni í VM7Luc ER TA-fullgildingarrannsókninni (2. og 3. heimild).

(1) Fullgildingarskýrslan fyrir „Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity“, B-hluti

(2) Matsskýrsla ICCVAM-nefndarinnar um LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3. heimild).

(3) Meðaltal IC50-gilda voru reiknuð út frá gildum sem rannsóknarstofurnar í VM7Luc ER TA-fullgildingarrannsókninni (XDS, ECVAM og Hiyoshi) skráðu.

(4) Tilgreindir styrkleikar voru hæstu styrkleikar sem voru prófaðir (ákvörðun á styrkbili) við fullgildinguna VM7Luc ER TA-greiningarinnar. Ef styrkleikar voru mismunandi milli rannsóknarstofanna eru hæstu styrkleikarnir tilgreindir. Sjá töflu 4-11 í matsskýrslu ICCVAM-nefndarinnar „ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell@ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals“ (3. heimild).

(5) Flokkun sem ER-blokki eða ekki var byggð á upplýsingum í bakgrunnsskjölum vegna endurskoðunar ICCVAM-nefndarinnar á prófunaraðferðum vegna ER-bindingar og aðvirkunar (TA) (31. heimild) sem og á upplýsingum úr ritum sem eru birt og rýnd eftir að bakgrunnsskjöl ICCVAM-nefndarinnar vegna endurskoðunarinnar voru tilbúin (2., 3., 18. og 31. heimild).

(6) Efnunum var skipað í einn eða fleiri iðefnaflokka með því að nota alþjóðlega viðurkennt flokkunarkerfi U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) (aðgengilegt á: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

(7) Efnunum var skipað í einn eða fleiri vöruflokka með því að nota gagnabanka U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances (aðgengilegt á: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>)

**Viðmiðanir fyrir ásættanleika prófunarkeyrslu**

16. Samþykki eða höfnun prófunarkeyrslu byggir á matinu á niðurstöðunum sem fást með þeim viðmiðunarstöðlum og samanburði sem notaðir eru fyrir hverja tilraun. PC50- (EC50-) eða IC50-gildin fyrir viðmiðunarstaðlana skulu uppfylla viðmiðanirnar fyrir ásættanleika sem kveðið er á um fyrir völdu greininguna (fyrir STTA, sjá 2. viðbæti, fyrir VM7Luc ER TA, sjá 3. viðbæti) og allir jákvæðir/neikvæðir samanburðir skulu flokkast rétt í hverri samþykktu tilraun. Sýna skal fram á getu til að framkvæma greininguna með samræmdum hætti með því að þróa og viðhalda rannsóknarsögulegum gagnagrunni fyrir viðmiðunarstaðlana og samanburðinn (sjá 15. lið). Nota má staðalfrávik eða fráviksstuðul meðaltala ferilaðlögunarstika staðalkúrfa fyrir viðmiðunarstaðla úr mörgum tilraunum sem mælikvarða á samanburðarsamkvæmni innan rannsóknarstofa. Að auki skal uppfylla eftirfarandi meginreglur varðandi viðmiðanir fyrir ásættanleika:
- Gögnin skulu vera nægileg fyrir meginlegt mat á ER-virkjun (fyrir greiningu á örva) eða ER-bælingu (fyrir greiningu á blokkum) (þ.e. verkun og máttur).
  - Til að tryggja nægilegt næmi skal meðalvirkni vísigens fyrir viðmiðunarstyrk viðmiðunarestrógens vera a.m.k. lágmarkið sem er tilgreint í greiningunum, í samanburði við samanburðinn með leysi (burðarefni). Fyrir STTA- og VM7Luc ER TA-greiningarnar er þetta fjórum sinnum meðaltal samanburðarins með leysi í hverjum bakka.
  - Styrkleikarnir sem eru prófaðir skulu vera innan leysnisviðs prófunaríðefnisins og skulu ekki sýna frumueiturhrif.

**Greining gagna**

17. Nota skal skilgreindu aðferðina við túlkun gagna fyrir hverja greiningu við flokkun á jákvæðri og neikvæðri svörum.
18. Þegar viðmiðanirnar fyrir ásættanleika (16. liður) eru uppfylltar bendir það til þess að greiningin vinni á tilhlýðilegan hátt en það tryggir ekki að tiltekin prófunarkeyrsla gefi nákvæm gögn. Endurtekning niðurstaðnanna úr fyrstu keyrslunni er besta vísbendingin um að nákvæm gögn hafi fengist. Ef tvær keyrslur gefa samanburðarnákvæmar niðurstöður (t.d. ef báðar niðurstöður prófunarkeyrslanna benda til þess að prófunaríðefnið sé jákvætt) er ekki þörf á að framkvæma þriðju keyrslu.
19. Ef tvær keyrslur gefa ekki samanburðarnákvæmar niðurstöður (t.d. ef prófunaríðefnið er jákvætt í einni keyrslu og neikvætt í annarri), eða ef krafist er aukinnar vissu að því er varðar útkomu þessarar greiningar, skal framkvæma a.m.k. þrjár sjálfstæðar keyrslur. Í slíku tilviki byggist flokkunin á tveimur samsvarandi niðurstöðum af þremur.

**Almennar viðmiðanir um túlkun gagna**

20. Sem stendur er ekki til nein aðferð sem ríkir einhugur um til að túlka ER TA-gögn. Þó skal bæði eigindlegt (t.d. jákvætt/neikvætt) og/eða meginlegt (t.d. EC50, PC50, IC50) mat á ER-miðlaðri virkni byggja á gögnum sem byggð eru á athugunum og traustu vísindalegu mati. Jákvæðar niðurstöður skulu, ef unnt er, einkennast af bæði umfangi áhrifanna samanborið við samanburðinn með leysi (burðarefni) eða viðmiðunarestrógen og styrkleikans þegar áhrifin eiga sér stað (t.d. EC50, PC50, RPCMax, IC50, o.s.frv.).

**Prófunarskýrsla**

21. Eftirtalдар upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

*Greining:*

- greining sem er notuð,
- samanburður/viðmiðunarstaðall/prófunaríðefni,
- uppruni, lotunúmer, síðasti notkunardagur, ef hann liggur fyrir,

- stöðugleiki prófunaríðfnisins, ef hann er þekktur.
- leysni og stöðugleiki prófunaríðfnisins í leysinum, ef þekkt,
- mæling á sýrustigi, osmólalstyrk og botnfellingu í ræktunarætinu sem prófunaríðfninu var bætt í, eins og við á.

*Efni með einum efnisþætti:*

- útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,
- efnafræðileg sanngreining, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.

*Fjölpáttæfni, UVCB-efni og blöndur:*

- lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.

*Leysir og burðarefni:*

- lýsing á eiginleikum (eðli, birgir og lota),
- rök fyrir vali á leysi eða burðarefni,
- leysni og stöðugleiki prófunaríðfnisins í leysinum/burðarefninu, ef þekkt.

*Frumur:*

- gerð og uppruni frumna:
  - er tjáning estrógenviðtaka (ER) innræn? Ef ekki, hvaða viðtaki (viðtakar) voru innleiddir?
  - Vísigensmíð sem eru notuð (þ.m.t. upprunategundir),
  - innleiðsluáferð,
  - áferð við frumuval til að viðhalda stöðugri innleiðslu (eftir því sem við á),
  - er innleiðsluáferðin viðeigandi fyrir stöðugar línur?
- fjöldi umsánings (frá afþíðingu),
- umsáningsartala frumna við afþíðingu,
- áferðir til að viðhalda frumuræktum.

*Prófunarskilyrði:*

- takmarkanir á leysni,
- lýsing á aðferðunum sem notaðar eru við mat á lífvænleika,
- samsetning ræktunarætis og styrkur koltvísýrings,
- styrkleikar prófunaríðefnis,
- rúmmál burðarefnis og prófunaríðefnis sem er bætt við,
- viðstöðuhitastig og -raki,
- lengd meðhöndlunar,
- frumþéttleiki í upphafi meðhöndlunar og meðan á henni stendur,
- jákvæðir og neikvæðir viðmiðunarstaðlar,
- vísigenaprófefni (heiti vöru, birgir og lota),
- viðmiðanir til að meta hvort niðurstöður prófunarkeyrslna séu jákvæðar, neikvæðar eða óvissar,

*Ásættanleikaathugun:*

- margfeldi vakningar fyrir hvern greiningarbakka og hvort þeir nái lágmarkinu sem er krafist í greiningunni, byggðu á rannsóknarsögulegum gögnum um samanburði,
- raungildi fyrir viðmiðanir fyrir ásættanleika, t.d. log<sub>10</sub>EC<sub>50</sub>, log<sub>10</sub>PC<sub>50</sub>, logIC<sub>50</sub> og Hill-hallagildi, fyrir samskeiða jákvæða samanburði/viðmiðunarstaðla.

*Niðurstöður:*

- óunnin og stöðluð gögn,
- hámarksgildi margfeldi vakningar,
- gögn um frumueiturhrif,
- lægsti hrifstyrkur (LEC), ef hann er fyrir hendi,
- gildi RPCMax, PCMax, PC50, IC50 og/eða EC50, eins og við á,
- tengsl milli styrks og svörunar, ef unnt er,

- tölfræðilegar greiningar, ef til eru, ásamt mælingu á skekkju og öryggi (t.d. staðalskekkja meðaltals, staðalfrávik, fráviksstuðlar eða 95% öryggisbil) og lýsing á því hvernig þessi gildi voru fengin.

*Umfjöllun um niðurstöðurnar*

*Ályktun*

#### HEIMILDIR

- 1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 2) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
- 4) Pujol P. et al. (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer. Res.*, 58(23): bls. 5367–73.
- 5) Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research*, 13(1): bls. 67–82.
- 6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation In Vitro Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 7) OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation In Vitro Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 8) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. *Climacteric*, 5 Suppl 2: bls. 20–6.
- 10) Welboren W.J. et al. (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer*, 16(4): bls. 1073–89.
- 11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): bls. 63–6.
- 12) Jefferson W.N., et al. (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, *Journal of Chromatography B*, 777(1-2): bls. 179–189.



- 13) Sonneveld E. et al. (2006). Comparison of In Vitro and In Vivo Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol. Sci.*, 89(1): bls. 173–187.
- 14) Takeyoshi M. et al. (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, *Toxicology Letters*, 126(2): bls. 91–98.
- 15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of In Vitro and In Vivo Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 28(1): bls. 81–118.
- 16) Escande A. et al. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol*, 71(10): bls. 1459–69.
- 17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol. Lett*, 102-103, 677-680.
- 18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.
- 19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of In Vitro Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- 20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor  $\beta$  - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, *Journal of Endocrinology*, 163(3): bls. 379–383.
- 21) Ogawa S. et al. (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor  $\beta$  (hER $\beta$ ) and its Heterodimerization with ER In Vivo and In Vitro, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243(1): bls. 122–126.
- 22) Enmark E. et al. (1997). Human Estrogen Receptor  $\beta$ -Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(12): bls. 4258–4265.
- 23) Ball L.J. et al. (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 299(2): bls. 204–211.
- 24) Barkhem T. et al. (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, *Mol. Pharmacol*, 54(1): bls. 105–12.
- 25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor- $\beta$ : Mechanistic Insights from Recent Studies, *Molecular Endocrinology*, 24(9): bls. 1703–1714.
- 26) Harris D.M. et al. (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, *Experimental Biology and Medicine*, 230(8): bls. 558–568.
- 27) Anderson J.N. Clark J.H. and Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 48(6): bls. 1460–1468.
- 28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, *Journal of Steroid Biochemistry*, 3(3): bls. 515–522.
- 29) Gorski J. et al. (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, *Recent Progress in Hormone Research*, 24: bls. 45–80.

- 30) Jensen E.V. et al. (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale*, 56(3): bls. 547–569.
- 31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505.).
- 32) Kanno J. et al. (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for In Vivo Estrogenic Responses: Phase 1, *Environ. Health Persp.*, 109:785-94.
- 33) Kanno J. et al. (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, *Environ. Health Persp.*, 111:1530-1549.
- 34) Kanno J. et al. (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, *Environ. Health Persp.*, 111:1550-1558.
- 35) Geisinger et al. (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, *Cancer* 63, 280-288.
- 36) Baldwin et al. (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth in vitro, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 34, 649-654.
- 37) Li, Y. et al. (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, *Mol. Endo.* 28, 2072-2081.
- 38) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol.* 13, 67-82.

*I. viðbætur*

## SKILGREININGAR OG SKAMMSTAFANIR

**Viðmiðanir fyrir ásættanleika:** Lágmarksstaðlar fyrir nothæfi tilraunasamanburða og viðmiðunarstaðla. Allar viðmiðanir fyrir ásættanleika skulu uppfylltar til að tilraun teljist gild.

**Nákvæmni (samsvörun):** Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktum viðmiðunargildum niðurstöður úr greiningu eru. Þetta er mælikvarði á nothæfi greiningar og einn þáttur gildis. Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli réttra útkoma úr greiningu (1. heimild).

**Örvi:** Efni sem kallar fram svörun, t.d. umritun, þegar það binst tilteknum viðtaka.

**Blokki:** Gerð viðtakabindils eða íðefnis sem sjálft vekur enga líffræðilega svörun við bindingu við viðtaka en hindrar eða dregur úr svörunum sem er miðlað með örva.

**Andestrógenlík virkni:** Geta íðefnis til að bæla virkni  $17\beta$ -estradíóls sem er miðlað með estrógenviðtökum.

**Formgerð frumna:** Form og útlit frumna sem ræktaðar eru í einlagi í einni holu vefjaræktunarbakka. Frumur sem eru að deyja sýna oft afbrigðilega formgerð.

**CF:** Hugtakarammi Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir prófun og mat á innkirtlatruflandi efnum (e. *The OECD Conceptual Framework for the Testing and Evaluation of Endocrine Disrupters*).

**Meðhöndlun með viðarkolum/dextrani:** Meðhöndlun með sermi notað í frumurækt. Meðhöndlun með viðarkolum/dextrani (oftast nefnd „stripun“) fjarlægir innræn hormón og hormónabindandi prótín.

**Íðefni:** Efni eða blanda.

**Frumueiturhrif:** Skaðleg áhrif á byggingu eða starfsemi frumu sem hafa að lokum í för með sér dauða hennar og geta endurspeglast í fækkun í fjölda frumna í holunni í lok váhrifátímabilsins eða dregið úr getu til að meta frumuvirkni þegar borið er saman við samskeiða samanburð með burðarefni.

**FS:** Frávíksstuðull.

**DCC-FBS:** Nautgripafósturssermi meðhöndlað með dextranhúðuðum viðarkolum.

**DMEM:** Eagle-æti með Dulbecco-breytingu

**DMSO:** Dímetýlsúlfoxíð.

**E2:**  $17\beta$ -estradíól.

**EC50:** Hálfur hámarkshrifstyrkur prófunaríðefnis.

**IT:** Innkirtlatruflun.

**hER $\alpha$** : Alfa-estrógenviðtaki úr mönnum.

**hER $\beta$** : Beta-estrógenviðtaki úr mönnum.

**EFM**: Æti án estrógens (e. *Estrogen-free medium*). Eagle-æti með Dulbecco-breytingu (DMEM) með viðbættu 4,5% nautgripafósturssermi meðhöndluðu með dextranhúðuðum viðarkolum, 1,9% L-glútamíni og 0,9% Pen-Strep.

**ER**: Estrógenviðtaki

**ERE**: Estrógen svörunarþáttur

**Estrógenlík virkni**: Geta efnis til að herma eftir 17 $\beta$ -estradíóli að því er varðar hæfni þess til að bindast og virkja estrógenviðtaka. Hægt er að greina estrógenlíka virkni sem er miðlað um hER $\alpha$  með þessari prófunaraðferð.

**ERTA**: Aðvirkjun estrógenviðtaka.

**FBS**: Nautgripafósturssermi.

**HeLa**: Ódauðleg leghálsfrumulína úr konu.

**HeLa9903**: Undirklón HeLa-frumu með stöðugt innleidd hER $\alpha$  og lúsíferasavísigen.

**IC50**: Hálfur hámarkshrifstyrkur heftandi prófunariðefnis.

**ICCVAM**: Samræmingarnefnd stofnana um fullgildingu staðgönguaðferða (ICCVAM-nefndin).

**Samanburðarnákvæmni milli stofa**: Mæling á því að hvaða marki mismunandi rannsóknarstofur með réttindi og hæfi, sem nota sömu aðferðarlýsingu og gera prófanir á sömu efnunum, komast að niðurstöðum sem eru eigindlega og meginlega samsvarandi. Samanburðarnákvæmni milli stofa, einnig kölluð fjölsetrasamanburðarnákvæmni, er ákvörðuð meðan á forfullgildingar- og fullgildingarferlinu stendur og gefur til kynna að hvaða marki tekst að flytja greiningu með fullnægjandi hætti á milli rannsóknarstofa (1. heimild).

**Samanburðarnákvæmni innan stofu**: Ákvörðun á því að hvaða marki fólki með réttindi og hæfi og á sömu rannsóknarstofu tekst með fullnægjandi hætti að fá sömu niðurstöður með notkun tilgreindrar aðferðarlýsingar á mismunandi tímum. Einnig kölluð „inseturssamanburðarnákvæmni“ (1. heimild).

**LEC**: Minnsti hrifstyrkur (e. *lowest effective concentration*) er minnsti styrkur prófunariðefnis sem kallar fram svörun (þ.e. minnsti styrkur prófunariðefnisins sem veldur tölfræðilegum mun á margfeldisaukningu vakningar miðað við samskeiða burðarefnissamanburðinn).

**Hliðstæð prófun (e. *Me-too test*)**: Heiti úr talmáli á greiningu sem er sambærileg fullgiltum og samþykktum viðmiðunaraðferðum að skipulagi og virkni. Notað sem samheiti við „samsvarandi prófunaraðferð“.

**MT**: Metallóþíónín.

**MMTV:** Æxlisveira í mjólkurkirtlum músa (e. *Mouse Mammary Tumor Virus*).

**OHT:** 4-hýdroxýtamoxífen.

**PBTG:** Viðmiðunarregla um prófanir byggð á nothæfi (e. *Performance-Based Test Guideline*).

**PC (jákvæður samanburður):** Mjög virkt efni, helst 17 $\beta$ -estradíól, sem er í öllum prófunum til að stuðla að eðlilegri virkni greiningarinnar.

**PC10:** Sá styrkur prófunaríðfnis sem veldur því að mæld virkni í greiningu á örva er 10% af hámarksvirkninni sem PC framkallar (E2 í 1 nM fyrir STTA-greininguna) í hverjum bakka.

**PC50:** Sá styrkur prófunaríðfnis sem veldur því að mæld virkni í greiningu á örva er 50% af hámarksvirkninni sem PC framkallar (E2 í viðmiðunarstyrknum sem tilgreindur er í prófunaraðferðinni) í hverjum bakka.

**PCMax:** Sá styrkur prófunaríðfnis sem framkallar RPCMax.

**Nothæfisstaðlar:** Staðlar, byggðir á fullgilti greiningu, sem eru grundvöllur fyrir mat á samanburðarhæfi tillagðrar greiningar sem er samsvarandi fullgiltu greiningunni með tilliti til verkunarmáta og virkni. Meðal þeirra eru 1) grundvallarþættir greiningarinnar, 2) lágmarksskrá yfir viðmiðunaríðefni sem valin eru úr þeim íðefnum sem voru notuð til að sýna fram á ásættanlegt nothæfi fullgiltu prófunaraðferðarinnar og 3) gildin fyrir nákvæmni og áreiðanleika sem eru samsvarandi þeim sem fengust með fullgiltu prófunaraðferðinni og sem eiga að fást með tillögðu greiningunni þegar hún er metin út frá lágmarksskránni yfir viðmiðunaríðefni (1. heimild).

**Hæfnisefni:** Hlutmengi viðmiðunarefnanna í nothæfisstöðlunum sem rannsóknarstofur geta notað til að sýna fram á tæknilega færni með staðlaðri prófunaraðferð. Valviðmiðanir að því er varðar þessi efni fela að jafnaði í sér að þau séu dæmigerð fyrir svörunarsviðið, séu fáanleg á markaði og að með þeim séu tiltæk hágæða tilvísunargögn.

**Hæfni:** Sú geta sem sýnt er fram á til að framkvæma greiningu á tilhlýðilegan hátt fyrir prófun á óþekktum efnunum.

**Viðmiðunarestrógen (jákvæður samanburður, PC):** 17 $\beta$ -estradíól (E2, CAS 50-28-2).

**Viðmiðunarstaðall:** Viðmiðunarefni sem er notað til að sýna fram á að greiningin sé fullnægjandi. 17 $\beta$ -estradíól er viðmiðunarstaðallinn fyrir STTA- og VM7Luc ER TA-greiningar.

**Viðmiðunarprófunaraðferðir:** Greiningarnar sem viðmiðunarregla 445 um prófanir byggð á nothæfi byggir á.

**Gildi:** Lýsing á sambandi greiningar og áhrifanna sem miðað er við og hvort sambandið hefur merkingu og er gagnlegt miðað við tiltekinn tilgang. Gildið lýsir því að hvaða marki greiningin nær að mæla rétt eða spá fyrir um líffræðilegu áhrifin sem miðað er við. Gildi felur í sér umfjöllun um nákvæmni (samsvörun) greiningar (1. heimild).

**Áreiðanleiki:** Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma greiningu með samanburðarnákvæmni innan og milli mismunandi rannsóknarstofa yfir lengri tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Hann er metinn með því að reikna út samanburðarnákvæmni innan stofu og milli stofa.

**RLU:** Hlutfallslegar ljóseiningar (e. *relative Light Units*).

**RNA:** Rífbósakjarnsýra.

**RPCMax:** Hámarksgildi svörunar sem prófunaríðefni framkallar, sett fram sem hundraðshluti svörunar sem 1 nM af E2 framkallar á sama bakka.

**RPMI:** RPMI 1640-æti með viðbættu 0,9% Pen-Strep og 8,0% nautgripafósturssermi (FBS).

**Keyrsla:** Stök tilraun til að meta efnafræðilega verkun á líffræðilega útkomu greiningarinnar. Hver keyrsla er heil tilraun sem er framkvæmd á samhliða sýni úr holum með frumum úr sama frumusafni eru sem settar í á sama tíma.

**Óháð keyrsla:** Aðskilin, óháð tilraun sem metur efnafræðilega verkun á líffræðilega útkomu greiningarinnar með notkun á frumum úr öðru frumusafni og nýlega þynntum íðefnum, framkvæmd á mismunandi dögum eða á sama degi af mismunandi starfsfólki.

**SD:** Staðalfrávik.

**Næmi:** Hlutfall allra jákvæðra/virkra efna sem eru rétt flokkuð með greiningunni. Þetta er mælikvarði á nákvæmni greiningar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi greiningar (1. heimild).

**Sértæki:** Hlutfall allra neikvæðra/óvirkra efna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Þetta er mælikvarði á nákvæmni greiningar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi greiningar (1. heimild).

**Stöðug innleiðsla:** Þegar DNA er innleitt í ræktaðar frumur á þann hátt að það samþættist og verður stöðugt í genamengi frumnanna sem leiðir af sér stöðuga tjáningu innleiddra gena. Klónar frumna með stöðuga innleiðslu eru valdir úr með merkiefni sem sýnir stöðugleikann (t.d. þol gegn G418).

**STTA-greining:** Greining á aðvirkjun stöðugar innleiðslu, (e. *stably transfected transactivation Assay*) greiningin á umritunarvirkjun ER $\alpha$  í HeLa 9903 frumulínunni.

**Rannsókn:** Allt svið tilraunavinnunnar til að meta stakt, tiltekið efni með tiltekinni greiningu. Rannsókn samanstendur af öllum þrepum, þ.m.t. þynning á prófunarefni í prófunarmiðlinum, forprófunarkeyrslur til að ákvarða styrkleikasvið, allar nauðsynlegar ítarlegar keyrslur, gagnagreining, gæðatrygging, mat á frumueiturhrifum o.s.frv. Að rannsókn lokinni er hægt að flokka virkni prófunaríðefnisins á eiturhrifamarkið (þ.e. virkt, óvirkt eða ekki afgerandi) sem er metið með greiningunni sem er notuð og mat á mætti í tengslum við jákvæða viðmiðunaríðefnið.

**Efni:** Samkvæmt efnareglureglugerðinni <sup>(1)</sup> er efni skilgreint sem frumefni og efnasambönd þess, náttúruleg eða unnin með framleiðsluferlum, þ.m.t. öll aukefni sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika þess og öll óhreinindi sem stafa frá vinnslunni en þó ekki leysiefni sem skilja má frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess. Mjög svipuð skilgreining er notuð í tengslum við HSK SP (1. heimild).

**Aðvirkjun (e. *transactivation*, TA):** Gangsetning mRNA-nýsmíði sem svörun við tilteknu efnafræðilegu merki, s.s. bindingu estrógens við estrógenviðtakann.

**Greining:** Í tengslum við þessa prófunaraðferð er greining ein af aðferðunum sem er samþykkt sem fullgild vegna uppfyllingar útlistaðra nothæfisviðmiðana. Þættir greiningar fela til dæmis í sér þá tilteknu frumulínu með tilheyrandi vaxtarskilyrðum, tiltekið æti sem prófunin er framkvæmd í, skipulag við uppsetningu bakka, fyrirkomulag og þynningu prófunaríðefnis ásamt öllum öðrum æskilegum ráðstöfum að því er varðar gæðaeftirlit og tengdum gagnamatsþrepum.

**Prófunaríðefni:** Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

**Umritun:** mRNA-nýsmíði.

**UVCB-efni:** Efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni og líffræðileg efni.

**Fullgilt prófunaraðferð:** Greining sem búið er að ljúka fullgildingarrannsóknum fyrir til að ákvarða gildi hennar (þ.m.t. nákvæmni) og áreiðanleika í tilteknum tilgangi. Mikilvægt er að taka mið af því að fullgilt prófunaraðferð er e.t.v. ekki nægilega nothæf, með tilliti til nákvæmni og áreiðanleika, til að teljast ásættanleg fyrir fyrirhugaðan tilgang (1. heimild).

**Fullgilding:** Ferlið sem staðfestir áreiðanleika og gildi tiltekinnar nálgunar, aðferðar, greiningar, verklags eða mats í skilgreindum tilgangi.

**Samanburður með burðarefni (e. *vehicle control*, VC):** Leysirinn sem er notaður til að leysa upp prófunaríðefni og samanburðaríðefni er prófaður eingöngu sem burðarefni án uppleysta íðefnisins.

**VM7:** Kirtilkrabbameinsfruma sem hefur verið gerð ódauðleg og tjáir estrógenviðtaka innrænt.

**VM7Luc4E2:** Frumulínan VM7Luc4E2 var fengin úr VM7 kirtilkrabbameinsfrumum manns sem hafa verið gerðar ódauðlegar og tjá innrænt bæði lögun estrógenviðtakans (ER $\alpha$  og ER $\beta$ ) og eru með stöðuga innleiðslu plasmíðsins pGudLuc7.ERE. Þetta plasmíð inniheldur fjögur eintök af tilbúnu fákirni sem inniheldur estrógensvörunarþáttinn sem er framan við MMTV-stýrilinn og lúsíferasagenið úr eldflugum.

**Veikur jákvæður samanburður:** Veikt virkt efni, valið af skránni yfir viðmiðunariðefni, sem er í öllum prófunum til að tryggja eðlilega virkni greiningarinnar.

<sup>(1)</sup> Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1907/2006 frá 18. desember 2006 um skráningu, mat, leyfisveitingu og takmarkanir, að því er varðar efni (efnareglurnar (REACH)), um stofnun Efnastofnunar Evrópu, um breytingu á tilskipun 1999/45/EB og um niðurfellingu á reglugerð ráðsins (EBE) nr. 793/93 og reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1488/94, sem og tilskipun ráðsins 76/769/EBE og tilskipunum framkvæmdastjórnarinnar 91/155/EBE, 93/67/EBE, 93/105/EB og 2000/21/EB (Stjtið. ESB L 304, 22.11.2007, bls. 1).

## 2. viðbætur

## GREINING Á AÐVIRKJUN STÖÐUGT INNLEIDDS ALFA-ESTRÓGENVIÐTAKA ÚR MÖNNUM MEÐ NOTKUN HERA-HELA-9903 FRUMULÍNUNNAR TIL AÐ GREINA VIRKNI ÍDEFNA SEM ESTRÓGENÖRVAR OG -BLOKKAR

ATRÍÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFNA Í HUGA Í UPPHAFI (SJÁ EINNIG „ALMENNUR INNGANGUR“)

1. Í þessari greiningu með aðvirkjun (TA) er notuð hER $\alpha$ -HeLa-9903 frumulínan til að greina estrógenörvirkni sem er miðlað með alfa-estrógenviðtaka úr mönnum (hER $\alpha$ ). Með fullgildingarrannsókninni á greiningunni á aðvirkjun stöðugrar innleiðslu (STTA) á vegum Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI) í Japan, þar sem notuð var hER $\alpha$ -HeLa 9903 frumulínan til að greina virkni estrógenörva og -blokka sem er miðlað með alfa-estrógenviðtaka úr mönnum (hER $\alpha$ ), er sýnt fram á gildi og áreiðanleika greiningarinnar í fyrirhuguðum tilgangi (1. heimild).
2. Þessi greining er hönnuð sérstaklega til að nema hER $\alpha$ -miðlaða aðvirkjun (TA) með mælingu á efnaljómun sem endapunktur. Þó hafa verið skráð ljómunarmerki sem er ekki miðlað með viðtaka við plöntuestrógenstyrk sem er yfir 1  $\mu$ M vegna ofvirkjunar á lúsíferasavísigeninu (2. og 3. heimild). Þó að skammtasvörunarferill gefi til kynna að raunvirkjun ER-kerfisins eigi sér stað við lægri styrk þarf að rannsaka gaumgæfilega, í ER TA-greiningarkerfum með innleiðslu sem er stöðug (1. viðbætur), tjáningu lúsíferasa sem fæst við háan styrk plöntuestrógena eða svipaðra efnasambanda sem grunur leikur á um að valdi plöntuestrógenlíkri ofvirkjun lúsíferasavísigens.
3. Lesa skal liðina „ALMENNUR INNGANGUR“ og „ÞÆTTIR ER TA-GREININGAR“ áður en þessi greining er notuð í eftirlitsskyni. Skilgreiningar og skammstafanir sem notaðar eru í þessari viðmiðunarreglu um prófanir koma fram í viðbæti 2.1.

MEGINREGLA GREININGARINNAR (SJÁ EINNIG „ALMENNUR INNGANGUR“)

4. Greiningin er notuð til að merkja bindingu estrógenviðtakans við bindil. Að lokinni bindilsbindingu yfirferist viðtaka- og bindilsflókin yfir í kjarnann þar sem hann binst tilteknum DNA-svörunarþáttum og aðvirkjar vísigen lúsíferasa úr eldflugum sem leiðir til aukinnar frumtjáningar á lúsíferasaensími. Lúsíferín er hvarfefni sem lúsíferasaensímið umbreytir í lífljómunarafurð sem hægt er að mæla meginlega með ljósmæli. Hægt er að meta lúsíferasavirkni á fljótan og ódýran hátt með fjölda prófunarsetta sem fást á almennum markaði.
5. Í prófunarkerfinu er notuð hER $\alpha$ -HeLa-9903 frumulínan sem er fengin úr leghálsæxli úr konu með tveimur smíðum sem eru stöðug innskot: i. hER $\alpha$ -tjáningarsmíðið (sem kóðar fulla lengd viðtakans í mönnum) og ii. lúsíferasavísigen smíð úr eldflugum sem er með fimm raðendurtekningar á vítellógenín-estrógen svörunarþætti (ERE) og keyrðar af TATA-þætti músametallóþíónínstýrils (MT). Komið hefur í ljós að genasmíðin með TATA-þætti músametallóþíónínstýrils gefur bestan árangur og er því yfirleitt notuð. Með þessari hER $\alpha$ -HeLa-9903 frumulínu er því hægt að mæla getu prófunariðfnis til að kalla fram hER $\alpha$ -miðlaða aðvirkjun lúsíferasagenatjáningar.
6. Að því er varðar greiningu á ER-örva er túlkun gagna byggð á því hvort hámarks svörunarstig sem prófunariðefni kallar fram sé eða sé ekki jafnt eða hærra en svörun örva sem samsvarar 10% af því sem framkallast að hámarki með (1 nM) styrk jákvæða samantvörunarins (PC) 17 $\beta$ -estradióli (E2) (þ.e. PC10). Þegar um er að ræða greiningu á ER-blokkum er túlkun gagna byggð á því hvort svörunin sýni eða sýni ekki a.m.k. 30% lækkun í virkni miðað við þá svörun sem íbótarsamantvörunarsýnið (25 pM af E2) kallar fram án frumueiturhrifa. Fjallað er ítarlega um greiningu gagna og túlkun í lið 34–48.



## VERKFERLI

**Frumulínur**

- Í greiningunni skal nota HeLa-9903 frumulínuna með stöðugt innleiddan hER $\alpha$ . Hægt er að fá frumulínuna hjá frumusafninu Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB)<sup>1</sup>, gegn undirritun samnings um yfirfærslu efnis (e. *Material Transfer Agreement (MTA)*).
- Eingöngu skal nota frumur við prófunina sem eru lausar við berfryminga. Víxlritakjarnsýrumögnun (RT-PCR) er ákjósanleg aðferð fyrir næma greiningu á berfrymingasýkingu (4.–6. heimild).

**Stöðugleiki frumulínunnar**

- Til að vakta stöðugleika frumulínunnar skal nota E2, 17 $\alpha$ -estradiól, 17 $\alpha$ -metýltestósterón og kortikósterón sem viðmiðunarstaðla fyrir greiningu á örva og mæla skal heilan styrksvörunarferil þeirra prófunarstyrkbila sem eru gefin upp í töflu 1 a.m.k. einu sinni í hvert skipti sem greiningin er framkvæmd og niðurstöðurnar skulu vera í samræmi við niðurstöðurnar sem er að finna í töflu 1.
- Að því er varðar greiningu á blokkum skal mæla tvo heila styrkferla samtímis hverri keyrslu fyrir tvo viðmiðunarstaðla, tamoxífen og flútamíð. Vaktað skal að eigindleg flokkun þessara tveggja íðefna sem jákvætt eða neikvætt sé rétt.

**Skilyrði við frumurækt og ísetningu á bakka**

- Frumum skal viðhaldið í lágmarksæti Eagles (EMEM-æti) án fenólrauðs, að viðbættum 60 mg/l af sýkladrepandi kanamýsín og 10% nautgripafósturssermi meðhöndlað með dextranhúðuðum viðarkolum (DCC-FBS), í CO<sub>2</sub>-ræktunarkassa (5% CO<sub>2</sub>) við 37 $\pm$ 1 °C. Þegar 75–90% samrennsli er náð geta frumurnar farið í undirrækt í 10 ml af 0,4 x 10<sup>5</sup> – 1 x 10<sup>5</sup> frumur/ml fyrir 100 á frumuræktarskál. Frumurnar skulu leystar upp með 10% FBS-EMEM-æti (sem er það sama og EMEM-æti með DCC-FBS) og síðan settar í holur á örbakka með þéttleika sem nemur 1 x 10<sup>4</sup> frumur/(100  $\mu$ l x hola). Næst skulu frumurnar látnar standa í 5% CO<sub>2</sub>-ræktunarkassa við 37 $\pm$ 1 °C í 3 klukkustundir áður en þær eru látnar verða fyrir váhrifum af íðefninu. Plastbúnaðurinn skal vera laus við estrógenvirgni.
- Til að viðhalda heilleika svörunarinnar skal rækta frumurnar lengur en eina umsáningu úr frýsta stofninum í skilyrta ætinu og skulu ekki ræktaðar lengur en 40 umsáningar. Að því er varðar hER $\alpha$ -HeLa-9903 frumulínuna er þetta minna en þrjú mánuðir. Þó getur dregið úr nothæfi frumnanna ef þær eru ræktaðar við óviðeigandi ræktunarskilyrði.
- Hægt er að tilreiða DCC-FBS eins og lýst er í viðbæti 2.2, eða fá það á almennum markaði.

**Viðmiðanir fyrir ásættanleika**

*Jákvæðir og neikvæðir viðmiðunarstaðlar fyrir greiningu á ER-örva*

- Fyrir rannsóknina og meðan á henni stendur skal sannprófa svörunargetu prófunarkerfisins með viðeigandi styrkleika af sterku estrógeni: E2, veikt estrógen (17 $\alpha$ -estradiól), mjög veikur örvi (17 $\alpha$ -metýltestósterón) og neikvætt efni (kortikósterón). Ásættanleg bil gilda fengin úr fullgildingarrannsókninni (1. heimild) eru tilgreind í töflu 1. Þessir fjórir samskeiða viðmiðunarstaðlar skulu hafðir með í hverri tilraun og niðurstöðurnar skulu vera innan hinna tilteknu ásættanlegu marka. Ef þetta er ekki gert skal ákvarða ástæðurnar fyrir því að viðmiðanirnar fyrir ásættanleika eru ekki uppfylltar (t.d. meðhöndlun frumna, og gæði og styrkur sermis og sýklalyfja) og endurtaka greininguna. Þegar

(<sup>1</sup>) JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan Fax: +81-72-641-9812

viðmiðunum fyrir ásættanleika hefur verið náð er samræmd notkun efniviðar fyrir frumuræktun nauðsynleg til að tryggja lágmarksbreytileika EC50-, PC50- og PC10-gilda. Þessir fjórir samskeiða viðmiðunarstaðlar sem skulu hafðir með í hverri tilraun (sem er framkvæmd við sömu skilyrði þ.m.t. efniviður, endursáningarþrep frumna og tæknimenn) geta tryggt næmi greiningarinnar vegna þess að PC10-gildin í hinum þremur jákvæðu viðmiðunarstöðlum skulu vera innan tiltekins ásættanlegs sviðs og það sama á við um PC50- og EC50-gildin þegar unnt er að reikna þau út (sjá töflu 1).

Tafla 1

### Ásættanleg bil gilda fyrir viðmiðunarstaðlana fjóra fyrir greininguna á ER-örva

Heiti	logPC <sub>50</sub>	logPC <sub>10</sub>	logEC <sub>50</sub>	Hill-hallagildi	Bil í prófun
17β-estradiól (E2) CAS-númer: 50-28-2	-11,4~-10,1	<-11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10 <sup>-14</sup> ~10 <sup>-8</sup> M
17α-estradiól CAS-númer: 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10 <sup>-12</sup> ~10 <sup>-6</sup> M
Kortikósterón CAS-númer: 50-22-6	—	—	—	—	10 <sup>-10</sup> ~10 <sup>-4</sup> M
17α-metýltestósterón CAS-nr: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	—	—	10 <sup>-11</sup> ~10 <sup>-5</sup> M

### Jákvæðir og neikvæðir viðmiðunarstaðlar fyrir greiningu á ER-blokkum

15. Fyrir rannsóknina og meðan á henni stendur skal sannprófa svörunargetu prófunarkerfisins með víðeigandi styrkleika jákvæða efnisins (tamoxífen) og neikvæða efnisins (flútamíð). Ásættanleg bil gilda fengin úr fullgildingarrannsókninni (1. heimild) eru tilgreind í töflu 2 Þessir tveir samskeiða viðmiðunarstaðlar skulu hafðir með í hverri tilraun og niðurstöðurnar skulu metnar með réttum hætti eins og sýnt er í viðmiðuninni. Ef þetta er ekki gert skal ákvarða ástæðurnar fyrir því að viðmiðanirnar eru ekki uppfylltar (t.d. meðhöndlun frumna, og gæði og styrkur sermis og sýklalyfja) og endurtaka greininguna. Að auki skal reikna út IC50-gildi fyrir jákvætt efni (tamoxífen) og niðurstöðurnar skulu vera innan hinna tilteknu ásættanlegu marka. Þegar viðmiðunum fyrir ásættanleika hefur verið náð er samræmd notkun efniviðar fyrir frumuræktun nauðsynleg til að tryggja lágmarksbreytileika IC50-gilda. Þessir tveir samskeiða viðmiðunarstaðlar sem skulu hafðir með í hverri tilraun (sem er framkvæmd við sömu skilyrði, þ.m.t. efniviður, endursáningarþrep frumna og tæknimenn) geta tryggt næmi greiningarinnar (sjá töflu 2).

Tafla 2

### Viðmiðanir og ásættanleg bil gilda fyrir viðmiðunarstaðlana tvo fyrir greininguna á ER-blokkum

Heiti	Viðmiðanir	LogIC <sub>50</sub>	Bil í prófun
Tamoxífen CAS-númer: 10540-29-1	Jákvætt: reikna skal út IC <sub>50</sub>	-5,942 ~ -7,596	10 <sup>-10</sup> ~ 10 <sup>-5</sup> M
Flútamíð CAS-númer: 13311-84-7	Neikvætt: ekki skal reikna skal út IC <sub>30</sub>	—	10 <sup>-10</sup> ~ 10 <sup>-5</sup> M

*Jákvæður samanburður og samanburður með burðarefni*

16. Prófa skal jákvæða samanburðinn (PC) fyrir greiningu á ER-örva (1 nM af E2) og fyrir greiningu á ER-blokkum (10µM TAM) í a.m.k. þremur settum í hverjum bakka. Burðarefnið sem er notað til að leysa upp prófunaríðefni skal prófað sem samanburður með burðarefni (VC) í a.m.k. þremur settum í hverjum bakka. Ef notað er öðruvísi burðarefni í jákvæða samanburðinum en prófunaríðefnið skal til viðbótar við þetta bætt við prófun með öðrum samanburði með burðarefni en í a.m.k. þremur settum á sama bakka með jákvæða samanburðinum.

*Gæðaviðmiðanir fyrir greiningu á ER-örva*

17. Meðaltal lúsíferasavirkni fyrir jákvæða samanburðinn (1 nM E2) skal vera a.m.k. fjórfalt meðaltalið af samanburðinum með burðarefni (VC) á hverjum bakka. Þessi viðmiðun er fastsett á grundvelli áreiðanleika gildanna fyrir endapunktana úr fullgildingarrannsókninni (sögulega á milli fjór- og þrjátíufalt).
18. Að því er varðar gæðaeftirlitið með greiningunni skal margfeldi vakningarinnar sem samsvarar PC10-gildi samskeiða jákvæða samanburðarins (PC) (1 nM E2) vera meira en 1+2 staðalfrávik (SD) margfeldisgildis vakningarinnar (=1) fyrir samskeiða samanburðinn með burðarefni (VC). Í þágu forgangsröðunar getur PC10-gildið verið gagnlegt til einfalda nauðsynlega gagnagreiningu í samanburði við tölfræðilega greiningu. Þó að tölfræðileg greining veiti upplýsingar um mikilvægi er slík greining ekki megindleg breyta að því er varðar mátt sem byggist á styrk og er því ekki eins gagnleg hvað forgangsröðun varðar.

*Gæðaviðmiðanir fyrir greiningu á ER-blokka*

19. Meðaltal lúsíferasavirkni fyrir íbótarsamanburðarsýnið (25 nM E2) skal vera a.m.k. fjórfalt meðaltalið af samanburðinum með burðarefni (VC) á hverjum bakka. Þessi viðmiðun er fastsett á grundvelli áreiðanleika gildanna fyrir endapunktana úr fullgildingarrannsókninni.
20. Að því er varðar gæðaeftirlit með greiningunni skal hlutfallsleg umritunarvirkjun (e. *relative transcriptional activation*, RTA) á 1 nM E2 vera yfir 100%, RTA á 1µM 4-hýdroxýtamoxífeni (OHT) skal vera undir 40,6% og RTA á 100 µM digitónín (Dig) vera undir 0%.

Sýnt fram á hæfni rannsóknarstofu (sjá 14. lið og töflu 3 og 4 í „ÞÆTTIR ER TA-GREININGAR“ í þessari prófunaraðferð).

**Burðarefni**

21. Sem samskeiða samanburð með burðarefni (VC) skal nota dímetýlsúlfoxíð, eða viðeigandi leysi, í sama styrkleika og er notaður fyrir hina mismunandi jákvæðu og neikvæðu samanburði og prófunaríðefnin. Upplýsingar prófunaríðefna skal vera í leysi sem leysir upp viðkomandi prófunaríðefni og getur blandast frumuætinu. Vatn, etanól (95–100% hreinleiki) og dímetýlsúlfoxíð eru hentug burðarefni. Ef notað er dímetýlsúlfoxíð skal magnið ekki fara yfir 0,1% (rúmmálshlutfall). Sýna skal fram á fyrir öll burðarefni að hámarksrúmmálið sem er notað sé ekki frumueitrandi og að það trufla ekki nothæfi greiningarinnar.

**Tilreiðsla prófunaríðefna**

22. Almennu skulu prófunaríðefnin leyst upp í dímetýlsúlfoxíði eða öðrum hentugum leysi og þau raðþynnt með sama leysinum í almenna hlutfallinu 1:10 til að undirbúa lausnir fyrir þynningu með ætinu.

**Leysni og frumueiturhrif: atriði sem þarf að hafa í huga varðandi ákvörðun á skammtastærð**

23. Framkvæma skal forprófun til að ákvarða viðeigandi styrkbil íðefnisins sem á að prófa og til að ganga úr skugga um hvort vandi að því er varðar leysni og frumueiturhrif fylgi prófunaríðefninu. Í upphafi eru íðefnin prófuð upp að hámarksstyrknum sem nemur 1 µl/ml, 1 mg/ml eða 1 mM, eftir því hver þeirra er lægstur. Fyrsta endanlega keyrslan, byggð á því hversu mikil frumueiturhrif eða skortur á leysni koma fram í forprófuninni, skal prófa íðefnið við log-röð þynninga sem hefjast á leyfilegum hámarksstyrk (t.d. 1 mM, 100µM, 10µM, o.s.frv.) og veita skal því athygli hvort vart verður við grugg, botnfall eða frumueiturhrif. Styrkleikar í annarri og, ef þörf krefur, þriðju keyrslu skulu aðlagðir eins og við á til að lýsa betur eiginleikum ferils styrkháðrar svörunar og forðast styrkleika sem eru óleysanlegir eða framkalla mikil frumueiturhrif.

24. Að því er varðar ER-örva og -blokka getur aukinn styrkur frumueiturhrifa valdið verulegum breytingum á eða fjarlæggt hefðbundna sigmoid-svörun og skal hafa það í huga við túlkun gagnanna. Nota skal prófunaraðferðir fyrir frumueiturhrif, sem geta veitt upplýsingar varðandi 80% lífvænleika frumna, með viðeigandi greiningu sem byggir á rannsóknarstofureynslu.
25. Ef niðurstöðurnar úr frumueiturhrifafrófuninni sýna að styrkleiki prófunaríðefnisins hefur dregið úr frumufjölda um 20% eða meira skal sá styrkur teljast frumueitrandi og styrkleikar við og yfir frumueitrandi styrknum ekki hafðir með í matinu.

#### Váhrif af íðefni og skipulagning greiningarbakka

26. Framkvæmd við aðferðina við þynningu íðefnis (1. og 2. þrep) og váhrif á frumur (3. þrep) er hægt að hafa sem hér segir:

1. þrep: Hvert prófunaríðefni skal raðþynnt í dímetýlsúlfoxíði (DMSO), eða viðeigandi leysi, og bætt í holurnar á míkroútrunarbakka til að ná fram endanlegum raðbundnum styrkleikum sem voru ákvarðaðir með forprófuninni á skammtastærðum (einkum í röðum af t.d. 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, og 10 pM ( $10^{-3}$ - $10^{-11}$  M)) fyrir prófanir í þremur settum.

2. þrep: Þynning íðefnis: Fyrst er þynntur 1,5 µl af prófunaríðefninu í leysinum upp að rúmmálinu 500 µl af æti.

3. þrep: Váhrif af íðefni á frurnar: Bætið 50 µl af þynningu með æti (undirbúningur skv. 2. þrepi) í greiningarholu sem inniheldur  $10^4$  frumur/100 µl/holu.

Ráðlagt endanlegt magn nauðsynlegs ætis fyrir hverja holu er 150 µl. Prófunarsýnum og viðmiðunarstöðlum má skipta niður eins og sýnt er í töflu 3 og töflu 4.

Tafla 3

#### Dæmi um skiptingu viðmiðunarstaðlanna eftir styrkleika í greiningarbakkanum við greiningu á ER-örva

Röð	17α-metýltestósterón			Kortikósterón			17α-estradiól			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	styrkur 1 (10 µM)	→	→	100 µM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	styrkur 2 (1 µM)	→	→	10 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	styrkur 3 (100 nM)	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	styrkur 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	styrkur 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	styrkur 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	styrkur 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Samanburður með burðarefni (0,1% DMSO), PC: Jákvæður samanburður (1 nM E2)

27. Viðmiðunarstaðlarnir (E2, 17 $\alpha$ -estradiól, 17 $\alpha$ -metyltestósterón og kortikósterón) skulu prófaðir í hverri keyrslu (tafla 3). PC-holur meðhöndlaðar með 1 nM af E2 sem getur kallað fram hámarksvakningu og E2 og VC-holur meðhöndlaðar eingöngu með dímetýlsúlfoxíði (eða viðeigandi leysi) skulu hafðar með á hverjum prófunarbakka greiningarinnar (tafla 4). Ef frumur af mismunandi uppruna (t.d. mismunandi umsáningartala, mismunandi lotur o.s.frv.) eru notaðar í sömu tilraun skal prófa viðmiðunarstaðlana fyrir hvern frumugjafa.

Tafla 4

## Dæmi um skiptingu á styrkleika á prófunar- og samanburðaríðefnum í greiningarbakkanum í greiningunni á ER-örva

Röð	Prófunaríðefni 1			Prófunaríðefni 2			Prófunaríðefni 3			Prófunaríðefni 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	styrkur 1 (10 $\mu$ M)	→	→	1 mM	→	→	1 $\mu$ M	→	→	10 nM	→	→
B	styrkur 2 (1 $\mu$ M)	→	→	100 $\mu$ M	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	styrkur 3 (100 nM)	→	→	10 $\mu$ M	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	styrkur 4 (10 nM)	→	→	1 $\mu$ M	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	styrkur 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	styrkur 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	styrkur 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Samanburður með burðarefni (0,1% DMSO), PC: Jákvæður samanburður (1 nM E2)

Tafla 5

## Dæmi um skiptingu á styrkleika viðmiðunarstaðlanna í greiningarbakkanum í greiningunni á ER-blokkum

Röð	Tamoxífen			Flútamíð			Prófunaríðefni 1			Prófunaríðefni 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	styrkur 1 (10 $\mu$ M)	→	→	10 $\mu$ M	→	→	10 $\mu$ M	→	→	10 $\mu$ M	→	→
B	styrkur 2 (1 $\mu$ M)	→	→	1 $\mu$ M	→	→	1 $\mu$ M	→	→	1 $\mu$ M	→	→
C	styrkur 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	styrkur 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	styrkur 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	styrkur 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1% DMSO	→	→	→	→	→	1 $\mu$ M OHT	→	→	100 $\mu$ M Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Samanburður með burðarefni (0,1% DMSO), PC: Jákvæður samanburður (1 nM E2), OHT: 4-hýdroxýtamoxífen, Dig: Digtónín.



= íbætt 25 pM E2

28. Til að meta blokkandi virkni íðefna skal 25pM E2 bætt í greiningarholur í röðum A-G. Prófa skal viðmiðunarstaðlana (tamoxífen og flútamíð) í hverri keyrslu. Í hverjum prófunargreiningarbakka skulu vera PC-holur meðhöndlaðar með 1 nM af E2 sem hægt er að nota sem gæðaeftirlit með hER $\alpha$ -HeLa-9903 frumulínu, VC-holur meðhöndlaðar með DMSO (eða viðeigandi leysi), 0,1% DMSO-holur meðhöndlaðar með DMSO-viðbót við hið íbætta E2 sem samsvarar íbótarsamanburðarsýninu (e. *Spike-in control*), holur meðhöndlaðar með lokastyrk 1  $\mu$ M OHT og holur meðhöndlaðar með 100  $\mu$ M Dig (tafla 5). Síðari greiningarbakkar skulu fylgja sama bakkaskipulagi án hola fyrir viðmiðunarstaðlana (tafla 6). Ef frumur af mismunandi uppruna (t.d. mismunandi umsáningartala, mismunandi lotur o.s.frv.) eru notaðar í sömu tilraun skal prófa viðmiðunarstaðlana fyrir hvern frumugjafa.

Tafla 6

**Dæmi um skiptingu á styrkleika prófunar- og samanburðariðefnum í greiningarbakkanum í greiningunni á ER-blokkum**

Röð	Tamoxífen			Flútamíð			Prófunariðefni 1			Prófunariðefni 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	styrkur 1 (10 $\mu$ M)	→	→	10 $\mu$ M	→	→	10 $\mu$ M	→	→	10 $\mu$ M	→	→
<b>B</b>	styrkur 2 (1 $\mu$ M)	→	→	1 $\mu$ M	→	→	1 $\mu$ M	→	→	1 $\mu$ M	→	→
<b>C</b>	styrkur 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
<b>D</b>	styrkur 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
<b>E</b>	styrkur 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
<b>F</b>	styrkur 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
<b>G</b>	0,1% DMSO	→	→	→	→	→	1 $\mu$ M OHT	→	→	100 $\mu$ M Dig	→	→
<b>H</b>	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Samanburður með burðarefni (0,1% DMSO), PC: Jákvæður samanburður (1 nM E2), OHT: 4-hýdroxýtamoxífen, Dig: Digitónín.

 : íbætt 25 pM af E2

29. Staðfesta skal að skiláhrif séu ekki til staðar, eins og við á, og ef grunur vaknar um skiláhrif skal breyta skipulagi bakkans til að forðast slíkar truflanir. Til dæmis er hægt að nota bakkaskipulag þar sem holurnar við skilin eru ekki notaðar.
30. Eftir að íðefnunum er bætt við skal láta greiningarbakkana standa í 5% CO<sub>2</sub>-ræktunarkassa við 37±1 °C í 20–24 klst. til að kalla fram vísigensafurðirnar.
31. Taka skal sérstakt tillit til þeirra efnasambanda sem eru mjög rokgjörn. Í slíkum tilvikum geta nálægar samanburðarholur gefið falsjávæðar niðurstöður og skal hafa það í huga í ljósi væntanlegra og sögulegra samanburðargilda. Í nokkrum tilvikum þar sem rokgirni kann að valda áhyggjum getur notkun „bakkainnsigla“ hjálpað til við að einangra stakar holur meðan á prófun stendur og er í slíkum tilvikum mælt með notkun þeirra.
32. Framkvæma skal endurteknar endanlegar prófanir fyrir sama íðefni á mismunandi dögum til að tryggja óhæði.

### Lúsíferasagreining

33. Nota má prófefni fyrir lúsíferasagreiningu sem fæst á almennum markaði (t.d. Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510 eða sambærilegt)) eða stöðluð lúsíferasagreiningarkerfi (t.d. Promega, E1500, eða sambærilegt) við greininguna að því tilskildu að viðmiðanirnar fyrir ásættanleika séu uppfylltar. Velja skal prófefnin fyrir greininguna á grundvelli næmleika ljósmælisins sem verður notaður. Þegar staðlað lúsíferasagreiningarkerfi er notað skal nota sundrunarprófefni fyrir frumurækt (t.d. Promega, E1531, eða sambærilegt) áður en hvarfefninu er bætt við. Lúsíferasaprófunarefnið skal nota í samræmi við leiðbeiningar framleiðandans.

## GREINING GAGNA

**Greining á ER-örva**

34. Að því er varðar greiningu á ER-örva, til að ná fram hlutfallslegri umritunarvirkni fyrir PC (1 nM af E2), er hægt að greina ljómunarmerki frá sama bakka samkvæmt eftirfarandi þrepum (aðrar sambærilegar stærðfræðiaðferðir eru einnig ásættanlegar):

1. þrep Meðalgildið fyrir VC er reiknað út.
2. þrep Meðalgildið fyrir VC er dregið frá hverju holugildi til að staðla gögnin.
3. þrep Meðaltalið fyrir staðlaðan PC er reiknað út.
4. þrep Deilt er í staðlað gildi hvar hulu í bakkanum með meðalgildi hins staðlaða PC (PC=100%).

Endanlegt gildi hvar hulu er hlutfallsleg umritunarvirkni fyrir þá hulu í samanburði við PC-svörunina.

5. þrep Meðalgildi hlutfallslegu umritunarvirkinnar fyrir hvern styrkleikahóp prófunaríðfnisins er reiknað út. Svörunin felur í sér tvær stærðir: meðalumritunarvirknina (svörun) og styrkleikann þegar svörunin á sér stað (sjá eftirfarandi hluta).

**Atriði sem þarf að hafa í huga varðandi vakningu við EC<sub>50</sub>, PC<sub>50</sub> og PC<sub>10</sub>**

35. Til að reikna út EC<sub>50</sub> þarf svörunarferilinn fyrir alla styrkleika en komið getur fyrir að það sé ómögulegt eða óraunhæft vegna takmarkana á styrkbili prófunarinnar (t.d. vegna vandamála varðandi frumueiturhrif eða leysni). Þar eð EC<sub>50</sub> og hámarksgildi vakningar (sem samsvarar hæsta gildi Hill-jöfnunnar) eru upplýsandi mæliþættir skal þó tilgreina þessa þætti þegar því verður við komið. Fyrir útreikninginn á EC<sub>50</sub> og hámarksgildi vakningar skal nota viðeigandi tölfræðihugbúnað (t.d. tölfræðihugbúnaðinn Graphpad Prism). Ef umhverfður veldisvísisferill Hill á við fyrir gögnin um styrkháða svörun skal reikna EC<sub>50</sub> út með eftirfarandi jöfnu (7. heimild):

$Y = \text{botn} + (\text{toppur} - \text{botn}) / (1 + 10^{\exp((\log EC_{50} - X) \times \text{Hill-hallagildi}))}$  þar sem:

X er logri fyrir styrkleikann og

Y er svörunin og Y byrjar á botninum og fer upp á topp í sigmoid-ferli. Botninn er fastsettur við núll í umhverfða veldisvísisferli Hill.

36. Fyrir hvert prófunaríðefni skal tilgreina eftirfarandi:

RPCMax, sem er hámarksgildi svörunar sem prófunaríðefni framkallar, sett fram sem hundraðshluti svörunar sem 1 nM E2 framkallar á sama bakka, ásamt PCMax (styrkleiki í tengslum við RPCMax), og

að því er varðar jákvæð íðefni, styrkleikana sem framkölluðu PC10 og, ef við á, PC50.

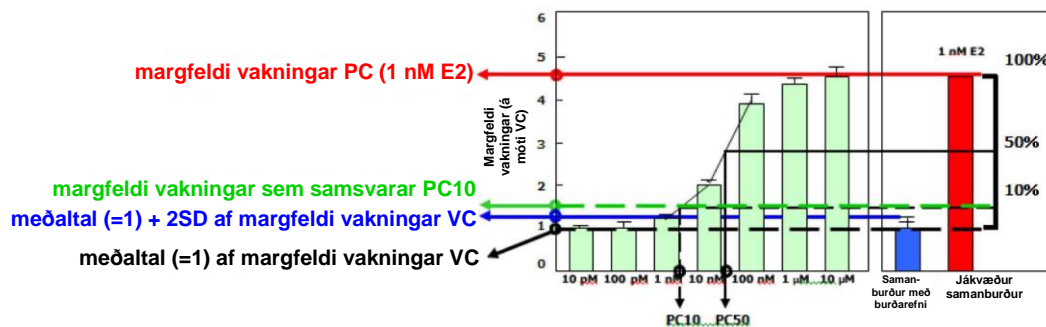
37. PCx-gildið er hægt að reikna út með innreikningi milli 2 punkta á X-Y-hnitakerfinu, öðrum beint fyrir ofan og hinum beint fyrir neðan PCx-gildi. Ef gagnapunktarnir sem liggja beint fyrir ofan og neðan PCx-gildið hafa annars vegar hnitin (a,b) og hins vegar (c,d) þá er hægt að reikna út PCx-gildið með eftirfarandi jöfnu:

$$\log[\text{PCx}] = \log[c] + (x-d)/(d-b)$$

38. Lýsingu á PC-gildum er að finna á mynd 1 hér fyrir neðan.

Mynd 1

Dæmi um hvernig skal leiða út PC-gildi. PC (1 nM af E2) er hafður með á hverjum greiningarbakka



### Greining á ER-blokkum

39. Að því er varðar greiningu á ER-blokkum, til að ná fram hlutfallslegri umritunarvirkni (RTA) á móti íbótarsamburðarsýni (25 pM af E2) er hægt að greina ljómunarmerkin frá sama bakka samkvæmt eftirfarandi þrepum (aðrar sambærilegar stærðfræðiaðferðir eru einnig ásætlanlegar):

1. þrep Meðalgildið fyrir VC er reiknað út.

2. þrep Meðalgildið fyrir VC er dregið frá hverju holugildi til að staðla gögnin. 3. þrep Meðaltal fyrir staðlaða íbótarsamburðarsýnið er reiknað út.

4. þrep Deilt er í staðlað gildi hvorrar holu í bakkanum með meðalgildi staðlaða íbótarsamburðarsýnisins (íbæting í samanburð=100%).

Endanlegt gildi hvorrar holu er hlutfallsleg umritunarvirkni fyrir þá holu í samanburði við svörun íbótarsamburðarsýnisins.

5. þrep Meðalgildi hlutfallslegu umritunarvirkinnar fyrir hverja meðhöndlun er reiknað út.

### Atriði sem þarf að hafa í huga varðandi IC<sub>30</sub>- og IC<sub>50</sub>-vakningu

40. Að því er varðar jákvæð íðefni skal gefa upp styrkleikana sem framkölluðu IC<sub>30</sub> og, ef við á, IC<sub>50</sub>.

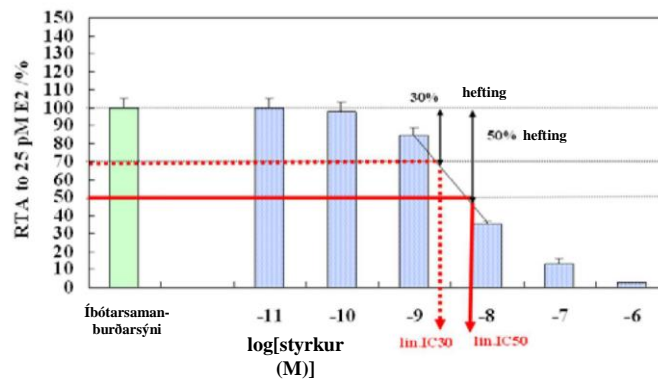


41. IC<sub>x</sub>-gildið er hægt að reikna út með innreikningi milli 2 punkta á X-Y-hnitakerfinu, öðrum beint fyrir ofan og hinum beint fyrir neðan IC<sub>x</sub>-gildi. Ef gagnapunktarnir sem liggja beint fyrir ofan og neðan IC<sub>x</sub>-gildið hafa annars vegar hnitin (c,d) og hins vegar (a,b) þá er hægt að reikna út IC<sub>x</sub>-gildið með eftirfarandi jöfnu:

$$\ln IC_x = a - (b - (100 - x)) \cdot (a - c) / (b - d)$$

Mynd 2

**Dæmi um hvernig skal leiða út IC-gildi. Íbótarsamanburðarsýni (25 pM af E2) er haft með á hverjum greiningarbakka.**



RTA: hlutfallsleg umritunarvirkni

42. Niðurstöðurnar skulu byggjast á tveimur (eða þremur) óháðum keyrslum. Ef úr tveimur keyrslum koma samanburðarhæfar niðurstöður, og þar af leiðandi samanburðarnákvæmar, er ekki nauðsynlegt að framkvæma þriðju keyrsluna. Til að vera ásættanlegar skulu niðurstöðurnar:

- uppfylla viðmiðanirnar fyrir ásættanleika (sjá Viðmiðanir fyrir ásættanleika, 14.–20. lið),
- vera samanburðarnákvæmar.

### Viðmiðanir um túlkun gagna

Tafla 7

#### Jákvæðar og neikvæðar viðmiðanir fyrir ákvarðanir í greiningu á ER-örva

Jákvæðar	Ef það RPCMax sem fæst er jafnt eða meira en 10% af svöruninni í jákvæða samanburðinum í a.m.k. tveimur af tveimur eða tveimur af þremur keyrslum.
Neikvæðar	Ef RPCMax nær ekki a.m.k. 10% af svöruninni í jákvæða samanburðinum í tveimur af tveimur eða tveimur af þremur keyrslum.

## Tafla 8

**Jákvæðar og neikvæðar viðmiðanir fyrir ákvarðanir í greiningu á ER-blokkum**

Jákvæðar	Ef IC30 reiknast í a.m.k. tveimur af tveimur, eða tveimur af þremur, keyrslum.
Neikvæð	Ef IC30 reiknast ekki út í tveimur af tveimur, eða tveimur af þremur, keyrslum.

43. Viðmiðanir um túlkun gagna eru sýndar í töflum 7 og 8. Jákvæðar niðurstöður einkennast af bæði magni áhrifanna og styrksins þegar áhrifanna verður vart. Bæði þessara markmiða nást ef uppgæfna niðurstöður eru að fyrir greininguna á örva náist styrkur sem gefur gildin 50% (PC50) eða 10% (PC10) í jákvæða samanburðinum og ef gildi heftingarinnar í íbótarsamanburðarsýninu við greininguna á blokkum er 50% (IC50) eða 30% (IC30). Prófunaríðefni telst þó vera jákvætt ef hámarkssvörun sem prófunaríðefnið framkallar (RPCMax) er jöfn eða meiri en 10% svörunarinnar í jákvæða samanburðinum í a.m.k. tveimur af tveimur, eða tveimur af þremur, keyrslum, á meðan prófunaríðefni telst neikvætt ef RPCMax nær ekki a.m.k. 10% svörunarinnar í jákvæða samanburðinum í tveimur af tveimur eða tveimur af þremur keyrslum.
44. Hægt er að framkvæma útreikningana á PC10, PC50 og PCMax í greiningu á ER-örva og IC30 og IC50 í greiningu á ER-blokkum með töflureikni sem er aðgengilegur ásamt viðmiðunarreglunum um prófanir á opinberu vefsetri Efnahags- og framfarastofnunarinnar (2. heimild) <sup>(2)</sup>.
45. Það ætti að nægja að ná fram PC10- eða PC50-gildum og IC30- eða IC50-gildum a.m.k. tvisvar. Ef grunn gögn sama styrkbils sem fást með þessu sýna óásættanlega háan fráviksstuðul (CV; %) geta gögnin þó ekki talist áreiðanleg og tilgreina skal uppruna slíks breytileika. Fráviksstuðull óunnu gagnasettanna þriggja (þ.e. gögn um styrk ljómunar) fyrir gagnapunktana sem eru notaðir í útreikninginn á PC10 skal vera undir 20%.
46. Þegar viðmiðanirnar fyrir ásættanleika eru uppfylltar bendir það til þess að greiningarkerfið starfi á tilhlýðilegan hátt en það tryggir ekki að tiltekin keyrsla gefi nákvæm gögn. Endurtekning niðurstaðnanna úr fyrstu keyrslunni er besta trygging þess að nákvæm gögn hafi fengist.
47. Að því er varðar greiningu á ER-örva, ef meiri upplýsingar þarf til viðbótar þeim sem gegna hlutverki við skimun og forgangsroðun vegna þessarar viðmiðunarreglu um prófanir fyrir jákvæð prófunaríðefni, einkum PC10-PC49-íðefni og íðefni sem grunur leikur á að oförvi lúsíferasa, er hægt að staðfesta með notkun ER $\alpha$ -blokkara að lúsíferasavirknin sem mælist sé eingöngu ER $\alpha$ -sértæk svörun (sjá viðbæti 2.1).

## PRÓFUNARSKÝRSLA

48. Sjá 20. lið „ÞÆTTIR ER TA-GREININGAR“

## HEIMILDIR

- 1) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 2) Escande A., et al. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol., 71, 1459-1469.
- 3) Kuiper G.G., et al. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinol., 139, 4252-4263.

<sup>(2)</sup> <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

- 4) Spaepen M., et al. (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, *FEMS Microbiol. Lett.*, 78(1), 89-94.
- 5) Kobayashi H., et al. (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769- 71.
- 6) Dussurget O. and Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(3), 953-9.
- 7) De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, *Am. J. Physiol.*, 235, E97-E102.

*Viðbætur 2.1***FALSJÁKVÆÐAR NIÐURSTÖÐUR: MAT Á LJÓMUNARMERKJUM SEM ER EKKI MIÐLAÐ MED VIÐTAKA**

1. Falsjákvæðar niðurstöður greiningar á ER-örva geta fengist vegna virkjunar á lúsíferasageninu sem er ekki miðlað með estrógenviðtaka (ER) eða beinnar virkjunar genaafurðarinnar eða ótengdrar flúrljómunar. Slík áhrif koma fram sem ófullkominn eða óvenjulegur skammtasvörunarferill. Ef grunur vaknar um slík áhrif skal rannsaka áhrif ER-blokka (t.d. 4-hýdroxýtamoxifen (OHT) við styrkleika sem sýnir engin eiturrhif) á svörunina. Hreini blokkinn ICI 182780 kann að vera óhentugur í þessum tilgangi þar sem hæfilegur styrkur ICI 182780 kann að draga úr VC-gildinu og það hefur áhrif á gagnagreininguna.
2. Til að tryggja gildi þessarar nálgunar þarf að prófa eftirfarandi á sama bakka:
  - örvavirkni óþekktar íðefnisins með / án 10 µM OHT
  - VC (þrjú sett)
  - OHT (þrjú sett)
  - 1 nM af E2 (þrjú sett) sem jákvæður samanburður með örva
  - 1 nM af E2 + OHT (þrjú sett)

**Viðmiðanir um túlkun gagna**

Athugasemd: Allar holur skulu meðhöndlaðar með burðarefni í sama styrk.

- Ef örvavirkni óþekktar íðefnisins verður EKKI fyrir áhrifum af meðhöndluninni með ER-örva flokkast það sem „neikvætt“.
- Ef örvavirkni óþekktar íðefnisins er algerlega heft skal nota ákvörðunarviðmiðanirnar.
- Ef örvavirkni við lægsta styrkleika er jöfn PC10-svöruninni eða hærrí henni er hefting óþekktar íðefnisins jöfn PC10-svöruninni eða hærrí. Mismunurinn á svörununum í holum sem eru ekki meðhöndlaðar með ER-örvanum og holum sem eru meðhöndlaðar með honum er reiknaður út og þessi mismunur telst vera hin rétta svörun og skal nota fyrir útreikninginn á viðeigandi mæliþáttum til að gera kleift að ákvarða flokkun.

**Greining gagna**

Athugun á kröfunni um nothæfi

Frávíksstuðullinn (CV) milli holna sem eru meðhöndlaðar við sömu skilyrði er athugaður.

1. Meðalgildið fyrir VC er reiknað út.
2. Meðalgildið fyrir VC er dregið frá gildi hvers holu sem er ekki meðhöndluð með OHT.
3. Meðalgildið fyrir OHT er reiknað út.
4. Meðalgildið fyrir VC er dregið frá gildi hvers holu sem er meðhöndluð með OHT.
5. Meðalgildið fyrir PC er reiknað út.
6. Hlutfallsleg umritunavirkni allra annarra hola er reiknuð út með hliðsjón af jákvæða samanburðinum.

## Viðbætur 2.2

## TILREIÐSLA Á SERMI SEM ER MEÐHÖNDLAÐ MEÐ DEXTRANHÚÐUÐUM VIÐARKOLUM (DCC)

1. Meðhöndlun á sermi með dextranshúðuðum viðarkolum (DCC) er almenn aðferð til að fjarlægja estrógenefnaleifar úr sermi sem er bætt við frumuæti til að útiloka þjagaða svörun sem tengist estrógenleifum í sermi. Hægt er að meðhöndla 500 ml nautgripafósturssermis (FBS) með þessari aðferð.

**Efnisþættir**

2. Gerð er krafa um eftirfarandi efnivið og búnað:

Efniviður

Virk viðarkol

Dextran

Magnesiumklóríðhexahýdrat ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ )

Súkrósi

1 M HEPES-jafnalausn (pH 7.4)

Ofurhreint vatn frá síukerfi

Búnaður

Gufusæft glerflát (aðlaga skal stærð eins og við á), almenn rannsóknarstofuskilvinda (sem hægt er að stilla hitastig á 4 °C)

**Aðferð**

3. Eftirfarandi aðferð er löguð að notkun á 50 ml skilvinduglösum:

[1. dagur] Útbúið sviflausn með dextranshúðuðum viðarkolum úr 1 l af ofurhreinu vatni sem inniheldur 1,5 mM af  $MgCl_2$ , 0,25 M af súkrósa, 2,5 g af viðarkolum, 0,25 g af dextransi og 5 mM af HEPES og hrærið við 4 °C yfir nótt.

[2. dagur] Setjið sviflausnina í 50 ml skilvinduglös og skiljið í skilvindu við 10 000 snún./mín. við 4 °C í 10 mínútur. Fjarlægið flotið og geymið helminginn af viðarkolasetinu við 4 °C til að nota á 3. degi. Leysið hinn helminginn af viðarkolonum upp með FBS, sem hefur verið afþítt varlega til að forðast útfellingu og óvirkjað með hitun við 56 °C í 30 mínútur, og færið það svo í gufusæft glerflát s.s. keiluflösku. Hrærið varlega í sviflausninni við 4 °C yfir nótt.

[3. dagur] Skammtið sviflausnina með FBS í skilvinduglös til að skilja í skilvindu við 10 000 snún./mín. við 4 °C í 10 mínútur. Safnið FBS saman og færið yfir í nýja viðarkolasetið sem var útbúið og geymt á 2. degi. Leysið upp viðarkolasetið og hrærið varlega í þessari sviflausn í gufusæfðu glerfláti við 4 °C yfir nótt.

[4. dagur] Skammtið sviflausnina fyrir skiljun við 10 000 snún./mín. við 4 °C í 10 mínútur og dauðhreinsið flotið með síun í gegnum 0,2 µm dauðhreinsaða síu. Þetta FBS sem er meðhöndlað með DCC skal geymt við -20 °C og hægt er að nota það í allt að eitt ár.

## 3. viðbætur.

## VM7LUC-GREINING Á AÐVIRKJUN ESTRÓGENVIÐTAKA TIL AÐ GREINA ESTRÓGENVIÐTAKAÖRVA OG -BLOKKA

## ATRÍÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI (SJÁ EINNIG „ALMENNUR INNGANGUR“)

1. Í þessari greiningu er notuð VM7Luc4E2-frumulínan<sup>(1)</sup>. Samræmingarstofnunin fyrir mat á eiturefnafræðilegum staðgönguáðferðum (NICEATM) og samræmingarnefnd stofnana um fullgildingu staðgönguáðferða (ICCVAM) hafa fullgilt hana (1. heimild). VM7LUC-frumulínan tjáir aðallega innrænt ER $\alpha$  og lítið magn af innrænu ER $\beta$  (2.–4. heimild).
2. Þessi greining á við um margvísleg efni að því tilskildu að hægt sé að leysa þau upp í dímetýlsúlfoxíði (DMSO; CAS-númer 67-68-5), þau hvarfist ekki við DMSO eða frumuræktunartíð og séu ekki frumueitrandi í þeim styrkleika sem er prófaður. Ef ekki er hægt að nota DMSO er hægt að nota annað burðarefni s.s. etanól eða vatn (sjá 12. lið). Það nothæfi VM7Luc ER TA-greiningar á örva/blokkum sem sýnt hefur verið fram á gefur til kynna að gögn sem verða til með þessari greiningu kunni að upplýsa um ER-miðlaða verkunarmáta og gæti komið til álita við forgangsröðun efna til frekari prófunar.
3. Þessi greining er hönnuð sérstaklega til að nema hER og hER $\beta$ -miðlaða TA með því að mæla efnaljómun sem endapunktur. Notkun á efnaljómun í lífgreiningu er útbreidd þar sem hlutfall ljómunarmerkis er hátt miðað við bakgrunn (10. heimild). Virkni lúsíferasa úr eldflogum í frumumiðuðum greiningum getur þó ruglast vegna efna sem hefta lúsíferasaensímið og valda ýmist greinilegri heftingu eða aukinni ljómun vegna stöðgunar prótína (10. heimild). Í nokkrum vísigensgreiningum sem byggja á lúsíferasa með plöntuestrógenstyrk sem er yfir 1  $\mu$ M hafa að auki verið skráð ljómunarmerki sem er ekki miðlað með viðtaka vegna ofvirkjunar á vísigeni lúsíferasans (9. og 11. heimild). Þó að skammtasvörunarferill gefi til kynna að raunvirkjun ER-kerfisins eigi sér stað við lægri styrk þarf að rannsaka gaumgæfilega, í ER TA-greiningarkerfum með innleiðslu sem er stöðug (sjá 2. viðbæti), tjáningu lúsíferasa sem fæst við háan styrk plöntuestrógena eða svipaðra efnasambanda sem grunur leikur á um að valdi plöntuestrógenlíkri ofvirkjun lúsíferasavísigens.
4. Lesa skal „ALMENNUR INNGANGUR“ og „ÞÆTTIR ER TA-GREININGAR“ áður en þessi greining er notuð í eftirlitsskyni. Skilgreiningar og skammstafanir sem notaðar eru í þessari prófunaraðferð eru settar fram í 1. viðbæti.

## MEGINREGLA GREININGARINNAR (SJÁ EINNIG „ALMENNUR INNGANGUR“)

5. Greiningin er notuð til að sýna ER-bindilsbindingu og síðan yfirferslu viðtaka- og bindilsflókans yfir í kjarnann. Í kjarnanum binst viðtaka- og bindilsflókin við tiltekna DNA-svörunarþætti og aðvirkjar vísigenið (luc) sem leiðir til myndunar lúsíferasa og síðan losun ljóss sem hægt er að mæla greina með ljósmæli. Hægt er að meta lúsíferasavirkni á fljótan og ódýran hátt með fjölda setta sem fást á almennum markaði. Í VM7Luc ER TA er notuð VM7, frumulína með brjóstakirtlkrabbameinsfrumum kvenna sem sýnir svörun við estrógenviðtaka, með stöðugt innleitt luc-vísigensmíð úr eldflogum sem stjórnast af fjórum estrógensvörunarþáttum sem staðsettir eru ofan við MMTV-stýriefnið til að greina efni

<sup>(1)</sup> Fyrir júnímánuð 2016 var þessi frumulína tilgreind sem BG1Luc-frumulína. Upphaflega lýstu Geisinger og fl. (1998) (12. heimild) BG-1-frumum og eiginleikum þeirra var síðar lýst af vísindamönnum á vegum National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (13. heimild). Tiltölulega nýlega kom í ljós að til eru tvö mismunandi afbrigði af BG-1-frumum sem vísindamenn nota, BG-1 Fr og BG-1 NIEHS. Ítarleg greining, þ.m.t. DNA-prófun, á þessum tveimur BG-1 afbrigðum frumulína sem Li og samstarfsmenn framkvæmdu (2014) (14. heimild) sýndi að BG-1 Fr var einstæð og að BG-1 NIEHS, þ.e. upprunalega frumulína sem notuð var til að þróa greininguna, var ekki BG1-frumulína með krabbameinsfrumum úr eggjastokkum kvenna, heldur þess í stað afbrigði af MCF7-frumulínunni með brjóstakrabbameinsfrumum kvenna. Frumulína sem er notuð í greiningunni, sem upphaflega var nefnd BG1Luc4E2 (15. heimild), verður nú tiltekin sem VM7Luc4E2 („V“ = afbrigði, „M7“ = MCF7-frumur). Á sama hátt skal greiningin nú vera tiltekin sem VM7Luc ER TA. Þó að þetta breyti uppruna frumulínunnar sem greiningin er byggð á þá hefur þetta hvorki áhrif á birtar fullgildingarrannsóknir né not og beitingu þessarar greiningar til skimunar á estrógenvirkum/andestrógenvirkum íðefnum.

sem eru með virkni sem estrógenörvar eða -blokkar í glasi. Þetta MMTV-stýriefni sýnir eingöngu minni háttar víxlvörðun við önnur sterahormón og hormón sem eru ekki sterar. Viðmiðuninum fyrir túlkun gagna er lýst í smáatriðum í 41. lið. Í stuttu máli greinist jákvæð svörðun með ferli styrkháðrar svörðunar sem inniheldur a.m.k. þrjú punkta með skekkjubílum sem skarast ekki (meðaltal  $\pm$  SD) ásamt breytingu á sveifluvídd (stöðluð hlutfallsleg ljóseining [RLU]) sem er að lágmarki 20% af hámarksildinu fyrir viðmiðunarstaðalinn (17-estradiól [E2; Cas-númer 50-28-2] fyrir greiningu á örðum, raloxífen vetnisklórlíð [Ral; Cas-númer 84449-90-1]/E2 fyrir greiningu á blokkum).

#### VERKFERLI

#### Frumulína

6. Í greiningunni skal nota VM7Luc4E2 frumulínu með stöðuga innleiðslu. Frumulínan er sem stendur eingöngu fánleg með tæknileyfissamningi frá University of California, Davis, California, USA (1), og frá Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, North Carolina, USA (2).

#### Stöðugleiki frumulínunnar

7. Til að viðhalda stöðugleika og heilleika frumulínunnar skal rækta frumurnar í fleiri en eina umsáningu úr frysta stofninum í frumuvíðhaldsætinu (sjá 9. lið). Ekki skal rækta frumur oftár en 30 umsáningar. Að því er varðar VM7Luc4E2-frumulínuna eru 30 umsáningar u.þ.b. þrír mánuðir.

#### Skilyrði við frumurækt og ísetningu á bakka

8. Fylgja skal verklagsreglunum sem tilgreindar eru í Guidance on Good Cell Culture Practice (5. og 6. heimild) til að tryggja gæði alls efniviðar og allra aðferða til að viðhalda heilleika, gildi og samanburðarnákvæmni þeirra starfa sem unnin eru.
9. VM7Luc4E2-frumur eru hafðar í RPMI 1640-æti með viðbættu 0,9% Pen-Strep og 8,0% nautgripafósturssermi (FBS) í sérstökum ræktunarkassa fyrir vefjarækt við 37 °C  $\pm$  1 °C, 90%  $\pm$  5 % raka og 5,0%  $\pm$  1 % CO<sub>2</sub>/loft.
10. Þegar ~80% samfellu er náð eru VM7Luc4E2-frumur ræktaðar í undirrækt og undirbúnar í umhverfi án estrógens í 48 klst. fyrir ísetningu frumnanna í 96-hola bakka til að verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefnum og til greiningar á estrógenháðri vakningu lúsíferasavirkni. Ætið án estrógens (EFM) inniheldur Eagle-æti með Dulbecco-breytingu (DMEM) án fenólráuds, með viðbættu 4,5% FBS meðhöndluðu með dextranhúðuðum viðarkolum, 1,9% L-glútamíni og 0,9% Pen-Strep. Allur búnaður úr plasti skal vera án estrógenvirkni [sjá ítarlega aðferðarlýsingu (7. heimild)].

#### Viðmiðanir fyrir ásættanleika

11. Samþykki eða höfnun prófunar byggir á matinu á viðmiðunarstaðli og niðurstöðum fyrir samanburð úr hverri tilraun sem er gerð á 96-hola bakka. Sérhver viðmiðunarstaðall er prófaður í mismunandi styrkleikum og það eru mörg sýni af

(1) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, E: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649

(2) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, email: info@dioxins.com, Telephone: 919-688-4804, Fax: 919-688-4404

hverjum viðmiðunar- og samanburðarstyrk. Niðurstöður eru bornar saman við gæðaeftirlit (QC) fyrir þessa mæliþætti sem voru leiddir út af rannsóknarsögulega gagnagrunnunum fyrir örva og blokka sem sérhver rannsóknarstofa skal búa til meðan hún sýnir fram á hæfni sína. Rannsóknarsögulegu gagnagrunnarnir eru stöðugt uppfærðir með gildum fyrir viðmiðunarstaðla og samanburð. Breytingar á búnaði eða aðstöðu rannsóknarstofu kunna að krefjast þess að gerðir séu uppfærðir rannsóknarsögulegir gagnagrunnar.

### *Örvaprófun*

#### Skammtastærðarrannsókn

- Vakning: Vakning á bakka skal mæld með því að deila í meðaltal hæsta gildis hlutfallslegra ljóseininga (RLU) í E2-viðmiðunarstaðlinum með meðaltali RLU-gildis fyrir DMSO-samanburð. Venjulega næst fimmföld vakning en til að vera samþykkt þarf vakning að vera minnst fjórföld.
- Niðurstöður fyrir DMSO-samanburð: RLU-gildi samanburðar með leysi skal vera undir 2,5-földum staðalfrávikum fyrir rannsóknarsögulega samanburðinn með leysi fyrir meðaltal RLU-gildis.
- Tilraun sem uppfyllir hvoruga samþykktarviðmiðunina skal ekki notuð og hún endurtekin.

### *Ítarleg prófun*

Prófunin felur í sér viðmiðanir fyrir ásættanleika úr skammtastærðarrannsókninni fyrir örva ásamt eftirfarandi:

- Niðurstöður fyrir viðmiðunarstaðal: Ferill viðmiðunarstuðuls styrkháðrar svörunar í E2 skal vera s-laga og hafa a.m.k. þrjú gildi innan línulega hluta ferils styrkháðrar svörunar.
- Niðurstöður fyrir jákvæðan samanburð: Gildi RLU fyrir samanburðinn með metoxýklóri skal vera hærra en DMSO-meðaltalið plús þreföld staðalfrávik meðaltalsins fyrir DMSO.
- Tilraun sem uppfyllir ekki allar samþykktarviðmiðanir skal ekki notuð og hún endurtekin.

### *Blokkaprófun*

#### Skammtastærðarrannsókn

- Lækkun: Lækkun á bakka er mæld með því að deila í meðaltal hæsta RLU-gildis í Ral/E2 viðmiðunarstaðlinum með meðaltali RLU-gildis fyrir DMSO-samanburð. Venjulega næst fimmföld lækkun en til að vera samþykkt þarf lækkunin að vera minnst þreföld.
- Niðurstöður fyrir E2-samanburð: RLU-gildi í E2-samanburði skulu vera undir 2,5-földum staðalfrávikum í rannsóknarsögulegum meðaltölum RLU-gildis í E2-samanburði.
- Niðurstöður fyrir DMSO-samanburð: RLU-gildi í DMSO-samanburði skal vera undir 2,5-földum staðalfrávikum í rannsóknarsögulegum meðaltölum RLU-gildis í samanburði með leysi.



- Tilraun sem uppfyllir ekki allar samþykktarviðmiðanir skal ekki notuð og hún endurtekin.

#### Ítarleg prófun

Prófunin inniheldur samþykktarviðmiðanir úr skammtastærðarrannsókninni fyrir blokka ásamt eftirfarandi:

- Niðurstöður fyrir viðmiðunarstaðal: Ferill viðmiðunarstuðuls styrkháðrar svörunar í Ral/E2 skal vera s-laga og hafa a.m.k. þrjú gildi innan línulega hluta ferils styrkháðrar svörunar.
- Niðurstöður fyrir jákvæðan samanburð: RLU-gildi í tamoxifen/E2-samanburði skal vera minna en meðaltalið fyrir E2-samanburð mínus þreföld staðalfrávik meðaltalsins fyrir E2-samanburðinn.
- Tilraun sem uppfyllir ekki allar samþykktarviðmiðanir skal ekki notuð og hún endurtekin.

#### Viðmiðunarstaðlar, jákvæður samanburður og samanburður með burðarefni

*Samanburður með burðarefni (greining á örvum og blokkum)*

12. Burðarefnið sem er notað til að leysa upp prófunaríðefnið skal prófað sem samanburður með burðarefni. Burðarefnið sem var notað við fullgildingu VM7Luc ER TA-greiningarinnar var 1% (rúmmálshlutfall) dímetýlsúlfoxíð (DMSO, Cas-númer 67-68-5) (sjá 24. lið). Ef annað burðarefni en DMSO er notað skal prófa alla viðmiðunarstaðla, samanburði og prófunaríðefni í sama burðarefni, ef við á.

*Viðmiðunarstaðall (ákvörðun á skammtastærð fyrir örva)*

13. Viðmiðunarstaðallinn er E2 (Cas-númer 50-28-2). Viðmiðunarstaðallinn fyrir skammtastærðarrannsókn er samsettur úr raðþynningu fjögurra styrkleika af E2 ( $1,84 \times 10^{-10}$ ,  $4,59 \times 10^{-11}$ ,  $1,15 \times 10^{-11}$  og  $2,87 \times 10^{-12}$  M), þar sem hver styrkur er prófaður í tveimur eins holum.

*Viðmiðunarstaðall (ítarleg prófun á áhrifum örva)*

14. E2 fyrir ítarlega prófun er samsett úr 1:2 raðþynningu sem samanstendur af 11 styrkleikum (á bilinu  $3,67 \times 10^{-10}$  til  $3,59 \times 10^{-13}$  M) af E2 í tveimur eins holum.

*Viðmiðunarstaðall (ákvörðun á skammtastærð fyrir blokka)*

15. Viðmiðunarstaðallinn er samsetning Ral (Cas-númer 84449-90-1) og E2 (Cas-númer 50-28-2). Ral/E2 fyrir skammtastærðarrannsókn er samsett úr raðþynningu þriggja styrkleika Ral ( $3,06 \times 10^{-9}$ ,  $7,67 \times 10^{-10}$ , og  $1,92 \times 10^{-10}$  M) plús fastur styrkur ( $9,18 \times 10^{-11}$  M) af E2 í tveimur eins holum.

*Viðmiðunarstaðall (ítarleg prófun á áhrifum blokka)*

16. Ral/E2 fyrir ítarlega prófun er samsett úr 1:2 raðþynningu á Ral (á bilinu  $2,45 \times 10^{-8}$  til  $9,57 \times 10^{-11}$  M) plús föstum styrk ( $9,18 \times 10^{-11}$  M) af E2 sem samanstendur af níu styrkleikum Ral/E2 í tveimur eins holum.

*Veikur jákvæður samanburður (örvi)*

17. Veikur jákvæður samanburður er  $9,06 \cdot 10^{-6}$  M p,p'-metoxýklór (metoxýklór; Cas-númer 72-43-5) í æti án estrógens (EFM).

*Veikur jákvæður samanburður (blokkar)*

18. Veiki jákvæði samanburðurinn samanstendur af tamoxífeni (Cas-númer 10540-29-1)  $3,36 \cdot 10^{-6}$  M með  $9,18 \times 10^{-11}$  M E2 í æti án estrógens (EFM).

*E2-samanburður (eingöngu greining á blokkum)*

19. E2-samanburðurinn er  $9,18 \times 10^{-11}$  M E2 í æti án estrógens (EFM) og notaður sem neikvæður viðmiðunarsamanburður.

*Margfeldi vakningar (örvi)*

20. Vakning lúsíferasavirkni með viðmiðunarstaðlinum (E2) er mæld með því að deila í meðaltal hæsta RLU-gildis E2-viðmiðunarstaðals með meðaltali RLU-gildis í DMSO-samanburði og niðurstaðan skal vera meiri en fjórföld.

*Margfeldi lækunar (blokkar)*

21. Meðaltal lúsíferasavirkni með viðmiðunarstaðlinum (Ral/E2) er mælt með því að deila í meðaltal hæsta RLU-gildis Ral/E2-viðmiðunarstaðals með meðaltali RLU-gildis í DMSO-samanburði og skal vera meira en þrefalt.

*Sýnt fram á hæfni rannsóknarstofu (sjá 14. lið og töflu 3 og 4 í „ÞÆTTIR ER TA-GREININGAR“ í þessari prófunaraðferð)*

**Burðarefni**

22. Upplýsing prófunaríðefna skal vera í leysi sem leysir upp prófunaríðefnið og getur blandast frumuætinu. Vatn, etanól (95–100% hreinleiki) og dímetýlsúlfoxíð eru hentug burðarefni. Ef notað er dímetýlsúlfoxíð skal magnið ekki fara yfir 1% (rúmmálshlutfall). Sýna skal fram á, að því er varðar öll burðarefni, að hámarksrúmmálið sem er notað sé ekki frumueitrandi og að það skerði ekki nothæfi greiningarinnar. Viðmiðunarstaðlar og samanburðir eru leystir upp í 100% leysi og svo þynntir út í viðeigandi styrkleika í æti án estrógens (EFM).

**Tilreiðsla prófunaríðefna**

23. Prófunaríðefnin eru leyst upp í 100% DMSO (eða viðeigandi leysi) og svo þynnt út í viðeigandi styrkleika í æti án estrógens (EFM). Öll prófunaríðefni skulu fá að ná jafnvægi við stofuhita áður en þau eru leyst upp og þynnt. Tilreiða skal nýjar prófunaríðefnislausnir fyrir hverja tilraun. Grugg og botnfall skal ekki vera sýnilegt í lausnunum. Stofna viðmiðunarstaðla og samanburða er hægt að tilreiða í miklu magni en þó skulu endanlegir viðmiðunarstaðlar og þynningar samanburðar og prófunaríðefna vera nýtilreiddar fyrir hverja tilraun og notuð innan 24 klukkustunda frá tilreiðslu.

**Leysni og frumueiturhrif Atriði sem þarf að hafa í huga varðandi ákvörðun á skammtastærð**

24. Skammtastærðarrannsókn samanstendur af sjö punkta 1:10 raðþynningum í tvítekinni keyrslu. Í upphafi eru prófunaríðefnin prófuð upp að hámarksstyrknum 1 mg/ml (~1 mM) fyrir örvaprófun og 20 µg/ml (~10 M) fyrir blokkaprófun. Skammtastærðarrannsóknir eru notaðar til að ákvarða eftirfarandi:

- upphafsstyrk prófunaríðefnisins sem skal nota í ítarlegri prófun
- þynningar prófunaríðefnis (1:2 eða 1:5) sem skal nota í ítarlegri prófun

25. Mat á lífvænleika frumna/frumueiturhrifum er að finna í aðferðarlýsingunum fyrir greiningu á örva og blokkum (7. heimild) og er haft með í skammtastærðarprófun og ítarlegri prófun. Frumueiturhrifaáðferðin sem var notuð til að meta lífvænleika frumna við fullgildingu VM7Luc ER TA (1. heimild) var aðlöguð eigindleg, sjónræn athugunaraðferð, þó er hægt að nota meginlega aðferð til að ákvarða frumueiturhrif (sjá aðferðarlýsingu (7. heimild)). Ekki er hægt að nota gögn sem er aflað við prófunaríðfnisstyrk sem veldur meira en 20% minnkun á lífvænleika.

#### Váhrif af prófunaríðfni og skipulagning greiningarbakka

26. Frumur eru taldar og þær settar í 96-hola bakka fyrir vefjaræktun ( $2 \times 10^5$  frumur í hverja holu) í æti án estrógens (EFM) og látan standa í 24 klst. til að frumurnar nái að festast við bakkann. Ætið án estrógens er fjarlægt og þess í stað sett prófunar- og viðmiðunaríðfni í EFM og látið standa í 19–24 klst. Taka skal sérstakt tillit til þeirra efna sem eru mjög rokgjörn þar sem nálægar samanburðarholur kunna að gefa falsjálkvæðar niðurstöður. Í slíkum tilvikum getur notkun „bakkainnsigla“ hjálpað til við að einangra stakar holur meðan á prófun standur og er því mælt með notkun þeirra.

#### Skammtastærðarrannsóknir

27. Í skammtastærðarrannsóknnum eru allar holurnar í 96-hola bakkanum notaðar til að prófa allt að sex prófunaríðfni sem sjö punkta 1:10 raðþýnningar í tvíteknnum keyrslum (sjá mynd 1 og 2).

— Í prófun til að ákvarða skammtastærð fyrir örva er notuð tvítekning með fjórum styrkleikum E2 sem viðmiðunarstaðall og samhliða sýni í fjórum holum fyrir DMSO-samanburðinn.

— Í prófun til að ákvarða skammtastærð fyrir blokka er notuð tvítekning með þremur styrkleikum Ral/E2 með  $9,18 \times 10^{-11}$  M E2t sem viðmiðunarstaðall, með samhliða sýni í þremur holum fyrir E2- og DMSO-samanburðinn.

#### Mynd 1

#### Skipulag fyrir skammtastærðarrannsókn fyrir örva með 96-hola bakka

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Skammstafanir: E2-1 til E2-4 = styrkleikar E2-viðmiðunarstaðalsins (frá háum að lágum); TC1-1 til TC1-7 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðfnis 1 (TC1); TC2-1 til TC2-7 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðfnis 2 (TC2); TC3-1 til TC3-7 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðfnis 3 (TC3); TC4-1 til TC4-7 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðfnis 4 (TC4); TC5-1 til TC5-7 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðfnis 5 (TC5); TC6-1 að TC6-7 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðfnis 6 (TC6); VC = burðarefni (DMSO [1% rúmmálshlutfall EFM.]

## Mynd 2

## Skipulag fyrir skammtastærðarrannsókn fyrir blokka með 96-hola bakka

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Skammtastafanir: E2 = E2-samanburður; Ral-1 til Ral-3 = styrkleikar raloxífens/E2-viðmiðunarstaðalsins (frá háum að lágum); TC1-1 til TC1-7 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðefnis 1 (TC1); TC2-1 til TC2-7 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðefnis 2 (TC2); TC3-1 til TC3-7 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðefnis 3 (TC3); TC4-1 til TC4-7 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðefnis 4 (TC4); TC5-1 til TC5-7 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðefnis 5 (TC5); TC6-1 að TC6-7 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðefnis 6 (TC6); VC = burðarefnil (DMSO [1% rúmmálshlutfall EFM.]

Athugasemd: Öll prófunaríðefnin eru prófuð með  $9,18 \times 10^{11}$  M E2.

28. Ráðlagt endanlegt magn nauðsynlegs ætis fyrir hverja holu er 200  $\mu$ l. Eingöngu skal nota prófunarbakka þar sem lífvænleiki frumnanna í öllum holum er 80% eða meiri.

29. Ákvörðun á upphafsstyrkleika fyrir ítarlega prófun fyrir örva er lýst ítarlega í örvaáðferðarlýsingunni (7. heimild). Í stuttu máli skal nota eftirfarandi viðmiðanir:

— Ef engir punktar á styrkferli prófunaríðefnisins eru fyrir ofan meðaltalið plús þrefalt staðalfrávik DMSO-samanburðarins skal framkvæma ítarlega prófun með 11 punkta 1:2 raðþynningu þar sem byrjað er á hámarksstyrknum sem er leysanlegur.

— Ef það eru punktar á styrkferli prófunaríðefnisins sem eru fyrir ofan meðaltalið plús þrefalt staðalfrávik DMSO-samanburðarins skal upphafsstyrkurinn fyrir 11 punkta þynningarkerfið í ítarlegri prófun vera einum logra hærra en styrkurinn sem gefur hæsta aðlagða RLU-gildi í ákvörðuninni á skammtastærð. Kerfið fyrir 11 punkta þynningu verður byggt á annaðhvort 1:2 eða 1:5 þynningu samkvæmt eftirfarandi viðmiðunum:

Nota skal 11 punkta 1:2 raðþynningu ef það gefur styrkbil sem nær yfir allt svörunarsviðið byggt á ferli styrkháðrar svörunar sem myndast í skammtastærðarrannsókninni. Annars skal nota 1:5 þynningu.

— Ef fram kemur tvífasa ferill styrkháðrar svörunar vegna prófunaríðefnis í skammtastærðarrannsókninni skal rannsaka báða fasana í ítarlegri prófun.

30. Ákvörðun á upphafsstyrkleika fyrir ítarlega prófun fyrir blokka er lýst nákvæmlega í blokkaáðferðarlýsingunni (7. heimild). Í stuttu máli skal nota eftirfarandi viðmiðanir:

— Ef engir punktar á styrkferli prófunaríðefnisins eru undir meðaltalinu mínus þrefalt staðalfrávik E2-samanburðarins skal framkvæma ítarlega prófun með 11 punkta 1:2 raðþynningu þar sem byrjað er á hámarksstyrk sem er leysanlegur.

- Ef það eru punktar á styrkferli prófunaríðfnisins sem eru undir meðaltalinu mínus þrefalt staðalfrávik E2-samanburðarins skal upphafsstyrkurinn fyrir 11 punkta þynningarkerfið í ítarlegri prófun vera einn af eftirfarandi:
  - Styrkurinn sem gefur lægsta aðlagða RLU-gildi í ákvörðuninni á skammtastærð.
  - Hámarksstyrkur sem er leysanlegur (sjá blokkaaðferðarlýsingu (7. heimild), mynd 14-2).
  - Lægsti frumueitrandi styrkur (sjá blokkaaðferðarlýsingu (7. heimild), mynd 14-3 fyrir svipað dæmi).
- Kerfið fyrir 11 punkta þynningu verður byggt á annaðhvort 1:2 eða 1:5 raðþynningu eða þynningu samkvæmt eftirfarandi viðmiðunum:
 

Nota skal 11 punkta 1:2 raðþynningu ef það gefur styrkbil sem nær yfir allt svörunarsviðið byggt á ferli styrkháðrar svörunar sem myndast í skammtastærðarrannsókninni. Annars skal nota 1:5 þynningu.

#### Ítarlegar prófanir

31. Ítarleg prófun samanstendur af 11 punkta raðþynningu (annaðhvort 1:2 eða 1:5 raðþynningu sem byggir á upphafsstyrkleika fyrir ítarlegar prófanaviðmiðanir) þar sem hver styrkur er prófaður í þremur holusetum í 96-hola bakka (sjá mynd 3 og 4).
- Í ítarlegri prófun fyrir örva er notuð tvítekning 11 styrkleika af E2 sem viðmiðunarstaðall. Samhliða sýni í fjórum holum fyrir DMSO-samanburðinn og samhliða sýni í fjórum holum fyrir metoxýklórsamanburðinn ( $9.06 \times 10^{-6}$  M) skulu vera með á hverjum bakka.
  - Í ítarlegri prófun fyrir blokka er notuð tvítekning náu styrkleika af Ral/E2 með  $9,18 \times 10^{-11}$  M E2 sem viðmiðunarstaðall, með samhliða sýni í fjórum holum fyrir E2  $9,18 \times 10^{-11}$  M-samanburðinn, samhliða sýni í fjórum holum fyrir DMSO-samanburðinn og samhliða sýni í fjórum holum fyrir tamoxífen  $3,36 \times 10^{-6}$  M.

#### Mynd 3

##### Skipulag fyrir ítarlega prófun örva með 96-hola bakka

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
<b>B</b>	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
<b>C</b>	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
<b>D</b>	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
<b>E</b>	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
<b>F</b>	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
<b>G</b>	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
<b>H</b>	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

Skammstafanir: TC1-1 til TC1-11 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðfnis 1; TC2-1 til TC2-11 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðfnis 2; E2-1 til E2-11 = styrkleikar E2-viðmiðunarstaðals (frá háum að lágum); Meth = p,p' metoxýklór veikur jákvæður samanburður; VC = DMSO (1% rúmmálshlutfall) EFM samanburður með burðarefni.

## Mynd 4

## Skipulag fyrir ítarlega prófun fyrir blokka með 96-hola bakka

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Skammstafanir: E2 = E2-samanburður; Ral-1 til Ral-9 = styrkleikar raloxífens/E2-viðmiðunarstaðalsins (frá háum að lágum); Tam = tamoxífen/E2 veikur jákvæður samanburður; TC1-1 til TC1-11 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðefnis 1 (TC1); TC2-1 til TC2-11 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðefnis 2 (TC2); VC = burðarefni (DMSO [1% rúmmálshlutfall EFM.]).

Athugasemd: Eins og fram kemur innihalda allar viðmiðunar- og prófunarholur fastan styrk E2 (9,18×10–11 M).

32. Framkvæma skal endurteknar ítarlegar prófanir fyrir sama íðefni á mismunandi dögum til að tryggja óháði. Framkvæma skal a.m.k. tvær ítarlegar prófanir. Ef niðurstöðurnar stangast á við hvor aðra (t.d. önnur prófunin er jákvæð og hin neikvæð), eða ef önnur prófunin er ófullnægjandi, skal framkvæma þriðju prófunina til viðbótar.

### Mæling á ljómun

33. Ljómun er mæld á bilinu 300 til 650 nm með ljósmæli með inndælingu og hugbúnaði sem stýrir inndælingarmagninu og mælingarbilinu (7. heimild). Losun ljóss frá hverri holu er gefin upp sem RLU á hverja holu.

### GREINING GAGNA

#### Ákvörðun á EC50/IC50

34. EC50-gildi (hálfur hámarkshrifstyrkur prófunaríðefnis [örvar]) og IC50-gildi (hálfur hámarksheftistyrkur prófunaríðefnis [blokkar]) eru ákvörðuð út frá gögnunum um styrk og svörun. Að því er varðar prófunaríðefni sem eru jákvæð í einum eða fleiri styrkleikum er prófunaríðefnisstyrkurinn sem veldur hálfri hámarkssvörun (IC50 eða EC50) reiknaður út með greiningu með Hill-falli eða öðrum viðeigandi kosti. Hill-fallið er tvíkösta reiknilfkan með fjórum breytum sem tengir prófunaríðefnisstyrkinn við svörunina (fylgir að jafnaði s-ferli) með eftirfarandi jöfnu:

$$Y = Botn + \frac{(Toppur - Botn)}{1 + 10^{(lgEC_{50} - X)Hill - hallagildi}}$$

Þar sem:

Y = svörun (þ.e. RLU)

X = logri styrksins

Botn = lágmarkssvörun

Toppur = hámarkssvörun

$\lg EC50$  (eða  $\lg IC50$ ) =  $\logri X$  sem svörun mitt á milli topps og botns

Hill-hallagildi = bratti ferilsins.

Með líkaninu eru reiknuð út bestu mátgæði fyrir breytur Toppur, Botn, Hill-hallagildi og IC50 og EC50. Fyrir útreikninginn á gildum EC50 og IC50 skal nota viðeigandi tölfræðihugbúnað (t.d. tölfræðihugbúnaðinn Graphpad PrismR).

### Ákvörðun á einförum

35. Hægt er að auðvelda gott tölfræðilegt mat með því að hafa með (en ekki takmarkast við) Q-prófunina (sjá örva- og blokkaaðferðarlýsingar (7. heimild)) til að ákvarða „ónothæfar“ holur sem verða undanskildar í gagnagreiningunni.
36. Að því er varðar samhlíða E2-viðmiðunarstaðla (tvö sýni) teljast öll aðlöguð RLU-gildi úr samhlíða sýnum við gefinn styrkleika E2 sem einfara ef gildi þeirra er meira en 20% yfir eða undir aðlöguðu RLU-gildi fyrir þann styrkleika í rannsóknarsögulega gagnagrunninum.

### Söfnun og aðlögun ljósmælisgagna fyrir prófun til að ákvarða skammtastærð

37. Óunnin gögn frá ljósmælinum skulu færð í töflureiknisniðmát sem er hannað fyrir greininguna. Ákvarða skal hvort einfaraágnapunktur eru til staðar sem þarf að fjarlægja. (Sjá viðmiðanir fyrir samþykkt prófunar m.t.t. mæliþátta sem eru ákvarðaðir í greiningunum.) Framkvæma skal eftirfarandi útreikninga:

#### Örvi

1. þrep Meðalgildið fyrir DMSO-samanburðinn með burðarefni (VC) er reiknað út.
2. þrep Meðalgildið fyrir VC með DMSO er dregið frá hverju holugildi til að staðla gögnin.
3. þrep Meðalmargfeldi vakningar fyrir viðmiðunarstaðalinn (E2) er reiknað út.
4. þrep Meðalgildi EC50 fyrir prófunaríðefnin er reiknað út.

#### Blokkar

1. þrep Meðalgildið fyrir VC með DMSO er reiknað út.
2. þrep Meðalgildið fyrir VC með DMSO er dregið frá hverju holugildi til að staðla gögnin.
3. þrep Meðalmargfeldi lækkunar fyrir viðmiðunarstaðalinn (Ral/E2) er reiknað út.
4. þrep Meðalgildið fyrir E2-viðmiðunarstaðalinn er reiknað út.
5. þrep Meðalgildi IC50 fyrir prófunaríðefnið er reiknað út.

**Söfnun og aðlögun ljósmælisgagna fyrir ítarlega prófun**

38. Óunnin gögn frá ljósmælinum skulu færð í töflureiknisniðmát sem er hannað fyrir greininguna. Ákvarða skal hvort einfaragagnapunktur er til staðar sem þarf að fjarlægja. (Sjá viðmiðanir fyrir samþykkt prófunar m.t.t. mælipátta sem eru ákvarðaðir í greiningunum.) Framkvæma skal eftirfarandi útreikninga:

*Örvi*

1. þrep Meðalgildið fyrir VC með DMSO er reiknað út.
2. þrep Meðalgildið fyrir VC með DMSO er dregið frá hverju holugildi til að staðla gögnin.
3. þrep Meðalmargfeldi vakningar fyrir viðmiðunarstaðalinn (E2) er reiknað út.
4. þrep Meðalgildi EC50 fyrir E2 og prófunaríðefnin er reiknað út.
5. þrep Meðalgildi aðlagaðs RLU-gildis fyrir metoxýklór er reiknað út.

*Blokkar*

1. þrep Meðalgildið fyrir VC með DMSO er reiknað út.
2. þrep Meðalgildið fyrir VC með DMSO er dregið frá hverju holugildi til að staðla gögnin.
3. þrep Meðalmargfeldi vakningar fyrir viðmiðunarstaðalinn (Ral/E2) er reiknað út.
4. þrep Meðalgildi IC50 fyrir Ral/E2 og prófunaríðefnin er reiknað út.
5. þrep Meðalgildi aðlagaðs RLU-gildis fyrir tamoxífen er reiknað út.
6. þrep Meðalgildið fyrir E2-viðmiðunarstaðalinn er reiknað út.

**Viðmiðanir um túlkun gagna**

39. VM7Luc ER TA er ætluð sem hluti af greiningu á vægi rökstuddra vísbendinga til að hjálpa til við að forgangsraða efnum fyrir prófanir á innkirtlatruflunum í lífi. Hluti af þessu forgangsröðunarferli er flokkunin á prófunaríðefninu sem annaðhvort jákvæðu eða neikvæðu sem estrógenörvi eða -blokki. Jákvæðu og neikvæðu ákvörðunarviðmiðunum sem notaðar eru í VM7Luc ER TA-fullgildingarrannsókninni er lýst í töflu 1.



Tafla 1

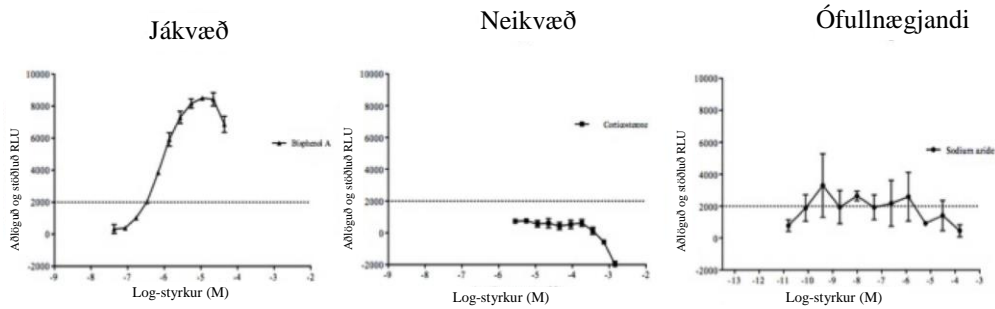
## Jákvæðar og neikvæðar ákvörðunarviðmiðanir

VIRKNI SEM ÖRVI	
Jákvæð	<ul style="list-style-type: none"> <li>— Öll prófunaríðefni sem eru flokkuð sem jákvæð fyrir virkni sem ER-örvi skulu hafa feril styrkháðrar svörunar sem samanstendur af grunnlínu og þá jákvæðum halla og sem að lokum endar í sléttu eða toppi. Í sumum tilvikum er aðeins hægt að greina tvo af þessum eiginleikum (grunnlína-halli eða halli-toppur).</li> <li>— Innan línunnar sem sýnir jákvæða hallann skulu vera a.m.k. þrjú punktar með skekkjubílum sem skarast ekki (meðaltal <math>\pm</math> SD). Punktar sem mynda grunnlínuna eru ekki hafðir með en toppurinn eða fyrsti hluti sléttunnar getur verið innan línulega hluta ferilsins.</li> <li>— Jákvæð flokkun krefst sveifluvíddar svörunar, mismunarins milli grunnlínu og topps, sem er a.m.k. 20% af hámarksgildi viðmiðunarstaðalsins, E2 (þ.e. 2000 RLU eða meira þegar hámarkssvörunargildi viðmiðunarstaðalsins [E2] er aðlagð í 10 000 RLU).</li> <li>— Ef hægt er skal reikna út EC50-gildi fyrir hvert jákvætt prófunaríðefni.</li> </ul>
Neikvæð	Meðaltal aðlagðrar RLU fyrir hvern tiltekinn styrk er við eða undir meðaltali RLU-gildisins í DMSO-samanburðinum plús þrefalt staðalfrávik RLU í DMSO.
Ófullnægjandi	Gögn sem ekki er hægt að túlka sem gild fyrir að sýna að virkni sé til staðar eða ekki vegna meiriháttar eigindlegra eða megindlegra takmarkana teljast ófullnægjandi og er ekki hægt að nota til að ákvarða hvort prófunaríðefnið sé jákvætt eða neikvætt. Endurprófa skal íðefnin.
BLOKKANDI VIRKNI	
Jákvæð	<ul style="list-style-type: none"> <li>— Út frá gögnum prófunaríðefna fæst ferill styrkháðrar svörunar sem samanstendur af grunnlínu og síðan neikvæðum halla.</li> <li>— Innan línunnar sem skilgreinir neikvæða hallann skulu vera a.m.k. þrjú punktar með skekkjubílum sem skarast ekki, punktar sem mynda grunnlínuna eru ekki hafðir með en fyrsti punktur sléttunnar getur verið innan línulega hluta ferilsins.</li> <li>— Lækkun í virkni ætti að vera a.m.k. 20% miðað við hámarksgildið með viðmiðunarstaðlinum, Ral/E2 (þ.e. 8000 RLU eða minna þegar hámarkssvörunargildi viðmiðunarstaðalsins [Ral/E2] er aðlagð í 10 000 RLU).</li> <li>— Hæsti styrkur prófunaríðfnisins sem er ekki frumueitrandi skal vera minni eða jafn <math>1 \times 10^{-5}</math> M.</li> <li>— Ef hægt er skal reikna út IC50-gildi fyrir hvert jákvætt prófunaríðefni.</li> </ul>
Neikvæð	Allir gagnapunktar eru yfir EC80-gildinu (80% af E2-svöruninni eða 8000 RLU) við styrkleika undir $1,0 \cdot 10^{-5}$ M.
Ófullnægjandi	Gögn sem ekki er hægt að túlka sem gild fyrir að sýna að virkni sé til staðar eða ekki vegna meiriháttar eigindlegra eða megindlegra takmarkana teljast ófullnægjandi og er ekki hægt að nota til að ákvarða hvort prófunaríðefnið sé jákvætt eða neikvætt. Endurprófa skal íðefnið.

40. Jákvæðar niðurstöður einkennast af bæði magni áhrifanna og styrksins þegar áhrifanna verður vart, ef því verður við komið. Dæmi um jákvæð, neikvæð og ófullnægjandi gögn eru sýnd í mynd 5 og 6.

Mynd 5

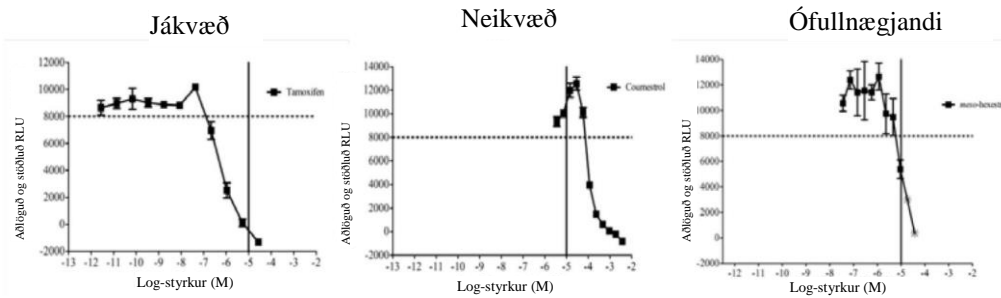
**Dæmi um örva: jákvæð, neikvæð og ófullnægjandi gögn**



Brotna línan sýnir 20% af E2-svörun, 2000 aðlagðar og staðlaðar RLU

Mynd 6

**Dæmi um blokka: jákvæð, neikvæð og ófullnægjandi gögn**



Brotna línan sýnir 80% af svörun í Ral/E2, 8000 aðlagðar og staðlaðar RLU

Heila línan sýnir 1,00 10<sup>-5</sup> M. Til að svörun teljist vera jákvæð skal hún vera undir 8000 RLU línunni og við styrk sem er undir 1,00 10<sup>-5</sup> M.

Styrkleikar merktir með stjörnu í mesóhexestróllínuritinu sýnir lífvænleikastig „2“ eða hærra.

Prófunarniðurstöðurnar fyrir mesóhexestról teljast ófullnægjandi gögn þar sem eina svörunin sem er undir 8000 RLU á sér stað við 1,00 10<sup>-5</sup> M.

41. Útreikningana á EC50 og IC50 er hægt að gera með Hill-falli með fjórum breytum (sjá nánari upplýsingar í örva- og blokkaaðferðarlýsingu (7. heimild)). Þegar viðmiðanirnar fyrir ásættanleika eru uppfylltar bendir það til þess að kerfið starfi á tilhlýðilegan hátt en það tryggir ekki að tiltekin keyrsla gefi nákvæm gögn. Endurtekning niðurstaðnanna úr fyrstu keyrslunni er besta trygging þess að nákvæm gögn hafi fengist (sjá 19. lið „ÞÆTTIR ER TA-GREININGAR“).

## PRÓFUNARSKÝRSLA

42. Sjá 20. lið „ÞÆTTIR ER TA-GREININGAR“

**HEIMILDIR**

- 1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
- 2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor  $\alpha$  and  $\beta$  Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, *J. Cell Biochem.*, 82(3): 467-479.
- 3) Pujol P., et al. (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer Res.*, 58(23): 5367-5373.
- 4) Weihua Z., et al. (2000). Estrogen Receptor (ER)  $\beta$ , a Modulator of ER $\alpha$  in the Uterus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(11): 936-5941.
- 5) Balls M., et al. (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), *ALTEX*, 23(Suppl): bls. 270–273.
- 6) Coecke S., et al. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *Alternatives to Laboratory Animals*, 33: bls. 261–287.
- 7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7850.
- 8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro Mol. Toxicol.*,13(1):67-82.
- 9) Escande A., et al. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71(10):1459-69.
- 10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, *Chemistry and Biology*,17(6):646-57.
- 11) Kuiper G.G, et al. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinology*,139(10):4252-63.

- 12) Geisinger, et al. (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, *Cancer* 63, 280-288.
- 13) Baldwin, et al. (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth in vitro, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 34, 649-654.
- 14) Li, Y., et al. (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, *Mol. Endo.* 28, 2072-2081.
- 15) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol.* 13, 67-82.

## 4. viðbætur.

## GREINING Á AÐVIRKJUN STÖÐUGT INNLEIDDS ALFA-ESTRÓGENVIÐTAKA ÚR MÖNNUM MEÐ NOTKUN ERA CALUX FRUMULÍNUNNAR TIL AÐ GREINA VIRKNI ÍÐEFNA SEM ESTRÓGENÖRVAR OG -BLOKKAR

ATRÍÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFI Í HUGA Í UPPHAFI (SJÁ EINNIG „ALMENNUR INNGANGUR“)

1. Í ER $\alpha$  CALUX-greiningu með aðvirkjun er notuð U2OS-frumulínan úr mönnum til að greina virkni sem estrógenörvar og -blokkar sem er miðlað með alfa-estrógenviðtaka úr mönnum (hER $\alpha$ ). Með fullgildingarrannsókninni fyrir lífgreiningu á stöðugt innleiddu ER $\alpha$  CALUX með BioDetection Systems BV (Amsterdam, Holland) var sýnt fram á gildi og áreiðanleika greiningarinnar í fyrirhuguðum tilgangi (1. heimild). ER $\alpha$  CALUX-frumulínan tjáir eingöngu stöðugt innleitt ER $\alpha$  úr mönnum.
2. Þessi greining er hönnuð sérstaklega til að nema hER $\alpha$ -miðlaða aðvirkjun með því að mæla lífljómun sem endapunktur. Lífljómun er almennt notuð í lífgreiningu vegna þess hve suðhlutfall er hátt (4. heimild).
3. Skráð hefur verið að plöntuestrógenstyrkleikar hærrí en 1  $\mu$ M hafa ofvirkjað lúsíferasavísigenið sem leiðir til ljómunar sem fer ekki fram með miðlun viðtaka (5., 6. og 7. heimild). Því skulu hærrí styrkleikar plöntuestrógens, eða annarra svipaðra efnasambanda sem kunna að ofvirkja lúsíferasatjáninguna, rannsakaðir gaumgæfilega í greiningum á aðvirkjun stöðugt innleidds estrógenviðtaka (sjá 2. viðbæti).
4. Lesa skal „ALMENNUR INNGANGUR“ og „ÞÆTTIR ER TA-GREININGAR“ áður en þessi greining er notuð í eftirlitsskyni. Skilgreiningar og skammstafanir sem notaðar eru í þessari prófunaraðferð eru settar fram í 1. viðbæti.

MEGINREGLA GREININGARINNAR (SJÁ EINNIG „ALMENNUR INNGANGUR“)

5. Lífgreiningin er notuð til að meta ER-bindilsbindingu og síðari yfirfærslu viðtaka- og bindilsflókans yfir í kjarnann. Í kjarnanum binst viðtaka- og bindilsflókin tilteknum DNA-svörunarþáttum og aðvirkjar vísigen lúsíferasa úr eldflugum sem leiðir til aukinnar frumutjáningar á lúsíferasaensíminu. Eftir að lúsíferasahvarfefninu lúsíferín er bætt við umbreyttist lúsíferínið í lífljómunarafurð. Ljósíð sem myndast er auðvelt að greina og magngreina með ljósmæli.
6. Prófunarkerfið notar CALUX-frumur með stöðugt innleiddan ER $\alpha$ . ER $\alpha$  CALUX-frumur koma úr U2OS-frumulínu með beinkímfrumu úr beinsarkmeini úr mönnum. U2OS-frumur úr mönnum voru stöðugt innleiddar með 3xHRE-TATA-Luc og pSG5-neo-hER $\alpha$  og notuð aðferðin með útfellingu með kalsíumfosfati. U2OS-frumulínan var valin sem sú frumulína sem hefur vísigen sem hefur bestu svörun við estrógeni (og öðrum sterahormónum) á grundvelli þeirrar athugunar að U2OS-frumulínan hafi sýnt litla eða enga innræna virkni viðtaka. Skortur á innrænum viðtökum var metinn með því að nota aðeins plasmíð með lúsíferasavísigenum sem sýndu enga virkni þegar viðtakabindlum var bætt við. Auk þess studdi þessi frumulína sterka hormónamiðlaða svörun þegar sammerktum viðtökum var bætt við tímabundið (2., 3. og 8. heimild).
7. Prófun á íðefnum fyrir estrógen- og andestrógenvirkni með ER $\alpha$  CALUX-frumulínunni felur í sér forskimunarkeyrslu og ítarlegar keyrslur. Í forskimunarkeyrslunni eru leysni, frumueiturhrif og nákvæmara styrkleikasvið prófunaríðefnisins fyrir ítarlega prófun ákvörðuð. Í ítarlegu keyrslunum eru nákvæmari styrkleikasvið prófunaríðefna prófuð í ER $\alpha$  CALUX-lífgreiningunum og því fylgt eftir með flokkun á prófunaríðefnunum miðað við örvun og blokkun.

- Viðmiðuninum fyrir túlkun gagna er lýst í smáatriðum í 59. lið. Í stuttu máli telst prófunariðefni jákvætt m.t.t. örvunar ef a.m.k. tveir samfelldir styrkleikar prófunariðefnisins sýna svörun sem er jöfn eða meiri en 10% hámarkssvörunar með viðmiðunarstaðlinum 17 $\beta$ -estradiól (PC<sub>10</sub>). Prófunariðefni telst jákvætt m.t.t. blokkunar ef a.m.k. tveir samfelldir styrkleikar prófunariðefnisins sýna svörun sem er jöfn eða lægri en 80% hámarkssvörunar með viðmiðunarstaðlinum tamoxífen (PC<sub>80</sub>).

#### VERKFERLI

#### Frumulínur

- Í greiningunni skal nota U2OS ER $\alpha$  CALUX frumulínu með stöðuga innleiðslu. Hægt er að fá frumulínuna hjá BioDetection Systems BV, Amsterdam, Holland með tæknileyfissamningi.
- Eingöngu skal nota frumurækt sem er laus við berfryminga. Þær frumulotur sem notaðar eru skulu annað hvort vera vottaðar sem lausar við berfrymingasmit eða framkvæma skal berfrymingaprófun á þeim fyrir notkun. Nota skal víxlrítakjarnsýrumögnun (RT-PCR) fyrir næma greiningu á berfrymingasýkingu (9. heimild).

#### Stöðugleiki frumulíunnar

- Til að viðhalda stöðugleika og heilleika CALUX-frumnanna skulu frumurnar geymdar í fljótandi köfnunarefni (-80 °C). Að lokinni þíðingu frumnanna til að hefja nýja ræktun skal undirrækta frumurnar a.m.k. tvisvar áður en þær eru notaðar til að meta virkni íðefna sem estrógenörvar og -blokkar. Ekki skal undirrækta frumur oftari en í 30 umsáningum.
- Til að vakta stöðugleika frumulíunnar til lengri tíma skal sannprófa svörunargetu prófunarkerfisins fyrir örva og blokka með því að meta EC<sub>50</sub>- eða IC<sub>50</sub>-gildi viðmiðunarstaðalsins. Að auki skal vakta hlutfallslega vakningu í sýninu úr jákvæðum samanburði (PC) og sýninu úr neikvæðum samanburði (NC). Niðurstöðurnar skulu vera í samræmi við samþykktarviðmiðunina fyrir ER $\alpha$  CALUX-lífgreininguna fyrir örva (tafla 3C) eða blokka (tafla 4C). Viðmiðunarstaðlarnir, jákvæðir og neikvæðir samanburðir eru tilgreindir í töflu 1 og töflu 2 fyrir örva- og blokkapáttinn eftir því sem við á.

#### Skilyrði við frumurækt og ísetningu á bakka

- Rækta skal U2OS-frumur í vaxtaræti (DMEM/F12 (1:1) með fenólrauðum sem pH-litvísí, með viðbættu nautgripafósturssermi (7,5%), amínósýrum sem eru ekki lífsnauðsynlegar (1%), 10 einingum/ml af penisillíni, streptómýsíní og genetísíní (G-418) sem valmerkiefni). Frumurnar skulu settar í CO<sub>2</sub>-ræktunarkassa (5% CO<sub>2</sub>) við 37 °C og 100% raka. Þegar frumurnar ná 85–95% samrennsli skulu frumurnar annaðhvort ræktaðar í undirrækt eða tilreiddar fyrir sáningu í 96-hola míkrotítunarbakka. Í síðarnefnda tilvikinu skal frumum þyrllað upp aftur í 1x10<sup>5</sup> frumur/ml í estrógenlausu greiningaræti (DMEM/F12 (1:1) án fenólrauðs, með viðbættu nautgripafósturssermi meðhöndlað með dextranhúðuðum viðarkolum (5% rúmmálshlutfall), 10 einingum/ml af penisillíni og streptómýsíní) og settar í holurnar á 96-hola míkrotítunarbakka (100  $\mu$ l af jafnblandaðri frumusviflausn). Frumur skulu láttnar standa fyrst í CO<sub>2</sub>-ræktunarkassa (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C, 100% raka) í 24 klst. áður en kemur að váhrifum. Búnaður úr plasti skal vera estrógenlaus.

#### Viðmiðanir fyrir ásættanleika

- Örva- og blokkavirkni prófunariðefnis (prófunariðefna) er prófuð í prófunarröðum. Prófunarröð samanstendur af að hámarki 6 míkrotítunarbökkum. Hver prófunarröð felur í sér a.m.k. 1 heila röð af þynningum úr viðmiðunarstaðli, sýni úr jákvæðum samanburði, sýni úr neikvæðum samanburði og samanburði með leysi. Mynd 1 og 2 sýna uppsetningu bakkans fyrir prófunarraðir fyrir örva og blokka.

15. Hver þýnning úr viðmiðunarstaðli, prófunaríðefni, öllum samanburði með leysi og jákvæðum og neikvæðum samanburði skal greind í þremur settum. Hvert þeirra þreföldu setta skal uppfylla kröfurnar sem settar eru fram í töflu 3A og töflu 4A.
16. Heil röð af þýnningum úr viðmiðunarstaðlinum (17β-estradíól fyrir örvun, tamoxífen fyrir blokkun) er mæld á fyrsta bakkannum í hverri prófunarsýru. Til að hægt sé að bera greiningarniðurstöðurnar úr þeim 5 míkrotítunarbökkum sem eftir eru saman við fyrsta míkrotítunarbakkann sem inniheldur heilan styrksvörunarferil viðmiðunarstaðalsins skulu allir bakkarnir innihalda 3 samanburðarsýni: samanburð með leysi, hæsta styrk viðmiðunarstaðalsins sem prófaður er og áætlaðan styrk EC50 (örvun) eða IC50 (blokkun) í viðmiðunarstaðlinum. Hlutfall meðalsamanburðarsýna á fyrsta bakkannum og þeim 5 bökkum sem eftir eru skal uppfylla kröfurnar sem settar eru fram í töflu 3C (örvun) eða töflu 4C (blokkun).
17. Fyrir hvern míkrotítunarbakka innan prófunarraðar skal reikna út z-stuðul (10. heimild). Reikna skal út z-stuðulinn með því að nota svanirnar við hæsta og lágsta styrk viðmiðunarstaðalsins Míkrotítunarbakki telst gildur ef hann uppfyllir kröfurnar sem tilgreindar eru í töflu 3C (örvun) eða töflu 4C (blokkun).
18. Viðmiðunarstaðallinn skal sýna s-laga skammtasvörunarferil. EC<sub>50</sub> eða IC<sub>50</sub>, leitt af svöruninni úr röðum af þýnningum úr viðmiðunarstaðli, skulu uppfylla kröfurnar sem tilgreindar eru í töflu 3C (örvun) eða töflu 4C (blokkun).
19. Hver prófunarröð skal fela í sér sýni með jákvæðum og neikvæðum samanburði. Útreiknuð hlutfallsleg vakning bæði jákvæða og neikvæða samanburðarsýnisins skal uppfylla kröfurnar sem tilgreindar eru í töflu 3C (örvun) eða töflu 4C (blokkun).
20. Á meðan á öllum mælingum stendur skal mæla vakningarstuðul hæsta styrkleika viðmiðunarstaðalsins með því að deila í meðaltal hæstu svörunar RLU í 17β-estradíól-viðmiðunarstaðli með meðaltali RLU-svörunar í viðmiðunarstaðalssamanburði með leysi. Þessi vakningarstuðull skal uppfylla lágmarkskröfurnar fyrir margfeldi vakningar eins og tilgreint er í töflu 3C (örvun) eða töflu 4C (blokkun).
21. Eingöngu míkrotítunarbakkar sem uppfylla framangreindar samþykktarviðmiðanir teljast gildir og hægt er að nota þá til að meta svörun prófunaríðefna.
22. Samþykktarviðmiðanirnar gilda um bæði forskimunarkeyrslur og ítarlegar keyrslur.

Tafla 1

**Styrkleikar viðmiðunarstaðals, jákvæðs samanburðar (PC) og neikvæðs samanburðar (NC) fyrir CALUX-lífgreininguna fyrir örva**

	Efni	CAS-númer	Styrkbil prófunar (M)
Viðmiðunarstaðall	17β-estradíól	50-28-2	1*10 <sup>-13</sup> – 1*10 <sup>-10</sup>
Jákvæður samanburður (PC)	17α-metýltestósterón	58-18-4	3*10 <sup>-6</sup>
Neikvæður samanburður (NC)	kortikósterón	50-22-6	1*10 <sup>-8</sup>

Tafla 2

**Styrkleikar viðmiðunarstaðals, jákvæðs samanburðar (PC) og neikvæðs samanburðar (NC) fyrir CALUX-lífgreininguna fyrir blokka**

	Efni	CAS-númer	Styrkbil prófunar (M)
Viðmiðunarstaðall	tamoxífen	10540-29-1	$3 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-5}$
Jákvæður samanburður (PC)	4-hýdroxýtamoxífen	68047-06-3	$1 \cdot 10^{-9}$
Neikvæður samanburður (NC)	resveratról	501-36-0	$1 \cdot 10^{-5}$

Tafla 3

**Samþykktarviðmiðanir fyrir ER $\alpha$  CALUX-lífgreininguna fyrir örva**

A - stök sýni á bakka		Viðmiðun
1	Hámark %SD fyrir bakka í þremur settum (fyrir NC, PC, hverja þýnningu prófunaríðefnisins og viðmiðunarstaðalsins, nema C0)	< 15%
2	Hámark %SD fyrir bakka í þremur settum (fyrir samanburðina með leysi fyrir viðmiðunarstaðal og prófunaríðefni (C0, SC))	< 30%
3	Hámark LDH-leka, sem mælikvarði á frumueiturhrif	< 120%
B - innan eins míkrotítrunarbakka		
4	Hlutfall viðmiðunarstaðalssamanburðarins með leysi (C0; bakki 1) og samanburðarins með leysi fyrir prófunaríðefnið (SC; bakkar 2 til x)	0,5 til 2,0
5	Hlutfall áætlaðs EC50 og hæstu styrkleika viðmiðunarstaðals á bakka 1 og áætlaðs EC50 og hæstu styrkleika viðmiðunarstaðals á bökkum 2 til x (C4m C8)	0,70 til 1,30
6	Z-stuðull fyrir hvern bakka	>0,6
C - innan stakrar greiningarraðar (allir bakkar innan einnar raðar)		
7	S-laga ferill viðmiðunarstaðals	Já (17 $\beta$ -estradíól)
8	EC50-styrkbil viðmiðunarstaðals 17 $\beta$ -estradíól	$4 \cdot 10^{-12} - 4 \cdot 10^{-11}$ M
9	Lægsta margfeldi vakningar fyrir hæsta styrkleika 17 $\beta$ -estradíóls að því er varðar viðmiðunarstaðalssamanburðinn með leysi.	5
10	Hlutfallsleg vakning (%) PC	> 30%
11	Hlutfallsleg vakning (%) NC	< 10%

PC: jákvæður samanburður; NC: neikvæður samanburður; SC: samanburður með leysi fyrir prófunaríðefni; C0: viðmiðunarstaðalssamanburður með leysi; SD: staðalfrávik; LDH: laktavetnissviptir



## Tafla 4

Samþykktarviðmiðanir fyrir ER $\alpha$  CALUX-lífgreininguna fyrir blökka

A - stök sýni á bakka		Viðmiðun
1	Hámark %SD fyrir bakka í þremur settum (fyrir NC, PC, hverja þynningu prófunariðefnisins og viðmiðunarstaðalsins, samanburð með leysi (C0))	< 15%
2	Hámark %SD fyrir bakka í þremur settum (fyrir samanburð með burðarefni (VC) og hæsta styrkleika fyrir viðmiðunarstaðal (C8))	< 30%
3	Hámark LDH-leka, sem mælikvarði á frumueiturhrif	< 120 %
B - innan eins míkrotítrunarbakka		
4	Hlutfall viðmiðunarstaðalssamanburðarins með leysi (C0; bakki 1) og samanburðarins með leysi fyrir prófunariðefnið (SC; bakkar 2 til x)	0,70 til 1,30
5	Hlutfall áætlaðra IC50-styrkleika viðmiðunarstaðals á bakka 1 og áætlaðra IC50-styrkleika viðmiðunarstaðals á bökkum 2 til x (C4)	0,70 til 1,30
6	Hlutfall hæstu styrkleika viðmiðunarstaðals á bakka 1 og hæstu styrkleika viðmiðunarstaðals á bökkum 2 til x (C8)	0,50 til 2,0
7	Z-stuðull fyrir hvern bakka	> 0,6
C - innan stakrar greiningarraðar (allir bakkar innan einnar raðar)		
8	S-laga ferill viðmiðunarstaðals	Já (tamoxífen)
9	IC50-styrkbil viðmiðunarstaðals (tamoxífen)	1*10 <sup>-8</sup> - 1*10 <sup>-7</sup> M
10	Lægsta margfeldi vakningar viðmiðunarstaðalssamanburðarins með leysi að því er varðar hæsta tamoxífenstyrkleikann.	2,5
11	Hlutfallsleg vakning (%) PC	< 70%
12	Hlutfallsleg vakning (%) NC	> 85%

PC: jákvæður samanburður; NC: neikvæður samanburður; VC: samanburður með burðarefni (samanburður með leysi án fasts styrks örvaviðmiðunarstaðals); SC: samanburður með leysi fyrir prófunariðefni; C0: viðmiðunarstaðalssamanburður með leysi; SD: staðalfrávik; LDH: laktavetnisviptir

**Samanburður með leysi/burðarefni, viðmiðunarstaðlar, jákvæður samanburður, neikvæður samanburður**

23. Að því er varðar forskimunarkeyrslur og ítarlegar keyrslur skal nota sama samanburð með leysi/burðarefni, viðmiðunarstaðla, jákvæðan samanburð og neikvæðan samanburð. Að auki skal styrkleiki viðmiðunarstaðla, jákvæðra samanburða og neikvæðra samanburða vera hinn sami.

*Samanburður með leysi*

24. Prófa skal leysinn, sem er notaður til að leysa upp prófunaríðefnið, sem samanburð með leysi. Dímetýlsúlfoxíð (DMSO, 1% (rúmmálshlutfall), CAS-númer 67-68-5) var notað sem burðarefni í fullgildingunni á ER $\alpha$  CALUX-lífgreiningunni. Ef notaður er annar leysir en dímetýlsúlfoxíð skal prófa alla viðmiðunarstaðla, samanburði og prófunaríðefni í sama burðarefni. Vakin er athygli á að samanburðurinn með leysi fyrir blokkarannsóknir inniheldur fastan styrk viðmiðunarstaðalsins fyrir örva, 17 $\beta$ -estradíól (u.þ.b. EC50-styrkur). Til að prófa leysinn sem notaður er í blokkarannsóknunum skal tilreiða og prófa samanburð með burðarefni.

*Samanburður með burðarefni (blokkun)*

25. Að því er varðar prófanir á blokkun er föstum styrk viðmiðunarstaðalsins fyrir örva, 17 $\beta$ -estradíól (u.þ.b. EC50-styrkur), bætt við greiningarætið. Til að prófa leysinn sem er notaður til að leysa upp prófunaríðefnin fyrir blokkun skal tilreiða greiningaræti án fasts styrks viðmiðunarstaðalsins fyrir örva, 17 $\beta$ -estradíóls. Þetta samanburðarsýni er tilgreint sem samanburðurinn með burðarefni. Dímetýlsúlfoxíð (DMSO, 1% (rúmmálshlutfall), CAS-númer 67-68-5) var notað sem burðarefni í fullgildingunni á ER $\alpha$  CALUX-lífgreiningunni. Ef notaður er annar leysir en dímetýlsúlfoxíð skal prófa alla viðmiðunarstaðla, samanburði og prófunaríðefni í sama burðarefni.

*Viðmiðunarstaðlar*

26. Viðmiðunarstaðallinn fyrir örva er 17 $\beta$ -estradíól (tafla 1). Viðmiðunarstaðlarnir samanstanda af röð þynninga með átta styrkleika 17 $\beta$ -estradíóls ( $1 \cdot 10^{-13}$ ,  $3 \cdot 10^{-13}$ ,  $1 \cdot 10^{-12}$ ,  $3 \cdot 10^{-12}$ ,  $6 \cdot 10^{-12}$ ,  $1 \cdot 10^{-11}$ ,  $3 \cdot 10^{-11}$ ,  $1 \cdot 10^{-10}$  M).
27. Viðmiðunarstaðallinn fyrir blokka er tamoxífen (tafla 2). Viðmiðunarstaðlarnir samanstanda af röð þynninga með átta styrkleika tamoxífens ( $3 \cdot 10^{-9}$ ,  $1 \cdot 10^{-8}$ ,  $3 \cdot 10^{-8}$ ,  $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $3 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $3 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$  M). Allir styrkleikar viðmiðunarstaðalsins fyrir blokka eru látnir standa með föstum styrk viðmiðunarstaðalsins fyrir örva, 17 $\beta$ -estradíól ( $3 \cdot 10^{-12}$  M).

*Jákvæður samanburður*

28. Jákvæði samanburðurinn fyrir rannsóknir á örva er 17 $\alpha$ -metýltestósterón (tafla 1).
29. Jákvæði samanburðurinn fyrir rannsóknir á blokkum er 4-hýdroxýtamoxífen (tafla 2). Jákvæði samanburðurinn fyrir blokka er látinn standa með föstum styrk viðmiðunarstaðalsins fyrir örva, 17 $\beta$ -estradíól ( $3 \cdot 10^{-12}$  M).

*Neikvæður samanburður*

30. Neikvæði samanburðurinn fyrir rannsóknir á örva er kortíkósterón (tafla 1).
31. Neikvæði samanburðurinn fyrir rannsóknir á blokkum er resveratról (tafla 2). Neikvæði samanburðurinn fyrir blokka er látinn standa með föstum styrk viðmiðunarstaðalsins fyrir örva, 17 $\beta$ -estradíól ( $3 \cdot 10^{-12}$  M).

Sýnt fram á hæfni rannsóknarstofu (sjá 14. lið og töflu 3 og 4 í „ÞÆTTIR ER TA-GREININGAR“ í þessari prófunaraðferð)

### Burðarefni

- Leysirinn sem er notaður til að leysa upp prófunaríðefni skal leysa prófunaríðefnið upp að fullu og skal blandanlegur með frumuætinu. DMSO, vatn og etanól (95% til 100% hreinleiki) eru heppilegir leysar. Ef DMSO er notað sem leysir skal hámarksstyrkur DMSO í viðstöðunni ekki fara yfir 1% (rúmmálshlutfall). Fyrir notkun skal prófa leysinn til að sannreyna að frumueiturhrif séu ekki fyrir hendi og að hann skerði ekki nothæfi greiningarinnar.

### Tilreiðsla viðmiðunarstaðla, jákvæðs samanburðar, neikvæðs samanburðar og prófunaríðefna

- Viðmiðunarstaðlar, jákvæður samanburður, neikvæður samanburður og prófunaríðefni eru leyst upp í 100% DMSO (eða viðeigandi leysi). Viðeigandi (rað)þynningar skulu þá tilreiddar í sama leysi. Öll efni sem notuð eru skulu fá að ná jafnvægi við stofuhita áður en þau eru leyst upp. Grugg og botnfall skal ekki vera sýnilegt í nýtilreiddum stofnlausnum viðmiðunarstaðla, jákvæðs samanburðar, neikvæðs samanburðar og prófunaríðefna. Hægt er að tilreiða stofna viðmiðunarstaðla og samanburða í miklu magni. Stofnlausnir prófunaríðefna skulu vera nýtilreiddar fyrir hverja tilraun. Lokþynning viðmiðunarstaðla, jákvæðs samanburðar, neikvæðs samanburðar og prófunaríðefna skal vera nýtilreidd fyrir hverja tilraun og notuð innan 24 klukkustunda eftir tilreiðslu.

### Leysni, frumueiturhrif og ákvörðun á skammtastærð.

- Í forskimunarkeyrslunni er ákvörðuð leysni prófunaríðefnanna í leysinum sem valinn er. Tilreidd er lausn með hámarksstyrk upp á 0,1 M. Ef upp koma vandamál varðandi leysni í tengslum við þennan styrkleika skal tilreiða stofnlausnir með lægri styrkleika þar til prófunaríðefni leysast upp að fullu. Í forskimunarkeyrslunni eru prófaðar raðþynningar prófunaríðefnis í hlutfallinu 1:10. Hámark greiningarstyrks fyrir örva- eða blokkaprófanir er 1 nM. Að lokinni forskimun fæst viðeigandi nákvæmt styrkbil fyrir prófunaríðefni sem skal prófa í ítarlegu keyrslunum. Þynningararnar sem eru notaðar fyrir ítarlegar prófanir skulu vera 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x og 3000x.
- Prófun á frumueiturhrifum er að finna í aðferðarlýsingu fyrir greiningu á örva og blokkum (11. heimild). Prófun á frumueiturhrifum felld inn í bæði forskimunarkeyrsluna og ítarlegu keyrslurnar. Aðferðin sem var notuð til að meta frumueiturhrif í fullgildingunni á ER $\alpha$  CALUX-lífgreiningunni var prófunin á leka laktavetnissvptis (LDH) ásamt eigindlegri, sjónrænni skoðun á frumum (sjá viðbæti 4.1) eftir váhrif frá prófunaríðefnum. Þó er hægt að nota aðrar megindlegar aðferðir til að ákvarða frumueiturhrif (t.d. greiningu með litmælingu sem byggir á tetrazólíum (MTT) eða CALUX-lífgreiningu á frumueiturhrifum). Almennt teljast styrkleikar prófunaríðefnis sem sýna meira en 20% minnkun á lífvænleika frumna vera frumueitrandi og eru því ekki nothæfir við mat á gögnum. Að því er varðar greininguna á leka laktavetnissvptis (LDH) telst styrkleiki prófunaríðefnisins vera frumueitrandi þegar hlutfall LDH-leka er hærra en 120%.

### Váhrif af prófunaríðefni og skipulagning greiningarbakka

- Eftir losun samrunninna ræktaðra frumna í flösku með trypsíni (e. *trypsinisation*) eru frumum þyrllað upp aftur í  $1 \times 10^5$  frumur/ml í estrógenlausu greiningaræti. Hundrað  $\mu$ l af uppþyrlluðum frumum eru settir í innri holur 96-hola míkrotítunarbakka. Ytri holurnar eru fylltar með 200  $\mu$ l af fosfatstilltri saltlausn (PBS) (sjá mynd 1 og 2). Frumurnar í bakkanum eru fyrst látar standa í 24 klukkustundir í CO<sub>2</sub>-ræktunarkassa (við 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C, 100% raki).
- Þegar viðstöðu er lokið eru bakkarnir skoðaðir m.t.t. sjónrænna frumueiturhrifa (sjá viðbæti 4.1), mengunar og samflæðis. Eingöngu skal nota til prófunar bakka sem sýna engin sjónræn frumueiturhrif, mengun og hafa a.m.k. 85% samflæði. Ætíð úr innri holunum er fjarlægt varlega og í stað þeirra sett 200  $\mu$ l af estrógenlausu greiningaræti sem inniheldur viðeigandi þynningarraðir viðmiðunarstaðla, prófunaríðefna, jákvæðs samanburðar, neikvæðs samanburðar og samanburðar með leysi (tafla 5: rannsóknir á örva; tafla 6: rannsóknir á blokkum). Allir viðmiðunarstaðlar, prófunaríðefni, jákvæður

samanburður, neikvæður samanburður og samanburður með leysi eru prófaðir í þremur settum. Mynd 1 sýnir skipulag bakka fyrir prófanir á örva. Mynd 2 sýnir skipulag bakka fyrir prófanir á blokkum. Bakkaskipulagið fyrir forskimunarprófanir og ítarlegar prófanir er eins. Að því er varðar prófanir á blokkum innihalda allar innri holur, nema holur fyrir samanburð með burðarefni (VC), einnig fastan styrk viðmiðunarstaðals fyrir örva, 17β-estradiól ( $3 \cdot 10^{-12}$  M). Vakin er athygli á að viðmiðunarstöðlum C8 og C4 skal bætt við hvern TC-bakka.

38. Þegar frumurnar hafa orðið fyrir váhrifum frá öllum íðefnum skulu 96-hola míkrotútrunarbakkarnir látnir standa í aðrar 24 klukkustundir í CO<sub>2</sub>-ræktunarkassa (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C, 100% raki).

Mynd 1

**Bakkaskipulag fyrir 96-hola míkrotútrunarbakka fyrir forskimun og mat á áhrifum örva.**

**Bakki 1**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

**Síðari bakkar**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = viðmiðunarstaðalssamanburður með leysi.

C(1–8) = röð þynninga (1–8, frá lægsta til hæsta styrks) viðmiðunarstaðals.

PC = jákvæður samanburður

NC = neikvæður samanburður.

TCx-(1–8) = þynningar (1–8, frá lægsta til hæsta styrks) prófunaríðefnis fyrir forskimunarkeyrslu og mat á örvaáhrifum prófunaríðefnis x.

SC = samanburður með leysi fyrir prófunaríðefnið (helst sami leysir og í C0, en mögulega úr annarri lotu).

Gráir reitir = ytri holur, fylltar með 200 µl af PBS.

## Mynd 2

## Bakkaskipulag fyrir 96-hola míkrótítrunarbakka fyrir blokkaforskimun og mat á áhrifum blokka.

## Bakki 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

## Síðari bakkar

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = viðmiðunarstaðalssamanburður með leysi.

C(1–8) = röð þynninga (1–8, frá lægsta til hæsta styrks) viðmiðunarstaðals.

NC = neikvæður samanburður.

PC = jákvæður samanburður

TCx-(1–8) = þynningar (1–8, frá lægsta til hæsta styrks) prófunaríðefnis fyrir forskimunarkeyrslu og mat á örvaáhrifum prófunaríðefnis x.

SC = samanburður með leysi fyrir prófunaríðefnið (helst sami leysir og í C0, en mögulega úr annarri lotu).

VC = samanburður með burðarefni (samanburður með leysi án fasts styrks örvaviðmiðunarstaðals, 17β-estradiól).

Gráir reitir = ytri holur, fylltar með 200 µl af PBS.

Aths.: allar innri holur, nema holur fyrir samanburð með burðarefni (VC), innihalda einnig fastan styrk örvaviðmiðunarstaðals, 17β-estradiól (3,0\*10<sup>-12</sup> M).

**Mæling á ljómun**

39. Mælingunni á ljómun er lýst í smáatriðum í aðferðarlýsingunum fyrir greiningu á örva og blokkum (10. heimild). Fjarlægja skal ætíð úr holunum og frumunum skal sundrað eftir 24 klukkustunda viðstöðu til að opna frumuhimnuna og gera kleift að mæla lúsíferasavirkni.
40. Að því er varðar mælingu á ljómun þá þarf ljósmæli sem er búinn tvöfaldri inndælingu fyrir þessa aðferð. Lúsíferasavöruninni er komið af stað með inndælingu lúsíferínhvarfefnisins. Svörunin er stöðvuð með því að bæta við 0,2 M NaOH. Svörunin er stöðvuð til að koma í veg fyrir yfirfærslu ljómunar frá einni holu yfir í aðra.
41. Losun ljóss frá hverri holu er gefin upp sem hlutfallslegar ljóseiningar (RLU) á hverja holu.

**Forskimunarkeyrsla**

42. Niðurstöðurnar úr forskimunargreiningu eru notaðar til að ákvarða nákvæmara styrkleikasvið prófunaríðefna fyrir ítarlega prófun. Matinu á niðurstöðum úr forskimunargreiningu og ákvörðun á nákvæmara styrkleikasviði prófunaríðefna fyrir ítarlega prófun er lýst ítarlega í aðferðarlýsingunum fyrir greiningu á örva og blokkum (10. heimild). Hér er gefin stutt samantekt á aðferðunum við að ákvarða styrkbil prófunaríðefna fyrir prófanir á örva og blokkum. Sjá töflu 5 og 6 fyrir leiðbeiningar varðandi tilhögun raðþynningar.

*Val á styrkleikum fyrir mat á örvaáhrifum*

43. Í forskimunarkeyrslunni skal prófa prófunaríðefni með röð þynninga eins og tilgreint er í töflu 5 (örvun) og 6 (blokkun). Prófa skal alla styrkleika í þremur holusettum samkvæmt bakkaskipulaginu eins og tilgreint er á mynd 1 (örvun) og 2 (blokkun).
44. Eingöngu greiningarniðurstöður sem uppfylla samþykktarviðmiðanirnar (tafla 3) teljast gildar og hægt er að nota þær til að meta svörun prófunaríðefna. Ef einn eða fleiri míkrotítrunarbakkar í greiningarröð uppfylla ekki samþykktarviðmiðanirnar skal greina aftur viðkomandi míkrotítrunarbakka. Ef fyrsti bakkinn sem inniheldur allar þynningarraðir viðmiðunarstaðalsins uppfyllir ekki samþykktarviðmiðanirnar verður að greina allar prófunarraðirnar aftur.
45. Aðlaga skal upphafsstyrksbil prófunaríðefna og endurtaka skal forskimunarkeyrslu ef:
  - frumueiturhrif koma fram. Endurtaka skal forskimunaraðferðina með lægri styrkleika prófunaríðefnisins sem er ekki frumueitrandi.
  - forskimunin á prófunaríðefninu sýnir ekki heilan skammtasvörunarferil þar sem styrkleikarnir sem eru prófaðir koma af stað hámarksvakningu. Endurtaka skal forskimunarkeyrsluna með lægri styrkleika prófunaríðefnis.
46. Þegar gild vensl svörunar og skammtastærðar koma fram skal velja þann (lægsta) styrkleika þar sem hámarksvakning kemur fram og sem sýnir ekki frumueiturhrif. Hæsti styrkleiki prófunaríðefnis sem skal prófa í ítarlegu keyrslunum skal vera þrefaldur þessi valdi styrkleiki.
47. Tilreiða skal heilar nákvæmar þynningarraðir prófunaríðefnisins með þeim þrepum þynningar sem tilgreind eru í töflu 5 þar sem byrjað er á hæsta styrkleikanum eins og ákvarðað var hér að framan.
48. Prófunaríðefni sem kallar ekki fram nein örvaáhrif skal prófað í ítarlegu keyrslunum þar sem byrjað er á hæsta styrkleikanum, sem er ekki frumueitrandi, sem greindist í forskimuninni.

*Val á styrkleika fyrir mat á blokkaáhrifum*

49. Eingöngu greiningarniðurstöður sem uppfylla samþykktarviðmiðanirnar (tafla 4) teljast gildar og hægt er að nota þær til að meta svörun prófunariðefna. Ef einn eða fleiri míkrótítunarbakkar í greiningarröð uppfylla ekki samþykktarviðmiðanirnar skal greina aftur viðkomandi míkrótítunarbakka. Ef fyrsti bakkinn sem inniheldur allar þynningarraðir viðmiðunarstaðalsins uppfyllir ekki samþykktarviðmiðanirnar verður að greina allar prófunarraðirnar aftur.
50. Aðlaga skal upphafsstyrksbil prófunariðefna og endurtaka skal forskimunarkeyrslu ef:
- frumueiturhrif koma fram. Endurtaka skal forskimunaraðferðina með lægri styrkleika prófunariðefnisins sem er ekki frumueitrandi.
  - forskimunin á prófunariðefninu sýnir ekki heilan skammtasvörunarferil þar sem styrkleikarnir sem eru prófaðir koma af stað hámarksheftingu. Endurtaka skal forskimunina með því að nota lægri styrkleika prófunariðefnis.
51. Þegar gild vensl svörunar og skammtastærðar finnast skal velja þann (lægsta) styrkleika þar sem hámarkshefting kemur fram og sem sýnir ekki frumueiturhrif. Hæsti styrkleiki prófunariðefnis sem skal prófa í ítarlegu keyrslunum skal vera þrefaldur þessi valdi styrkleiki.
52. Tilreiða skal heilar nákvæmar þynningarraðir með þeim þrepum þynningar sem tilgreind eru í töflu 6 þar sem byrjað er á hæsta styrkleikanum eins og ákvarðað var hér að framan.
53. Prófunariðefni sem kalla ekki fram nein blokkaáhrif skulu prófuð í ítarlegu keyrslunum þar sem byrjað er á hæsta styrkleikanum, sem er ekki frumueitrandi, sem var prófaður í forskimuninni.

**Ítarlegar keyrslur**

54. Eftir val á nákvæmu styrkbilunum skal prófa prófunariðefni ítarlega með röð þynninga eins og tilgreint er í töflu 5 (örvun) og 6 (blokkun). Prófa skal alla styrkleika í þremur holusettum samkvæmt bakkaskipulaginu eins og tilgreint er á mynd 1 (örvun) og 2 (blokkun).
55. Eingöngu greiningarniðurstöður sem uppfylla samþykktarviðmiðanirnar (tafla 3 og 4) teljast gildar og hægt er að nota þær til að meta svörun prófunariðefna. Ef einn eða fleiri míkrótítunarbakkar í greiningarröð uppfylla ekki samþykktarviðmiðanirnar skal greina aftur viðkomandi míkrótítunarbakka. Ef fyrsti bakkinn sem inniheldur allar þynningarraðir viðmiðunarstaðalsins uppfyllir ekki samþykktarviðmiðanirnar verður að greina allar prófunarraðirnar aftur.

Tafla 5

## Styrkleiki og þynning viðmiðunarstaðla, samanburða og prófunariðefna sem notuð eru fyrir prófun á örva

Viðmiðunarstaðall 17β-estradíól		TCx - forskimunarkeyrsla		TCx - ítarleg keyrsla		Samanburðir	
styrkur (M)		þynning		þynning		styrkur (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	3*10 <sup>-6</sup>
C1	1*10 <sup>-13</sup>	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	1*10 <sup>-8</sup>
C2	3*10 <sup>-13</sup>	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	1*10 <sup>-12</sup>	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	3*10 <sup>-12</sup>	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	6*10 <sup>-12</sup>	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	1*10 <sup>-11</sup>	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	3*10 <sup>-11</sup>	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	1*10 <sup>-10</sup>						

TCx - prófunariðefni x

PC - jákvæður samanburður (17α-metýltestósterón)

NC - neikvæður samanburður (kortíkösterón)

C0 - viðmiðunarstaðalssamanburður með leysi

SC - samanburður með leysi fyrir prófunariðefni



Tafla 6

**Styrkleiki og þynning viðmiðunarstaðla, samanburða og prófunariðefna sem notuð eru fyrir prófun á blokka**

Viðmiðunarstaðall tamoxífen		TCx - forskimunarkeyrsla		TCx - ítarleg keyrsla		Samanburðir	
styrkur (M)		þynning		þynning		styrkur (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	1*10 <sup>-9</sup>
C1	3*10 <sup>-9</sup>	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	1*10 <sup>-5</sup>
C2	1*10 <sup>-8</sup>	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	3*10 <sup>-8</sup>	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	1*10 <sup>-7</sup>	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	3*10 <sup>-</sup>	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	<b>Viðbættur örvi</b>	
C6	1*10 <sup>-6</sup>	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	<b>styrkur (M)</b>	
C7	3*10 <sup>-6</sup>	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-estradíól	3*10 <sup>-12</sup>
C8	1*10 <sup>-5</sup>						

TCx - prófunariðefni x

PC - jákvæður samanburður (4-hýdroxítamoxífen)

NC - neikvæður samanburður (resveratról)

C0 - viðmiðunarstaðalssamanburður með leysi

SC - samanburður með leysi fyrir prófunariðefni

VC - samanburður með burðarefni (inniheldur ekki fastan styrk örvaviðmiðunarstaðalsins 17β-estradíól (3.0\*10<sup>-12</sup> M))

**Gagnasöfnun og gagnagreining**

56. Eftir forskimunarkeyrslurnar og ítarlegu keyrslurnar skal ákvarða EC10, EC50, PC10, PC50 og hámarksvakningu (TC<sub>xmax</sub>) prófunaríðefnis fyrir örvaprófun. Reikna skal út IC20, IC50, PC80, PC50 og lágmarksvakningu (TC<sub>xmin</sub>) fyrir blokkaprófun. Á mynd 3 (örvun) og 4 (blokkun) er sett fram myndræn útfærsla á þessum mæliþáttum. Mæliþættirnir sem krafist er eru reiknaðir út á grundvelli hlutfallslegrar vakningar hvers prófunaríðefnis (miðað við hámarksvakningu viðmiðunarstaðalsins (=100%)). Nota skal ólínulegt aðhvarf (breytilegur halli, 4 mæliþættir) til að meta gögn samkvæmt eftirfarandi jöfnu:

$$Y = Botn + \frac{(Toppur - Botn)}{(1 + 10^{(lgEC_{50} - X) \times Hill\text{-hallagildi}})}$$

Þar sem:

X = logri skammts eða styrks

Y = svörun (hlutfallsleg vakning (%))

Toppur = hámarksvakning (%)

Botn = lágmarksvakning (%)

LogEC50 = sá logri styrks þar sem 50% hámarkssvörunar kemur fram.

Hill-hallagildi = hallastuðull eða Hill-halli

57. Óunnin gögn úr ljósmælinum, gefin upp sem hlutfallslegar ljóseiningar (RLU), skulu færð yfir í töflureikni fyrir gagnagreiningu sem er ætlaður fyrir forskimunarkeyrslur og ítarlegar keyrslur. Óunnin gögn skulu uppfylla samþykktarviðmiðanirnar eins og tilgreint er í töflu 3A og 3B (örvun) eða 4A og 4B (blokkun). Ef óunnu gögnin uppfylla samþykktarviðmiðanirnar skal framkvæma eftirfarandi þrep við útreikning til að ákvarða nauðsynlega mæliþætti:

**Örvun**

- Meðal-RLU í viðmiðunarstaðalssamanburðinum með leysi skal dregið frá ónunnum greiningargögnum fyrir hvern viðmiðunarstaðlanna.
- Meðal-RLU fyrir samanburðinn með leysi fyrir prófunaríðefni skal dregið frá hverjum ónunnum greiningargögnum fyrir prófunaríðefnin.

- Hlutfallsleg vakning við hvern styrkleika viðmiðunarstaðalsins er reiknuð út. Stilla skal vakningu hæsta styrkleika viðmiðunarstaðalsins við 100%.
- Reikna skal út hlutfallslega vakningu hvers styrkleika prófunaríðefnis samanborið við hæsta styrkleika viðmiðunarstaðalsins sem 100%.
- Meta skal greiningarniðurstöðurnar eftir ólínulegu aðhvarfi (breytilegur halli, 4 mælipættir).
- Ákvarða skal EC50 og EC10 fyrir viðmiðunarstaðalinn.
- Ákvarða skal EC50 og EC10 fyrir prófunaríðefnin.
- Ákvarða skal hámark hlutfallslegrar vakningar prófunaríðefnisins (TCmax).
- Ákvarða skal PC10 og PC50 fyrir prófunaríðefnin.

Að því er varðar prófunaríðefni getur verið ómögulegt að ná heilum skammtasvörunarferli, t.d. vegna vandamála varðandi frumueiturhrif eða leysni. Þá er ekki hægt að ákvarða EC50, EC10 og PC50. Í slíkum tilvikum er aðeins hægt að ákvarða PC10 og TCmax.

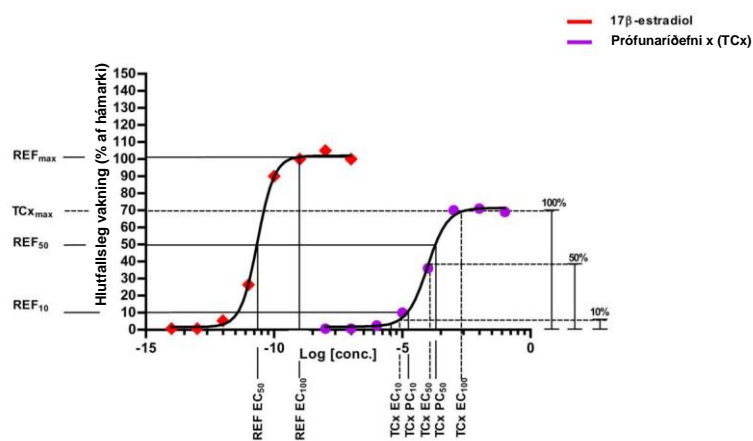
### **Blokkun**

- Meðal-RLU fyrir hæsta styrk viðmiðunarstaðalsins skal dregið frá ónunnum greiningargögnum fyrir hvern viðmiðunarstaðlanna.
- Meðal-RLU fyrir hæsta styrk viðmiðunarstaðalsins skal dregið frá ónunnum greiningargögnum fyrir hvern viðmiðunarstaðlanna.
- Hlutfallsleg vakning við hvern styrkleika viðmiðunarstaðalsins er reiknuð út. Stilla skal vakningu lægsta styrkleika viðmiðunarstaðalsins við 100%.
- Reikna skal út hlutfallslega vakningu hvers styrkleika prófunaríðefnis samanborið við lægsta styrkleika viðmiðunarstaðalsins sem 100%.

- Meta skal greiningarniðurstöðurnar með ólínulegu aðhvarfi (breytilegur halli, 4 mæliþættir).
- Ákvarða skal IC50 og IC20 fyrir viðmiðunarstaðalinn.
- Ákvarða skal IC50 og IC20 fyrir prófunariðefnin.
- Ákvarða skal lágmark hlutfallslegrar vakningar prófunariðefnisins (TCmin).
- Ákvarða skal PC80 og PC50 fyrir prófunariðefnin.

Mynd 3

### Yfirlit yfir mæliþætti sem eru ákvarðaðir í örvagreiningunni



EC10 = styrkur efnis þegar 10 % hámarkssvörunar þess kemur fram.

EC50 = styrkur efnis þegar 50 % hámarkssvörunar þess kemur fram.

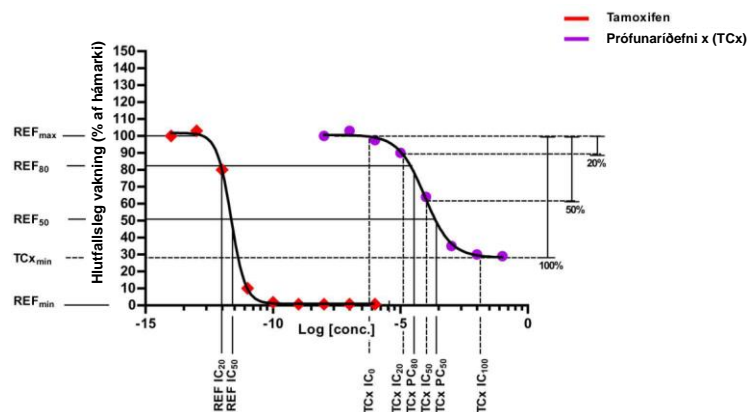
PC10 = styrkur prófunariðefnis þegar svörun þess er jöfn EC10 fyrir viðmiðunarstaðalinn.

PC50 = styrkur prófunariðefnis þegar svörun þess er jöfn EC50 fyrir viðmiðunarstaðalinn.

TCx<sub>max</sub> = hámark hlutfallslegrar vakningar prófunariðefnis.

## Mynd 4

## Yfirlit yfir mælipætti sem eru ákvarðaðir í blokkagreiningunni



IC20 = styrkur efnis þegar 80% hámarkssvörunar þess kemur fram (20% hefting).

IC50 = styrkur efnis þegar 50% hámarkssvörunar þess kemur fram (50% hefting).

PC80 = styrkur prófunariðefnis þegar svörun þess er jöfn IC20 fyrir viðmiðunarstaðalinn.

PC50 = styrkur prófunariðefnis þegar svörun þess er jöfn IC50 fyrir viðmiðunarstaðalinn.

TCxmin = lágmark hlutfallslegrar vakningar prófunariðefnis.

Að því er varðar prófunariðefni getur verið ómögulegt að ná heilum skammtasvörunarferli, t.d. vegna vandamála varðandi frumueiturhrif eða leysni. Þá er ekki hægt að ákvarða IC50, IC20 og PC50. Í slíkum tilvikum er aðeins hægt að ákvarða PC20 og TCmin.

58. Niðurstöðurnar skulu byggjast á tveimur (eða þremur) óháðum keyrslum. Ef úr tveimur keyrslum koma samanburðarhæfar niðurstöður, og þar af leiðandi samanburðarnákvæmar, er ekki nauðsynlegt að framkvæma þriðju keyrsluna. Til að vera ásættanlegar skulu niðurstöðurnar:

— uppfylla viðmiðanirnar fyrir ásættanleika (sjá Viðmiðanir fyrir ásættanleika, 14.-22. lið),

— vera samanburðarnákvæmar.

**Viðmiðanir um túlkun gagna**

59. Að því er varðar túlkun gagnanna og ákvörðunina hvort prófunaríðefni teljist vera jákvætt eða neikvætt skal nota eftirfarandi viðmiðanir:

Örvun

Í hverri ítarlegri keyrslu telst prófunaríðefni vera jákvætt ef:

- 1 TCmax er jafnt eða meira en 10% af hámarkssvörun viðmiðunarstaðalsins (REF10).
- 2 Minnst tveir samfelldir styrkleikar prófunaríðfnisins eru jafnir eða meira en REF10.

Í hverri ítarlegri keyrslu telst prófunaríðefni vera neikvætt ef:

- 1 TCmax fer ekki yfir 10% af hámarkssvörun viðmiðunarstaðalsins (REF10).
- 2 Minna en tveir samfelldir styrkleikar prófunaríðfnisins eru jafnir eða meira en REF10.

Blokkun

Í hverri ítarlegri keyrslu telst prófunaríðefni vera jákvætt ef:

- 1 TCmin er jafnt eða minna en 80 % af hámarkssvörun viðmiðunarstaðalsins (REF80 = 20% hefting).
- 2 Minnst tveir samfelldir styrkleikar prófunaríðfnisins eru jafnir eða minna en REF80.

Í hverri ítarlegri keyrslu telst prófunaríðefni vera neikvætt ef:

- 1 TCmin er meira en 80% af hámarkssvörun viðmiðunarstaðalsins (REF80 = 20% hefting).
- 2 Minna en tveir samfelldir styrkleikar prófunaríðfnisins eru jafnir eða minna en REF80.

60. Til að lýsa mætti jákvæðrar svörunar prófunaríðfnis skal skrá magn áhrifanna (örvun: TCmax; blokkun: TCmin) og styrkleikann þegar áhrifanna verður vart (örvun: EC10, EC50, PC10, PC50; blokkun: IC20, IC50, PC80, PC50).

#### PRÓFUNARSKÝRSLA

61. Sjá 20. lið „ÞÆTTIR ER TA-GREININGAR“

#### HEIMILDIR

- 1) OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ER $\alpha$  CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
- 2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. Toxicol Sci. 83(1), 136-148.
- 3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, and van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER) $\alpha$  and not through ER $\beta$ . Endocrinology 142(3), 1156-1166.
- 4) Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology 17(6):646-57.
- 5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavallès V and Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. Biochem. Pharmacol., 71, 1459-1469.
- 6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. Endocrinol., 139, 4252-4263.
- 7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol., 122, 204–211.

- 8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, and van der Burg B. (2006). Comparison of in vitro and in vivo screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.*, 89(1), 173–187.
- 9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M and Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769-771.
- 10) Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Scr.*, 4, 67-73
- 11) Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ER $\alpha$  CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, the Netherlands.

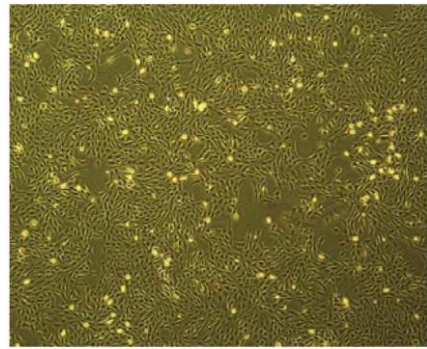


## Viðbætur 4.1

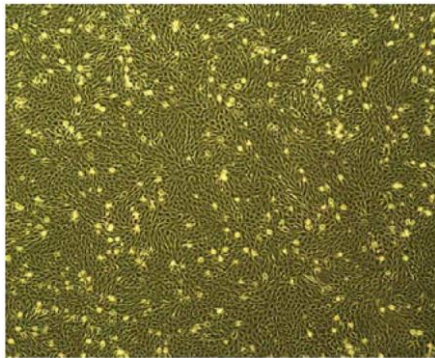
## SJÓNARÆN SKOÐUN Á LÍFVÆNLEIKA FRUMNA



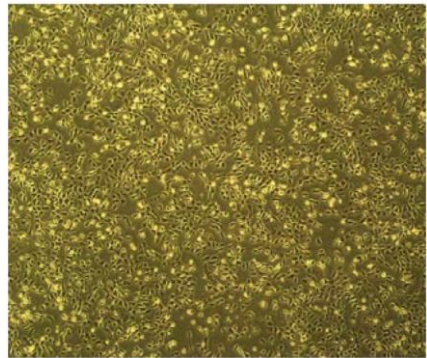
< 5% samrennsli. Nýsáðar frumur. 100% lífvænleiki frumna. Flokkun: „engin frumueiturhrif“



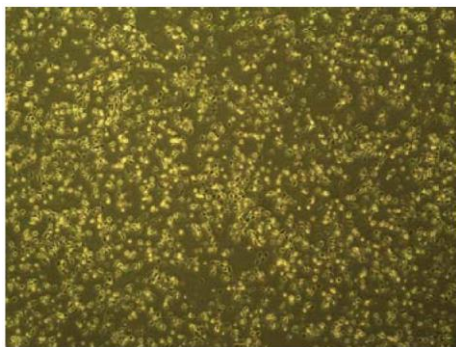
> 85% samrennsli. Á þessu stigi eru frumur láttnar verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefnum. > 95% lífvænleiki frumna. Flokkun: „engin frumueiturhrif“



> 95% samrennsli. Frumur liggja þétt saman og byrja að vaxa hver yfir aðra. > 95% lífvænleiki frumna. Flokkun: „engin frumueiturhrif“



< 25% lífvænleiki frumna. Frumur losna sundur og snerting milli frumna minnkar. Frumur eru ávalar. Flokkun: „frumueiturhrif“



< 5% lífvænleiki frumna. Frumur losna alveg sundur og tenging milli frumna er rofin. Frumur eru ávalar. Flokkun: „frumueiturhrif“

B.67 *IN VITRO* MAMMALIAN CELL GENE MUTATION TESTS USING THE THYMIDINE KINASE GENE

## INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 490 um prófanir (2016). Prófunaraðferðir eru yfirfarnar og endurskoðaðar reglulega í ljósi framfara á sviði vísinda, þarfa löggjafar og velferðar dýra. Eitilæxlisgreiningu músa (MLA) og TK6-prófun þar sem notað er týmidínkínasa-genasæti (TK) var upphaflega að finna í prófunaraðferð B.17. Síðan þá hefur MLA-sérfræðingahópur á vegum „International Workshop for Genotoxicity Testing“ (hér á eftir nefnt IWGT) þróað alþjóðlegar samræmdar ráðleggingar varðandi samþykktarviðmiðanir fyrir greiningar og túlkun gagna fyrir MLA (1.–5. heimild) og eru þessi tilmæli tekin upp í þessa nýju prófunaraðferð B.67. Þessi prófunaraðferð er gerð fyrir MLA og TK6-prófunina, þar sem er einnig notað TK-genasæti. MLA hefur verið mikið notuð í eftirlitsskyni en TK6 hefur verið notuð mun sjaldnar. Það skal tekið fram að þrátt fyrir að líkindi séu milli endapunktanna eru frumulínurnar tvær ekki jafngildar og í eftirlitsáætlunum getur komið skýrt fram val um aðra þeirra frekar en hina fyrir tiltekna notkun í eftirlitsskyni. Fullgilding MLA sýndi t.d. að hún hentar ekki eingöngu til að greina genastökkbreytingu heldur einnig getu prófunariðefnis til að kalla fram skemmd á byggingu litnings. Þessi prófunaraðferð er hluti af röð aðferða við erfðafræðilegar eiturefnafræðiprófanir. Efnahags- og framfarastofnunin hefur þróað skjal sem veitir gagnorðar upplýsingar um prófanir varðandi erfðafræðilega eiturefnafræði og yfirlit yfir nýlegar breytingar sem voru gerðar á OECD-viðmiðunarreglunum um prófanir varðandi erfðafræðilega eiturefnafræði (6. heimild).
2. Tilgangur prófana í *glasi* á genastökkbreytingum í spendýrafrumum er að greina genastökkbreytingar sem íðefni kalla fram. Frumulínurnar, sem eru notaðar í þessum prófunum, mæla frumstökkbreytingar í vísigenum, einkum innræna týmidínkínasageninu (*TK* fyrir frumur úr mönnum og *Tk* fyrir frumur úr nagdýrum sem vísað er til í heild sinni sem *TK* í þessari prófunaraðferð). Þessi prófunaraðferð er ætluð til notkunar með tveimur frumulínum: eitilæxlisfrumulínu músa, L5178Y TK<sup>+/−</sup>-3.7.2C (yfirleitt kölluð L5178Y) og eitilímfrumulínu úr mönnum, TK6 (yfirleitt kölluð TK6). Jafnvel þótt þessar tvær frumulínur séu mismunandi vegna uppruna þeirra, frumuvaxtar, p53-stöðu o.s.frv. er hægt að framkvæma prófanir á *TK*-genastökkbreytingum á svipaðan hátt með báðum frumugerðunum eins og lýst er í þessari prófunaraðferð.
3. Sjálfvitnings- og arfblandnieiginleikar týmidínkínasagensins gera það kleift að greina lífvænlegar þyrpingar þar sem frumur skortir ensímið týmidínkínasa eftir stökkbreytingu frá TK<sup>+/−</sup> til TK<sup>−/−</sup>. Þessi skortur getur verið afleiðing atburða í erfðaefninu sem hafa áhrif á *TK*-genið, þ.m.t. bæði genastökkbreytingar (punktbreytingar, hliðrunarbreytingar, litlar úrfellingar o.s.frv.) og atburði í litningum (miklar úrfellingar, byggingarlegar litningabreytingar og endurröðun í jafnskiptingu). Síðari atburðirnir eru gefnir upp sem tap á arfblandni sem er algeng erfðafræðileg breyting á æxlisbæligenum í æxlismyndun hjá mönnum. Fræðilega séð er hægt að greina tap á öllum litningnum sem ber *TK*-genið, sem stafar af spóluskerðingu (e. *spindle impairment*) og/eða óaðskilnaði í frumuskiptingu, með MLA. Sambland af frumuerfðafræðilegri greiningu og sameindagreiningu sýnir raunar greinilega að sum TK-stökkbrigði í MLA eru afleiðing af óaðskilnaði. Greining á vægi rökstuddra vísbendinga sýnir þó að prófanir á *TK*-genastökkbreytingum geta ekki greint efni sem valda mislitnun með áreiðanlegum hætti þegar stöðluðum viðmiðunum um frumueiturhrif er beitt (eins og lýst er í þessari prófunaraðferð) og því er ekki viðeigandi að nota þessar prófanir til að greina efni sem valda mislitnun (7.–9. heimild).
4. Í prófunum á *TK*-genastökkbreytingum verða til tveir aðgreindir sviparsflokkar *TK*-stökkbrigða; stökkbrigði, sem vaxa á eðlilegan hátt, sem vaxa á sama hraða og *TK*-arfblandni-frumur og hægvasandi stökkbrigði sem vaxa með langvarandi tvöföldunartíma. Stökkbrigði sem vaxa á eðlilegan hátt og hægvasandi stökkbrigði eru þekkt sem stökkbrigði sem mynda stórar þyrpingar og stökkbrigði sem mynda litlar þyrpingar í MLA og sem stökkbrigði í snemmfamkomnum og síðframkomnum þyrpingum í TK6. Sameindafræðilegt og frumuerfðafræðilegt eðli stökkbrigða í MLA, bæði í stórum og litlum þyrpingum, hefur verið rannsakað í smáatriðum (8. og 10.–13. heimild). Sameindafræðilegt og frumuerfðafræðilegt eðli snemmfamkominna og síðframkominna TK6-stökkbrigða hefur einnig verið rannsakað ítarlega (14.–17. heimild). Að því er varðar báðar frumugerðirnar hafa hægvasandi stökkbrigði orðið fyrir erfðafræðilegum skemmdum sem fela í sér meint vaxtarstýrigen nálægt *TK*-genasætinu sem leiðir til langvarandi tvöföldunartíma og myndunar síðframkominna eða lítilla þyrpinga (18. heimild). Framköllun hægvasandi stökkbrigða hefur verið tengd íðefnum sem kalla fram stórsæjar breytingar í uppbyggingu litninga. Frumur með skemmdir sem fela ekki í sér meint vaxtarstýrigen nálægt *TK*-genasætinu vaxa á mótáhratt og móðurfrumurnar og verða að stökkbrigðum sem vaxa á eðlilegan hátt. Framköllun stökkbrigða, sem vaxa aðallega á eðlilegan hátt, er tengd við íðefni sem hafa fyrst og fremst virkni sem punktstökkbreytivaldar. Af þessum sökum er mikilvægt að telja bæði hægvasandi stökkbrigði og stökkbrigði sem vaxa á eðlilegan hátt til að endurheimta öll stökkbrigðin og til að veita einhverja innsýn í það hvernig skemmd(ir) (stökkbreytivaldar á móti efnunum sem valda litningabrenslun) prófunariðefnið kallar fram (10. og 12. heimild og 18.–19. heimild).

5. Prófunaraðferðin er skipulögð þannig að hún veiti almennar upplýsingar sem eiga við um bæði MLA og TK6, sem og sértækar leiðbeiningar fyrir einstakar prófanir.
6. Skilgreiningar, sem eru notaðar, eru gefnar upp í 1. viðbæti.

#### ATRÍÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFI Í HUGA Í UPPHAFI

7. Prófanir, sem eru gerðar í glasi, útheimta að jafnaði útræna efnaskiptavirkjun. Útrænt kerfi efnaskiptavirkjunar getur ekki líkt fullkomlega eftir þeim aðstæðum sem ríkja í líffi.
8. Þess skal gætt að ekki komi upp aðstæður sem gætu leitt til niðurstaðna sem eru jákvæðar vegna gervinga, (þ.e. hugsanleg verkun við prófunarkerfið) sem stafa ekki af verkunum milli prófunariðefnis og erfðaefnis frumunnar; meðal slíkra aðstæðna eru breytingar á sýrustigi eða osmólalstyrk, verkanir milli efnispátta í ætinu (20.–21. heimild) eða of mikil frumueiturhrif (22.–24. heimild). Frumueiturhrif sem fara yfir ráðlögðu hæstu frumueiturhrifagildin, eins og þau eru skilgreind í 28. lið, teljast of mikil fyrir MLA og TK6. Að auki skal tekið fram að prófunariðefni sem eru týmidín-hliðstæðuefni, eða haga sér eins og týmidínhliðstæðuefni, geta aukið tíðni stökkbrigða með valvísu vexti á sjálfsprottunum bakgrunnsstökkbrigðum meðan frumumeðhöndlun stendur yfir og útheimta fleiri prófunaraðferðir til fullnægjandi mats (25. heimild).
9. Sértækar aðlaganir á þessari prófunaraðferð gætu reynst nauðsynlegar vegna tilbúinna nanóefna en þeim er ekki lýst í þessari prófunaraðferð.
10. Áður en þessi prófunaraðferð til prófunar á blöndu, sem er framkvæmd til að fá gögn sem fyrirhugað er að nota í eftirlitsskyni, er notuð skal skoðað hvort, og þá af hverju, hún gæti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi. Ekki er þörf á slíkri skoðun ef prófun á blöndunni er krafa af hálfu eftirlitsfirvalda.
11. Stökkbreyttar frumur sem skortir týmidínkínasaensímuvirkni vegna stökkbreytingarinnar  $TK^{+/}$  til  $TK^{-/}$  eru þolnar gagnvart frumuhemjandi áhrifum þýmidínhliðstæðunnar tríflúortýmidíns (TFT). Frumur með  $TK$  eru næmar gagnvart tríflúortýmidíni (TFT) sem hindrar efnaskipti frumna og stöðvar frekari frumuskiptingu. Stökkbreyttar frumur eru því færar um að fjölga sér ef tríflúortýmidín (TFT) er í umhverfi þeirra og mynda sýnilegar þyrpingar en það geta frumur sem innihalda  $TK$ -ensímið ekki.

#### MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

12. Frumur í svifblöndu eru láttnar verða fyrir váhrifum frá prófunariðefninu í hæfilegan tíma (sjá 33. lið), bæði með og án útrænnar efnaskiptavirkjunar (sjá 19. lið), og síðan afræktaðar til þess að ákvarða frumueiturhrif og láta svipfarstjáníngu koma fram áður en stökkbrigðin eru valin. Að því er varðar MLA eru frumueiturhrif ákvörðuð með hlutfallslegum heildarvexti (RTG—sjá 25. lið) og að því er varðar TK6 með hlutfallslegri lifun (RS—sjá 26. lið). Meðhöndluðu ræktirnar eru láttnar vera í vaxtarætinu í hæfilegan tíma, sem er miðaður við hverja frumugerð (sjá 37. lið), svo að svipfarstjáníning framkallaðra stökkbreytinga verði því sem næst í hámarki. Eftir að svipfarstjáníning er komin fram er tíðni stökkbrigða ákvörðuð með því að sá þekktum fjölda frumna á æti, sem inniheldur valvísa efnið, í því skyni að finna stökkbreyttar þyrpingar og á æti, sem er án valvísa efnisins, til að ákvarða klónunarhæfnina (lífvænleikann). Eftir ræktun í hæfilega langan tíma eru þyrpingarnar taldar. Tíðni stökkbrigða er reiknuð út frá fjölda stökkbreyttra þyrpinga sem er leiðrétt með klónunarhæfni þegar stökkbrigðin eru valin.

#### LÝSING Á AÐFERÐINNI

#### Undirbúningur

##### *Frumur*

13. Að því er varðar MLA: Þar eð MLA var þróað og eiginleikum hennar lýst með því að nota  $TK^{+/}$ -3.7.2C-undirlínu L5178Y frumna verður að nota þessa sérstöku undirlínu fyrir MLA. Frumulínan L5178Y var fengin úr eitilæxli hóstakirtils sem metýlkólantren kallaði fram hjá DBA-2-mús (26. heimild). Clive og samstarfsfólk meðhöndluðu L5178Y-frumur (sem Clive nefndi  $TK^{+/}$ -3) með etýlmetansúlfónati og einangruðu  $TK^{-/}$  (nefnt  $TK^{-/}$ -3.7) -klón með því að nota brómódeoxyúridín sem valvísa efnið. Úr  $TK^{-/}$ -klóninu voru einangruð sjálfsprottið  $TK^{+/}$ -klón (nefnt  $TK^{+/}$ -3.7.2.) og

undirklón (nefnt TK<sup>+/</sup>-3.7.2C) og eiginleikum þeirra lýst til notkunar í MLA (27. heimild). Kjarngerð fyrir frumulfnuna hefur verið birt (28.–31. heimild). Dæmigerður litningafjöldi er 40. Einn miðheftur litningur (t12;13) skal talinn sem einn litningur. TK-genasæti músar er staðsett á fjarenda 11. litnings. Frumulínan L5178Y TK<sup>+/</sup>-3.7.2C er með stökkbreytingar í báðum p53-genasamsætum og myndar stökkbreytt -p53 prótín (32. og 33. heimild). Geta prófunarinnar til að greina skemmdir í stórum stíl stafar sennilega af p53-stöðu TK<sup>+/</sup>-3.7.2C-frumulínnar (17. heimild).

14. Að því er varðar TK6: TK6 er eitilímfrumulína úr mönnum. Móðurfrumulínan er frumulínan WI-L2, sem var umbreytt með Epstein-Barr-veirunni, sem var upphaflega fengin úr 5 ára gömlum dreng með arfgengan hnattrauðkornakvilla. Fyrsta einangraða klóninu, HH4, var stökkbreytt með ICR191 og arblendin TK-frumulína, TK6, varð til (34. heimild). TK6-frumur eru næstum því tvílitna og hin dæmigerða kjarngerð er 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35. heimild). TK-genasæti hjá mönnum er staðsett á langarmi litnings 17. TK6 er p53-virkjanleg frumulína vegna þess að hún er með villigerð p53-raðar í báðum genasamsætum og tjáir einungis villigerð p53-prótíns (36. heimild).
15. Þegar viðmiðunarstofni er fyrst komið á eða hann endurnýjaður er ráðlegt, að því er varðar bæði MLA og TK6, að prófunarstofan gangi úr skugga um að berfrymingasmit sé ekki fyrir hendi, greini kjarngerð frumnanna eða liti litninga sem eru með TK-genasæti og athugi tvöföldunartíma hópsins. Nauðsynlegt er að vita hver er eðlileg lengd frumhrings frumna sem eru notaðar í prófunarstofunni og hún skal vera í samræmi við útgefna frumueiginleika (16., 19. og 37. heimild). Þessi viðmiðunarstofn skal geymdur við eða undir -150 °C og notaður til að tilreiða alla vinnslustofna frumna.
16. Annaðhvort áður en miklum fjölda vinnslustofna, sem eru varðveittir við lághita, er komið á eða rétt áður en þeir eru notaðir í tilraun kann að vera nauðsynlegt að fjarlægja stökkbreyttar frumur sem eru þegar til staðar í ræktunum [nema tíðni stökkbrigða (MF) í samanburði með leysi sé þegar innan ásætlanlegs sviðs — sjá töflu 2 fyrir MLA]. Þetta er gert með því að nota metótrexat (amínópterín) til að velja frá frumur sem skortir TK og bæta týmidíni, hýpóxantíni og glýsíní (L5178Y) eða 2'-deoxýsítidíni (TK6) við ræktunina til að tryggja að vöxtur TK-virkjanlegra frumna (19. og 38.–39. heimild) og TK6 (40. heimild) verði í hámarki. Almennar ráðleggingar um góðar starfsvenjur fyrir viðhald frumurækta sem og sérstakar ráðleggingar fyrir L5178Y- og TK6-frumur er að finna í 19., 31., 37., 39. og 41. heimild. Gagnahirsla fyrir frumur með vel skilgreinda eiginleika er tiltæk (37. heimild) fyrir rannsóknarstofur sem þurfa viðmiðunarfrumustofna til að hefja annaðhvort MLA eða TK6 eða til að afla nýrra viðmiðunarfrumustofna.

### Æti og ræktunarskilyrði

17. Að því er varðar báðar prófanir skal nota viðeigandi ræktunaræti og ræktunarskilyrði (t.d. ræktunarflát, rakabætt andrúmsloft með 5% CO<sub>2</sub> og ræktunarhitastig við 37 °C) til að viðhalda frumum í rækt. Frumuræktum skal ávallt viðhaldið við skilyrði sem tryggja að þær vaxi í veldisvaxtarfasa. Sérstaklega er mikilvægt að velja æti og ræktunaraðstæður sem tryggja að vöxtur frumna meðan tjáningartímabilið stendur yfir og klónun bæði stökkbreyttra og óstökkbreyttra frumna verði í hámarki. Að því er varðar MLA og TK6 er einnig mikilvægt að ræktunaraðstæður tryggji að vöxtur bæði stórra þyrpinga/snemmmframkominna og lítilla þyrpinga/síðframkominna TK-stökkbrigða verði í hámarki. Nánari upplýsingar um ræktun, þ.m.t. þörf á að hita óvirkjað hrossasermi á tilhlýðilegan hátt ef RPMI-æti er notað meðan stökkbrigðin eru valin, er að finna í 19., 31., 38.–40. og 42. heimild.

### Undirbúningur rækta

18. Frumum úr stofnræktum er fjölgað og sáð á ræktunaræti í hæfilegum þéttleika til að ræktir í sviflausnum haldi áfram í veldisvexti á meðhöndlunar- og tjáningartímanum.

### Efnaskiptavirkjun

19. Nota skal útræn efnaskiptakerfi þegar notaðar eru L5178Y- og TK6-frumur vegna þess að þær hafa ófullnægjandi getu til útrænna efnaskipta. Kerfið sem algengast er að nota, sem ráðlagt er að nota sem sjálfgefið nema rök séu færð fyrir öðru, er með hvatberasneyddum frumusafa (hér á eftir „S9“), með viðbættum hjálparþætti, sem er unninn úr nagdýralífur (yfirleitt úr rottum) og meðhöndlaður með ensímörvandi efnum, s.s. Aroclor 1254 (43.–45. heimild) eða blöndu fenóbarbítals og β-naptóflavóns (46.–51. heimild). Síðarnefnda samsetningin stríðir ekki gegn Stokkhólmssamningnum um þrávirk lífræn efni (52. heimild) og sýnt hefur verið fram á að hún sé jafn árangursrík og Aroclor 1254 til að vekja oxídasa sem gegna

mismunandi hlutverki (45.–49. heimild). S9-þátturinn er venjulega notaður í styrkleika sem er frá 1–2% en má auka upp í 10% (rúmmálshlutfall) í síðasta prófunarætinu. Flokkur prófunaríðefnanna getur haft áhrif á valið á tegund og styrk útræna efnaskiptavirkjunarkerfisins eða efnaskiptavakans sem er notaður.

### Tilreiðsla prófunaríðefnis

20. Prófunaríðefni í föstu formi skulu tilreidd í viðeigandi leysum og þynnt, ef við á, áður en frumurnar eru meðhöndlaðar (sjá 21. lið.). Fljótandi prófunaríðefni má setja beint út í prófunarkerfið og/eða þynna þau fyrir meðferðina í prófunarkerfinu. Loftkennd eða rokgjörn prófunaríðefni skulu prófuð með viðeigandi breytingum á stöðluðu aðferðarlýsingunum, s.s. meðhöndlun í innsigliðum ræktunarilátum (53.–55. heimild). Blöndur af prófunaríðefni skulu gerðar rétt fyrir meðhöndlun nema gögn um stöðugleika staðfesti að efnið þoli geymslu.

### PRÓFUNARSKILYRÐI

#### Leysar

21. Leysirinn skal valinn til að besta leysni prófunaríðefnis án þess að hafa neikvæð áhrif á framkvæmd prófunarinnar, t.d. að breyta frumuvexti, hafa áhrif á heilleika prófunaríðefnisins, hvarfast við ræktunarflát, hindra efnaskiptavirkjunarkerfið. Mælt er til þess, verði því við komið, að fyrst sé kannað hvort nota megi vatnskenndan leysi (eða ræktunaræti). Vel þekktir leysar eru vatn eða dímetýlsúlfíoxíð. Almennu skulu lífrænar leysar ekki fara yfir 1% rúmmálshlutfall og vatnskenndir leysar (saltlausn eða vatn) ekki fara yfir 10% rúmmálshlutfall í endanlega meðhöndlunarmiðlinum. Ef notaðir eru aðrir leysar en þeir vel þekktu (t.d. etanól eða asetón) skal notkun þeirra studd gögnum sem sýna að þau séu samrýmanleg við prófunaríðefnið og prófunarkerfið og hafi ekki erfðaeiturhrif við styrkleikann sem er notaður. Ef þessi gögn til stuðnings liggja ekki fyrir er mikilvægt að bæta við ómeðhöndluðum samanburði (sjá skilgreiningar í 1. viðbæti) til að sýna fram á að leysirinn, sem valinn hefur verið, valdi hvorki skaðlegum né stökkbreytandi áhrifum.

### MÆLINGAR Á FRUMUEITURHRIFUM OG VAL Á MEÐHÖNDLUNARSTYRKLEIKUM

22. Þegar hæsti styrkur íðefnis í prófun er ákvarðaður skal forðast styrk sem getur valdið svörum sem er jákvæð vegna gervinga, s.s. styrk sem veldur óhóflegum frumueiturhrifum (sjá 28. lið), útfellingu í ræktunarætinu (sjá 29. lið) eða greinilegum breytingum á sýrustigi eða osmólalstyrk (sjá 8. lið). Ef prófunaríðefni veldur greinilegri breytingu á sýrustigi í ætinu þegar því er bætt í það skal stilla sýrustigið með því að jafna endanlega meðhöndlunarætið þannig að það komi í veg fyrir niðurstöðu sem er jákvæð vegna gervinga og til að viðhalda viðeigandi ræktunarskilyrðum.
23. Val á styrk byggir á frumueiturhrifum og öðrum atriðum (sjá 27.–30. lið). Ekki er krafist upphafsprófunar en þó getur mat á frumueiturhrifum í upphafsprófun verið gagnlegt til að skilgreina betur styrkleikana sem á að nota í aðaltilrauninni. Þótt frummat á frumueiturhrifum sé gert er enn krafist mælingar á frumueiturhrifum fyrir hverja ræktun í aðaltilrauninni. Ef tilraun til að ákvarða skammtastærð er framkvæmd skal hún spanna vítt styrkleikasvið og annaðhvort er hægt að stöðva hana á 1. degi eftir meðhöndlun eða halda henni áfram í tvo daga meðan tjáning stendur yfir, fram að vali á stökkbrigðum (ef það kemur í ljós að styrkleikar, sem eru notaðir, eru viðeigandi).
24. Ákvarða skal frumueiturhrif fyrir hverja prófunarrækt og samanburðarrækt fyrir sig: aðferðir fyrir MLA (2. heimild) og TK6 (15. heimild) eru skilgreindar af alþjóðlega samþykktum starfsvenjum.
25. Fyrir bæði agar- og örtítrunarbakkautfærslurnar af MLA: Meta skal frumueiturhrif með því að nota hlutfallslegan heildarvöxt (RTG) sem Clive og Spector skilgreindu upphaflega árið 1975 (2. heimild). Þessi ráðstöfun nær yfir hlutfallslegan svifblönduvöxt (RSG) (RSG: prófunarrækt á móti samanburði með leysi) meðan frummeðhöndlun stendur yfir, tjáningartíma og hlutfallslega klónunaræfni (RCE) (RCE: prófunarrækt á móti samanburði með leysi) þegar stökkbrigðin eru valin (2. heimild). Það skal tekið fram að hlutfallslegur svifblönduvöxtur (RSG) felur í sér hvers konar frumutap sem verður í prófunarræktinni meðan meðhöndlun stendur yfir (sjá formúlur í 2. viðbæti).

26. Að því er varðar TK6: Meta skal frumueiturhrif með því að nota hlutfallslega lifun (RS), þ.e. klónunarhæfni frumna sem er sáð strax að lokinni meðhöndlun, leiðrétt m.t.t. frumutaps í meðhöndlun á grundvelli frumutalningar, samanborið við neikvæðan samanburð (með 100% lifun) (sjá formúlur í 2. viðbæti).
27. Meta skal a.m.k. fjóra prófunarstyrkleika (fyrir utan leysinn og jákvæðu samanburðina) sem uppfylla viðmiðanirnar fyrir ásættanleika (viðeigandi frumueiturhrif, frumufjölda o.s.frv.). Þótt ráðlagt sé að nota tvíteknar ræktir er hægt að nota annaðhvort stakar meðhöndlaðar ræktir eða margar samhliða fyrir hvern styrkleika sem er prófaður. Niðurstöður, sem fást úr samhliða ræktunum við tiltekinn styrkleika, skulu tilkynntar sérstaklega en þær er hægt að hópa fyrir gagnagreininguna (55. heimild). Yfirleitt er hæfilegt að tvö- til þrefalda styrkbilin fyrir prófunariðefni sem sýna lítil eða engin frumueiturhrif. Ef frumueiturhrif verða skal velja styrkleikana þannig að þeir nái yfir það frumueiturhrifasvið sem veldur frumueiturhrifum, eins og lýst er í 28. lið, og nái yfir styrkleika sem valda miðlungi til lítilla eða engra frumueiturhrifa. Mörg prófunariðefni sýna brattan feril styrkháðrar svörunar og til að ná yfir allt svið frumueiturhrifa, eða til að rannsaka styrkháða svörun ítarlega, getur verið nauðsynlegt að hafa minna bil á milli styrkleika og fleiri en fjóra styrkleika, einkum við þau skilyrði að endurtekin rannsókn er nauðsynleg (sjá 70. lið). Ef ein rækt er notuð getur verið sérstaklega mikilvægt að nota fleiri en fjóra styrkleika.
28. Ef hámarksstyrkur grundvallast á frumueiturhrifum ætti hæsti styrkurinn að miða að því að ná milli 20 og 10% hlutfallslegum heildarvexti (RTG) fyrir MLA og milli 20 og 10% hlutfallslegri lifun (RS) fyrir TK6 (67. liður).
29. Hæsti greindi styrkleiki torleysanlegra prófunariðefna, sem hafa ekki frumueiturhrif í styrkleika sem er undir lægstu leysanleikamörkum, á að framkalla grugg eða botnfall sem er greinilegt með berum augum, eða með að nota umhverfða smásjá, við lok meðhöndlunarinnar með prófunariðefninu. Þótt frumueiturhrif komi fram í styrkleika sem er hærri en lægstu leysanleikamörk er ráðlagt að prófa við einungis einn styrkleika sem framkallar grugg, eða sýnilegt botnfall, þar eð fellingin getur valdið niðurstöðum sem eru jákvæðar vegna gervinga. Þar eð ræktir í sviflausnum eru notaðar í MLA og TK6 skal gæta sérstaklega að því að tryggja að fellingin trufla ekki framkvæmd prófunarinnar. Það getur einnig verið gagnlegt að ákvarða leysnina í ræktunarætinu fyrir tilraunina.
30. Ef hvorki koma fram felling né takmarkandi frumueiturhrif skal hæsti prófunarstyrkur samsvara 10 mM, 2 mg/ml eða 2 µl/ml, eftir því hvort er lægra (57.–58. heimild). Ef prófunariðefnið hefur óskilgreinda samsetningu, t.d. efni með óþekkta eða breytilega samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni [þ.e. efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu (UVCB-efni)], útdráttarefni úr umhverfinu o.s.frv., gæti hæsti styrkleikinn þurft að vera hærri (t.d. 5 mg/ml), ef frumueiturhrifin eru ónóg, til að auka styrk hvers og eins af efniþáttunum. Þó skal þess getið að þessar kröfur geta verið frábrugðnar fyrir lyf handa mönnum (59. heimild).

### Samanburðir

31. Fyrir hvert tilraunaskilyrði skal hafa með samskeiða neikvæðan samanburð (sjá 21. lið), sem byggist á því að meðhöndlunarætið er eingöngu leysir sem fær sömu meðhöndlun og meðhöndluðu ræktirnar.
32. Samskeiða jákvæðir samanburðir eru nauðsynlegir til að sýna fram á getu rannsóknarstofunnar til að greina stökkbrigði við þau skilyrði sem tiltekin eru í aðferðarlýsingu prófunarinnar sem er notuð, skilvirkni útræna efnaskiptavirkjunarkerfisins (ef það á við) og til að sýna fram á fullnægjandi greiningu á bæði litlum/síðframkomnum og miklum/snemmmframkomnum TK-stökkbrigðum. Dæmi um jákvæðan samanburð eru gefin í töflu 1 hér á eftir. Hægt er að nota önnur jákvæð samanburðarefni ef það er stutt rökum. Þar eð prófanir í glasi á erfðaeiturhrifum á spendýrafrumur eru nægilega staðlaðar fyrir skammtímameðhöndlun (3–4 klst.) sem gerð er samskeiða, með og án efnaskiptavirkjunar, með sömu lengd meðferðar, má takmarka notkun jákvæðs samanburðar við stökkbreytivald sem krefst efnaskiptavirkjunar. Í því tilviki sýnir þessi eina svörun með jákvæðri samanburðarprófun fram á bæði virkni efnaskiptavirkjunarkerfisins og svörunargetu prófunarkerfisins. Ef langtímameðhöndlun er notuð (þ.e. 24 klst. án S9) skal hún þó hafa eigin jákvæðan samanburð þar eð meðhöndlunarlengdin er önnur en í prófuninni þar sem notuð er efnaskiptavirkjun. Í hverjum jákvæðum samanburði skal nota einn eða fleiri styrkleika sem vænst er að valdi samanburðarnákvæmri og greinanlegri aukningu miðað við bakgrunnsgildið til að sýna fram á næmi prófunarkerfisins og svöruninni skal ekki stefnt í hættu með frumueiturhrifum sem fara yfir mörkin sem eru tilgreind í þessari prófunaraðferð (sjá 28. lið).

Tafla 1

**Viðmiðunarefni sem er mælt með til mats á hæfni rannsóknarstofu og við val á jákvæðum samanburði**

Flokkur	Efni	CAS-númer
1. Stökkbreytivaldar sem eru virkir án efnaskiptavirkjunar		
Metýlmetansúlfónat		66-27-3
Mítómýsín C		50-07-7
4-nítrókinólín-N-oxíð		56-57-5
2. Stökkbreytivaldar sem þarfnast efnaskiptavirkjunar		
Bensó(a)pýren		50-32-8
Sýklófosfamíð(mónóhýdrat)		50-18-0(6055-19-2)
7,12-dímetýlbensantracen		57-97-6
3-metýlklólantracen		56-49-5

## VERKFERLI

**Meðhöndlun með prófunaríðefni**

33. Frumur, sem eru í fjölgunarferli, eru meðhöndlaðar með prófunaríðefninu, bæði með efnaskiptavirkjunarkerfi og án þess. Beita skal váhrifum í hæfilegan tíma (venjulega eru 3–4 klukkustundir fullnægjandi). Þó skal þess getið að þessar kröfur geta verið frábrugðnar fyrir lyf handa mönnum (59. heimild). Að því er varðar MLA, í tilvikum þar sem skammtíma-meðhöndlun gefur neikvæðar niðurstöður og upplýsingar benda til þess að þörf sé á lengri meðhöndlun (t.d. kinnisleifahlíðstæður, torleysanleg íðefni (5. og 59. heimild), skal vega það og meta hvort framkvæma skuli prófunina með lengri meðhöndlun, þ.e. 24 klst. án S9.
34. Lágmarksfjöldi frumna sem er notaður fyrir hverja prófunarræktun (samanburður og meðhöndlun) á hverju stigi prófunarinnar, er ákveðinn með tilliti til tíðni sjálfsprottinna stökkbrigða. Almenna viðmiðunarreglan er að fjöldi meðhöndlaðra frumna og umsánina í hverri tilraunarækt sé nógu mikill til að viðhalda a.m.k. 10 en helst 100 sjálfsprottum stökkbrigðum á öllum stigum prófunarinnar (meðhöndlun, svipfarstjáníng og val á stökkbrigðum) (56. heimild).
35. Að því er varðar MLA er ráðlögð, ásættanleg tíðni sjálfsprottinna stökkbrigða á bilinu  $35\text{--}140 \times 10^{-6}$  (agarbakkaútfærsla) og  $50\text{--}170 \times 10^{-6}$  (örtírunarbakkaútfærsla) (sjá töflu 2). Nauðsynlegt er að meðhöndla a.m.k.  $6 \times 10^6$  frumur til að fá a.m.k. 10 og helst 100 sjálfsprottin stökkbrigði sem lifa meðhöndlunina af í hverri prófunarrækt. Meðhöndlun á þessum fjölda frumna og viðhald á nægum fjölda frumna meðan tjáníng og klónun vegna vals á stökkbrigðum stendur yfir tryggir nægan fjölda sjálfsprottinna stökkbrigða (10 eða fleiri) á öllum stigum tilraunarinnar, jafnvel fyrir ræktir sem eru meðhöndlaðar með styrkleikum sem valda 90% frumueiturhrifum (sem er mælt með hlutfallslegum heildarvexti (RTG) sem nemur 10%) (19. og 38.–39. heimild).
36. Að því er varðar TK6 er tíðni sjálfsprottinna stökkbrigða að jafnaði milli 2 og  $10 \times 10^{-6}$ . Nauðsynlegt er að meðhöndla a.m.k.  $20 \times 10^6$  frumur til að fá a.m.k. 10 sjálfsprottin stökkbrigði sem lifa meðhöndlunina af í hverri ræktun. Meðhöndlun á þessum fjölda frumna tryggir nægan fjölda sjálfsprottinna stökkbrigða (10 eða fleiri) jafnvel fyrir ræktirnar sem eru meðhöndlaðar með styrkleikum sem valda 90% frumueiturhrifum meðan meðhöndlun stendur yfir (10% hlutfallsleg lifun (RS)). Auk þess þarf að rækta nægilegan fjölda frumna meðan tjáníngartíminn stendur yfir og sá fyrir val á stökkbrigðum (60. heimild).

**Svipfarstjáníningartími og mæling á frumueiturhrifum og tíðni stökkbrigða**

37. Við lok meðhöndlunartímabilsins eru frumurnar ræktaðar í skilgreindan tíma til að svipfarstjáníning nýframkallaðra stökkbrigða, sem eru sértækar fyrir hverja frumulínu, verði svo til í hámarki. Að því er varðar MLA er svipfarstjáníningartímabilið 2 dagar. Að því er varðar TK6 er svipfarstjáníningartímabilið 3–4 dagar. Ef 24 klst. meðhöndlun er notuð hefst tjáníningartímabilið eftir lok meðhöndlunar.
38. Meðan svipfarstjáníningartímabilið stendur yfir eru frumurnar taldar daglega. Að því er varðar MLA er dagleg frumutalning notuð til að reikna út daglegan svifblönduvöxt (SG). Eftir tveggja daga tjáníningartímabilið eru frumurnar settar í æti og útbúin úr þeim svifblanda, með eða án valvísu efnisins, til að ákvarða fjölda stökkbrigða (valbakkar) og klónunarhæfni (lífvænleikabakkar), eftir því sem við á. Að því er varðar MLA eru tvær jafnásætlanlegar aðferðir fyrir val á stökkbrigðum til klónunar: í annarri er notaður mjúkur agar og í hinni fljótandi æti í 96 holu bökkum (19. og 38.–39. heimild). Klónun í TK6 er framkvæmd með því að nota fljótandi æti og 96 holu bakka (16. heimild).
39. Tríflúortýmíðin (TFT) er eina valvísu efnið sem mælt er með fyrir TK-stökkbrigði (61. heimild).
40. Að því er varðar MLA eru agarbakkar og örtítrunarbakkar taldir eftir 10–12 daga ræktun. Að því er varðar TK6 eru þyrpingar í örtítrunarbökkum taldar eftir 10–14 daga m.t.t. snemmframkominna stökkbrigða. Til þess að endurheimta hægvasandi (síðframkomin) TK6-stökkbrigði er nauðsynlegt að fódra frumurnar aftur með vaxtaræti og tríflúortýmíðinu (TFT) eftir talningu á snemmframkomnum stökkbrigðum og láta bakkana síðan standa í 7–10 daga til viðbótar (62. heimild). Sjá umfjöllun, sem varðar ákvörðun á heildarfjölda hægvasandi TK-stökkbrigða og TK-stökkbrigða sem vaxa á eðlilegan hátt, í 42. og 44. lið.
41. Viðeigandi útreikningar fyrir prófanirnar tvær, þ.m.t. aðferðirnar tvær (agar- og örtítrunarbakkar) að því er varðar MLA, eru í 2. viðbæti. Að því er varðar agar aðferðina í MLA eru þyrpingarnar taldar og fjöldi stökkbreyttra þyrpinga aðlagður með klónunarhæfninni til að reikna út tíðni stökkbrigða (MF). Að því er varðar örtítrunarbakkauýtferðir af MLA og TK6 er klónunarhæfni, bæði fyrir valbakka og klónunarhæfnibakka, ákvörðuð samkvæmt Poisson-dreifingunni (63. heimild). Tíðni stökkbrigða (MF) er reiknuð út frá þessari tvenns konar klónunarhæfni.

**Lýsing á eiginleikum stökkbreyttra þyrpinga**

42. Að því er varðar MLA, ef prófunariðefni gefur jákvæðar niðurstöður (sjá 62.–63. lið), skal gera lýsingu á eiginleikum þyrpingarinnar með því að ákveða stærð þyrpinga eða vöxt a.m.k. í einni af prófunarræktunum (yfirleitt þar sem ásætlanlegur jákvæður styrkur er hæstur) og í neikvæðu og jákvæðu samanburðunum. Ef prófunarefnið gefur neikvæðar niðurstöður (sjá 64. lið) skal gera lýsingu á eiginleikum stökkbreyttra þyrpinga í neikvæðu og jákvæðu samanburðunum. Að því er varðar örtítrunarbakkauýtferð MLA eru stökkbrigði sem mynda litlar þyrpingar skilgreind sem þau sem ná yfir minna en 25% af þvermáli holunnar og stökkbrigði sem mynda stórar þyrpingar sem þau sem ná yfir meira en 25% af þvermáli holunnar. Að því er varðar agarbakkaaðferðina er notaður sjálfvirkur þyrpingateljari til að telja stökkbreyttar þyrpingar og ákveða stærð þyrpinga. Aðferðum til að ákveða stærð þyrpingar er lýst í heimildunum (19., 38. og 40. heimild). Þörf er á lýsingu á eiginleikum þyrpingar í neikvæðu og jákvæðu samanburðunum til að sýna fram á að rannsóknir séu gerðar á fullnægjandi hátt.
43. Ekki er hægt að ákvarða að prófunariðefni sé neikvætt ef hvorki stökkbrigði sem mynda litlar þyrpingar né stökkbrigði sem mynda stórar þyrpingar greinast á fullnægjandi hátt í jákvæða samanburðinum. Hægt er að nota lýsingu á eiginleikum þyrpingar til að veita almennar upplýsingar er varða getu prófunariðefnis til að valda punktbreytingum og/eða atburðum í litningum (4. liður).
44. TK6: Mismunandi ræktunartími (sjá 40. lið) aðgreinir stökkbrigði sem vaxa á eðlilegan hátt og hægvasandi stökkbrigði. Að því er varðar TK6 eru yfirleitt bæði snemmframkomin og síðframkomin stökkbrigði talin í öllum ræktum, þ.m.t. í neikvæðum og jákvæðum samanburðum. Þörf er á lýsingu á eiginleikum þyrpingar í neikvæðu og jákvæðu samanburðunum til að sýna fram á að rannsóknir séu gerðar á fullnægjandi hátt. Ekki er hægt að ákvarða að prófunariðefni sé neikvætt ef hvorki snemmframkomin né síðframkomin stökkbrigði greinast á fullnægjandi hátt í jákvæða samanburðinum. Hægt er að nota lýsingu á eiginleikum þyrpingar til að veita almennar upplýsingar er varða getu prófunariðefnis til að valda punktbreytingum og/eða atburðum í litningum (4. liður).



**Hæfni rannsóknarstofunnar**

45. Rannsóknarstofan skal hafa framkvæmt röð tilrauna með jákvæðum viðmiðunarefnum í mismunandi gangvirkjum (að lágmarki eitt virkt með og eitt virkt án efnaskiptavirkjunar sem eru valin úr efnunum sem eru skráð í töflu 1) og mismunandi neikvæðum samanburðum (þ.m.t. ómeðhöndlaðar ræktir og mismunandi leysar/burðarefni) til að sýna fram á að nægileg reynsla sé af prófuninni áður en hún er notuð í venjubundnar prófanir. Svaranirnar í þessum jákvæðu og neikvæðu samanburðum skulu vera í samræmi við heimildir. Þessi krafa á ekki við um rannsóknarstofur sem þegar hafa reynslu, þ.e. hafa tiltæka grunna með rannsóknarsögulegum gögnum eins og skilgreint er í 47.–50. lið. Að því er varðar MLA ættu gildin, sem fást fyrir bæði jákvæða og neikvæða samanburði, að vera í samræmi við ráðleggingar IWGT (sjá töflu 2).
46. Kanna skal nokkur valin jákvæð samanburðarefni (sjá töflu 1) með stuttum og löngum meðhöndlunum (ef langar meðhöndlunir eru notaðar) án efnaskiptavirkjunar og einnig með stuttri meðhöndlun að viðbætti efnaskiptavirkjun til að sýna fram á hæfni við greiningu á stökkbreytandi íðefnum, ákvarða skilvirkni efnaskiptavirkjunarkerfisins og sýna fram á hversu viðeigandi skilyrðin til frumuvaxtar eru meðan á meðhöndlun stendur, við svipfarstjáníningu og við val á stökkbrigðum og hversu viðeigandi talningaradferðirnar eru. Velja skal styrksvið völdu efnanna þannig að það fáiast samanburðarnákvæmar og styrktengdar aukningar sem eru hærri en bakgrunnsgildið til að sýna fram á næmi og styrksvið prófunarkerfisins.

**Rannsóknarsöguleg samanburðargögn**

47. Rannsóknarstofan skal ákvarða:
- svið og dreifingu jákvæðs samanburðar samkvæmt rannsóknarsögu,
  - svið og dreifingu neikvæðs samanburðar (ómeðhöndlað, leysir) samkvæmt rannsóknarsögu.
48. Þegar gagna er fyrst aflað um rannsóknarsögulega dreifingu neikvæða samanburðarins skulu samskeiða, neikvæðir samanburðir vera í samræmi við birt neikvæð viðmiðunargögn. Þegar fer að bætast við af tilraunagögnum um dreifingu samanburðarins skal samskeiða neikvæði samanburðurinn helst haldast innan 95% stýrimarka þeirrar samanburðadreifingar (64.–65. heimild).
49. Rannsóknarsögulegur gagnagrunnur rannsóknarstofunnar um neikvæðan samanburð ætti í upphafi að byggjast á 10 tilraunum að lágmarki en æskilegra væri að hann samanstæði af a.m.k. 20 tilraunum sem eru gerðar við sambærileg tilraunaskilyrði. Rannsóknarstofur skulu nota gæðastýringaraðferðir s.s. stýririt (t.d. „C-charts, X-bar charts“ (65. heimild)) til að greina hversu breytileg viðmiðunargögn þeirra um jákvæða og neikvæða samanburði eru og til að sýna að stjórnun aðferðanna á rannsóknarstofunni sé í lagi (66. heimild). Nánari upplýsingar og ráðleggingar um hvernig á að byggja upp og nota rannsóknarsöguleg gögn er að finna í heimildunum (64. heimild).
50. Gögn um neikvæða samanburði skulu samanstanda af tíðni stökkbrigða úr stakri rækt eða helst samhliða ræktum, eins og lýst er í 27. lið. Samskeiða neikvæðir samanburðir skulu helst haldast innan 95% stýrimarka samanburðadreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gagnagrunni rannsóknarstofunnar um neikvæða samanburði. Ef gögn um neikvæðan samanburð lenda utan 95% stýrimarka getur þó verið ásætlanlegt að hafa þau með í rannsóknarsögulegri samanburðadreifingu að því tilskildu að gögnin séu ekki mjög miklir einfarar, að það séu sannanir fyrir því að stjórnun prófunarkerfisins sé í lagi (sjá 49. lið) og það eru engin merki um tæknileg eða mannleg mistök.
51. Allar breytingar á aðferðarlýsingu tilraunar skulu gerðar með tilliti til samræmis gagnanna við fyrirliggjandi rannsóknarsögulegan gagnagrunn rannsóknarstofunnar um samanburði. Allt verulegt ósamræmi skal hafa í för með sér stofnun nýs rannsóknarsögulegs gagnagrunns um samanburði.

## GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

**Framsetning niðurstaðna**

52. Framsetning gagna fyrir bæði MLA og TK6 skal innihalda, bæði fyrir meðhöndlaðar ræktir og samanburðarræktir, gögn sem þarf til að reikna út frumueiturhrif (hlutfallslegan heildarvöxt (RTG) eða hlutfallslega lifun (RS), eftir því sem við á) og tíðni stökkbrigða eins og lýst er hér á eftir.
53. Að því er varðar MLA skal leggja fram gögn um hverja rækt fyrir sig um hlutfallslegan svifblönduvöxt (RSG), hlutfallslegan heildarvöxt (RTG), klónunarhæfni þegar stökkbrigðin eru valin og fjölda stökkbreyttra þyrpinga (fyrir agarbakkauýtærsluna) eða fjölda tómra hola (fyrir örtírunarbakkauýtærsluna). Tíðni stökkbrigða (MF) skal gefin upp sem fjöldi stökkbreyttra frumna á móti milljón eftirlifandi frumna. Ef svörunin er jákvæð skal gefa upp tíðni stökkbrigða (MF) í litlum og stórum þyrpingum (og/eða hundraðshluta samanlagðrar tíðni stökkbrigða) fyrir a.m.k. einn styrkleika prófunariðfnisins (yfirleitt hæsta jákvæða styrkinn) og neikvæða og jákvæða samanburði. Ef um er að ræða neikvæða svörun skal gefa upp tíðni stökkbrigða (MF) í litlum og stórum þyrpingum fyrir neikvæða samanburðinn og jákvæða samanburðinn.
54. Að því er varðar TK6 skal leggja fram gögn um hverja rækt fyrir sig um hlutfallslega lifun (RS), klónunarhæfni þegar stökkbrigðin eru valin og fjölda tómra hola fyrir snemmförkomin og síðförkomin stökkbrigði. Tíðni stökkbrigða (MF) skal gefin upp sem fjöldi stökkbreyttra frumna af fjölda eftirlifandi frumna og skal innihalda samanlagða tíðni stökkbrigða sem og tíðni stökkbrigða (og/eða hundraðshluta samanlagðrar tíðni stökkbrigða) í snemmförkominum og síðförkominum stökkbrigðum.

**Viðmiðanir fyrir ásættanleika**

55. Að því er varðar bæði MLA og TK6 skulu eftirfarandi viðmiðanir uppfylltar áður en heildarniðurstöður fyrir tiltekið prófunariðefni eru ákvarðaðar:
- Tvenns konar tilraunaskilyrði (meðhöndlun í skamman tíma með og án efnaskiptavirkjunar, sjá 33. lið) voru notuð nema annað þeirra hafi leitt til jákvæðra niðurstaðna.
  - Nægilegur fjöldi frumna og styrkleika skal vera greinanlegur (sjá 27. og 34.–36. lið).
  - Viðmiðanirnar fyrir valinu á hæsta styrkleika eru í samræmi við það sem lýst er í 28.–30. lið.

*Viðmiðanir fyrir ásættanleika fyrir neikvæða og jákvæða samanburði*

56. Greining MLA-sérfræðingahópsins á vegum IWGT á miklu magni af MLA-gögnum leiddi til alþjóðlegs samkomulags um sértækar viðmiðanir fyrir ásættanleika MLA (1.–5. heimild). Þessi prófunaraðferð felur því í sér tilteknar ráðleggingar að því er varðar að ákvarða ásættanleika neikvæðra og jákvæðra samanburða og að því er varðar að meta einstakar niðurstöður um efni í MLA. TK6 er með mun minni gagnagrunn og hefur ekki verið metin af hálfu vinnuhóps.
57. Að því er varðar MLA skal meta hverja tilraun með tilliti til þess hvort ómeðhöndlaður samanburður/samanburður með leysi uppfyllir viðmiðanir MLA-vinnuhópsins á vegum IWGT um ásættanleika ((4. heimild) og tafla 2 hér á eftir) fyrir: 1) tíðni stökkbrigða (MF) (veita skal því athygli að ásættanleg tíðni stökkbrigða samkvæmt IWGT er mismunandi fyrir agar- og örtírunarbakkauýtærslurnar af MLA), 2) klónunarhæfni (CE) þegar stökkbrigðin eru valin og 3) svifblönduvöxt (SG) fyrir samanburð með leysi (sjá formúlur í 2. viðbæti).

Tafla 2

**Viðmiðanir fyrir ásættanleika fyrir MLA**

Mælipáttur	Aðferð með mjúkum agar	Örtírunarbakkauýtærð
Tíðni stökkbrigða	35–140 × 10 <sup>-6</sup>	50–170 × 10 <sup>-6</sup>
Klónunarhæfni	65–120%	65–120%
Svifblönduvöxtur (SG)	8–32-faldur (3.–4. klst. meðhöndlun) 32–180-faldur (24. klst. meðhöndlun, ef hún er gerð)	8–32-faldur (3.–4. klst. meðhöndlun) 32–180-faldur (24. klst. meðhöndlun, ef hún er gerð)

58. Í MLA skal einnig meta hverja prófun með tilliti til þess hvort jákvæður samanburður/jákvæðir samanburðir uppfylla a.m.k. aðra af tveimur eftirfarandi viðmiðunum fyrir ásættanleika sem vinnuhópur IWGT þróaði:
- Jákvæður samanburður skal sýna óvefengjanlega aukningu á samanlagðri tíðni stökkbrigða (MF), þ.e. aukningu sem er meiri en tíðni sjálfsprottinna bakgrunnsstökkbrigða [tíðni framkallaðra stökkbrigða (IMF)] sem nemur a.m.k.  $300 \times 10^{-6}$ . Að minnsta kosti 40% af tíðni framkallaðra stökkbrigða (IMF) skulu endurspeglast í tíðni stökkbrigða (MF) í litlu þyrpingunni.
  - Jákvæði samanburðurinn sýnir aukningu á tíðni stökkbrigða (MF) í litlu þyrpingunni a.m.k.  $150 \times 10^{-6}$  sem er meiri en sú sem sést í samskeiða ómeðhöndluðum samanburði/samanburði með leysi (tíðni framkallaðra stökkbrigða (IMF) í litlu þyrpingunni nemur  $150 \times 10^{-6}$ ).
59. Að því er varðar TK6 telst prófun ásættanleg ef samskeiða neikvæði samanburðurinn er talinn ásættanleg viðbót við rannsóknarsögulegan gagnagrunn rannsóknarstofunnar um neikvæðan samanburð, eins og lýst er í 48.–49. lið. Samskeiða jákvæðir samanburðir (sjá 32. lið) skulu þar að auki vekja svananir sem eru sambærilegar við þær sem er aflað í rannsóknarsögulega gagnagrunninum um jákvæðan samanburð og valda tölfraðilega marktækri aukningu miðað við samskeiða neikvæða samanburðinn.
60. Að því er varðar báðar prófanir skulu efri mörk frumueiturhrifa sem koma fram í jákvæðu samanburðarræktinni vera þau sömu og í tilraunarræktunum. Það er að segja, hlutfallslegur heildarvöxtur (RTG)/hlutfallsleg lifun (RS) skal ekki vera undir 10%. Það er nóg að nota einn styrkleika (eða einn af styrkleikum í jákvæðu samanburðarræktunum ef fleiri en einn styrkleiki er notaður) til að sýna fram á að viðmiðanir fyrir ásættanleika fyrir jákvæða samanburðinn hafa verið uppfylltar. Enn fremur verður tíðni stökkbrigða (MF) í jákvæða samanburðinum að vera innan ásættanlegs sviðs sem er fastsett fyrir rannsóknarstofuna.

### Mat og túlkun á niðurstöðum

61. Að því er varðar MLA hefur sérfræðingahópurinn á vegum IWGT um eitilæxli músa (e. *The Mouse Lymphoma Expert Workgroup*) (4. heimild) unnið mikilvægt starf varðandi líffræðilegt mikilvægi og viðmiðanir fyrir jákvæða svörun. Þessi prófunaraðferð felur því í sér tiltekna ráðleggingar að því er varðar túlkun á niðurstöðunum um prófunaríðefni úr MLA (sjá 62.–64. lið) TK6 er með mun minni gagnagrunn og hefur ekki verið metin af hálfu vinnuhóps. Ráðleggingarnar að því er varðar túlkunina á gögnunum fyrir TK6 eru því almennari (sjá 65.–66. lið). Viðbótarráðleggingar gilda um báðar prófanirnar (sjá 67.–71. lið)

### MLA

62. Mælt er með aðferð til að skilgreina jákvæða og neikvæða svörun til að tryggja að aukin tíðni stökkbrigða (MF) sé líffræðilega mikilvæg. Í stað tölfraðilegrar greiningar, sem er almennt notuð fyrir aðrar prófanir, byggir hún á notkun fyrirframskilgreindrar tíðni framkallaðra stökkbrigða (þ.e. aukningu á tíðni stökkbrigða (MF) yfir samskeiða samanburðinn), sem nefnist altækur matsstuðull (e. *Global Evaluation Factor* (GEF)), sem byggist á greiningu á gögnum frá rannsóknarstofum, sem taka þátt (4. heimild), um dreifingu á tíðni stökkbrigða í neikvæða samanburðinum. Að því er varðar agarbakkaútgáfuna af MLA er altækur matsstuðull (GEF)  $90 \times 10^{-6}$  og að því er varðar örtírunarbakkaútfærsluna af MLA er altækur matsstuðull (GEF)  $126 \times 10^{-6}$ .
63. Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefni talið valda greinilegri jákvæðri svörun, við einhver af tilraunaskilyrðunum sem eru skoðuð (sjá 33. lið), ef aukning á tíðni stökkbrigða (MF) yfir samskeiða bakgrunninn fer yfir altæka matsstuðulinn (GEF) og aukningin er styrktengd (t.d. með notkun leitniþrófunar). Þá er litið svo á að prófunaríðefnið geti vakið stökkbreytingu í þessu prófunarkerfi.
64. Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefni talið valda greinilegri neikvæðri svörun við öll tilraunaskilyrðin sem eru skoðuð (sjá 33. lið), ef það er engin styrktengd svörun eða, ef það er aukning á tíðni stökkbrigða (MF), aukningin fer ekki yfir altæka matsstuðulinn (GEF). Þá er litið svo á að prófunaríðefnið geti ekki vakið stökkbreytingar í þessu prófunarkerfi.

## TK6

65. Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefnið talið valda greinilegri jákvæðri svörun, við einhver af tilraunaskilyrðunum sem eru skoðuð (sjá 33. lið), ef:

- að minnsta kosti einn prófunarstyrkleikanna sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,
- aukningin er styrktengd í mati með viðeigandi leitniþrófun (sjá 33. lið),
- einhver niðurstaðnanna lendir utan dreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gögnum um neikvæða samanburði (t.d. 95% stýrimörk fyrir samanburð byggð á Poisson; sjá 48. lið).

Ef allar þessar viðmiðanir eru uppfylltar er litið svo á að prófunaríðefnið geti vakið stökkbreytingu í þessu prófunarkerfi. Ráðleggingar um hvaða tölfræðiaðferðir eiga best við er að finna í heimildum (66.–67. heimild).

66. Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefnið talið valda greinilegri neikvæðri svörun, við einhver af tilraunaskilyrðunum sem eru skoðuð (sjá 33. lið), ef:

- enginn prófunarstyrkleikanna sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,
- það er engin styrktengd aukning í mati með viðeigandi leitniþrófun,
- allar niðurstöðurnar lenda innan dreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gögnum um neikvæða samanburði (t.d. 95% stýrimörk fyrir samanburð byggð á Poisson; sjá 48. lið).

Þá er litið svo á að prófunaríðefnið geti ekki vakið stökkbreytingar í þessu prófunarkerfi.

*Fyrir bæði MLA og TK6:*

67. Ef hámarksstyrkur grundvallast á frumueiturhrifum ætti hæsti styrkurinn að miða að því að ná milli 20 og 10% af hlutfallslegum heildarvexti (RTG)/hlutfallslegri lifun (RS). Samkomulag er um að sýna skuli varkárni við túlkun jákvæðra niðurstaðna sem er eingöngu að finna á bilinu 20 og 10% af hlutfallslegum heildarvexti (RTG)/hlutfallslegri lifun (RS) og niðurstaða myndi ekki teljast jákvæð ef aukning á tíðni stökkbrigða (MF) á sér einungis stað við eða undir 10% hlutfallslegum heildarvexti (RTG)/hlutfallslegri lifun (RS) (ef það er metið) (2. og 59. heimild).

68. Við vissar kringumstæður geta viðbótarupplýsingar hjálpað til við að ákvarða að prófunaríðefni sé ekki stökkbreytandi ef engin rækt sýnir gildi hlutfallslegs heildarvaxtar (RTG) á bilinu 10–20% hlutfallslegur heildarvöxtur (RTG)/hlutfallsleg lifun (RS). Þessum aðstæðum er lýst sem hér segir: 1) það eru engar vísbendingar um stökkbreytandi hrif (t.d. engin tengsl milli skammts og svörunar, tíðni stökkbrigða fer ekki yfir þá tíðni sem sést í samskeiða neikvæðum samanburði eða sögulegu bakgrunnssviði o.s.frv.) í röð gagnapunkta innan 100% til 20% hlutfallslegs heildarvaxtar (RTG)/hlutfallslegrar lifunar (RS) og það er a.m.k. einn gagnapunktur á bilinu 20 til 25% RTG/RS. 2) það eru engar vísbendingar um stökkbreytandi hrif (t.d. engin tengsl milli skammts og svörunar, tíðni stökkbrigða fer ekki yfir þá tíðni sem sést í samskeiða neikvæðum samanburði eða sögulegu bakgrunnssviði o.s.frv.) í röð gagnapunkta á bilinu 100% til 25% hlutfallslegs heildarvaxtar (RTG)/hlutfallslegrar lifunar (RS) og það er einnig neikvæður gagnapunktur lítilliga undir 10% RTG/RS. Við báðar þessar aðstæður má draga þá ályktun að prófunaríðefnið sé neikvætt.

69. Ekki er gerð krafa um sannþrófun á skýrri, jákvæðri eða neikvæðri svörun.

70. Ef svörunin er hvorki greinilega neikvæð né greinilega jákvæð, eins og lýst er hér á undan, eða til að auðvelda ákvörðun á líffræðilegu mikilvægi niðurstöðu, skulu gögnin metin samkvæmt sérfræðiáliti og/eða frekari rannsóknir gerðar. Það getur verið gagnlegt að gera endurtekna tilraun, mögulega með því að nota breytt tilraunaskilyrði [t.d. styrkleikabil til að auka líkurnar á því að fá gagnapunkta innan 10–20% sviðs hlutfallslegs heildarvaxtar (RTG)/hlutfallslegrar lifunar (RS) önnur skilyrði efnaskiptavirkjunar (þ.e. styrk eða uppruna S9) og lengd meðhöndlunar].

71. Í örfáum tilvikum gefa gögnin ekki kost á ályktunum um jákvæðar eða neikvæðar niðurstöður, jafnvel eftir frekari rannsóknir. Því er ályktað að svörun prófunaríðfnisins sé tvíræð (túlkuð þannig að hún er jafnlíkleg til að vera jákvæð eða neikvæð).

#### PRÓFUNARSKÝRSLA

72. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

##### *Prófunaríðefni:*

- uppruni, lotunúmer, síðasti notkunardagur, ef hann liggur fyrir,
- stöðugleiki prófunaríðfnisins, ef hann er þekktur.
- leysni og stöðugleiki prófunaríðfnisins í leysinum, ef þekkt,
- mæling á sýrustigi, osmólalstyrk og botnfellingu í ræktunarætinu sem prófunaríðfninu var bætt í, eins og við á.

##### Efni með einum efnisþætti:

- útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,
- efnafræðileg sanngreining, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.

##### Fjölpáttæfni, UVCB-efni og blöndur:

- lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.

##### *Leysir:*

- rök fyrir vali á leysi,
- hundraðshluti leysis í lokaræktunarætinu.

##### *Frumur:*

##### Fyrir móðurræktir á rannsóknarstofu:

- gerð og uppruni frumna og saga hjá prófunarstofunni,
- einkenni kjarngerðarinnar og/eða eðlilegur fjöldi litninga
- aðferðir til að viðhalda frumuræktum,
- upplýsingar um að frurnar séu ekki smitaðar berfrymingum,
- tvöföldunartími frumna.

##### *Prófunarskýrði:*

- rök fyrir vali á þeim styrkleikum og fjölda frumurækta sem eru notuð, t.d. gögn um frumueiturhrif og takmarkanir á leysni,

- samsetning ræktunarætis, styrkur CO<sub>2</sub>, rakastig,
- styrkleiki prófunaríðfnisins, gefinn upp sem lokastyrkur í ræktunarætinu (t.d. í µg eða mg/ml eða mM af ræktunaræti),
- styrkleiki (og/eða rúmmál) leysis og prófunaríðfnis sem er bætt í ræktunarætið,
- ræktunarhiti,
- ræktunartími,
- lengd meðhöndlunar,
- þéttleiki frumna við meðferð,
- gerð og samsetning efnaskiptavirkjunarkerfisins (uppruni S9, tilreiðsluaðferð S9-blöndunnar, styrkleiki eða rúmmál S9-blöndunnar og S9 í lokaræktunarætinu, gæðaeftirlit með S9),
- jákvæð og neikvæð samanburðarefni, lokastyrkleiki við öll meðhöndlunarskilyrði,
- lengd tjáningartíma (m.a. fjöldi frumna sem er sáð, undirráktir og áætlanir um næringargjöf, ef við á),
- auðkenni valvísu efnisins og styrkleikar þess,
- tilgreina skal útfærslu af MLA sem er notuð (agar- eða örtúrunarbakki),
- viðmiðanir fyrir ásættanleika prófananna,
- aðferðir sem eru notaðar til að finna fjölda lífvænlegra og stökkbreyttra frumna,
- aðferðir sem eru notaðar við mælingar á frumueiturhrifum,
- allar viðbótarupplýsingar sem skipta máli varðandi frumueiturhrif og aðferðina sem er notuð,
- tímalengd ræktunar eftir sáningu,
- skilgreining á þyrpingum þar sem stærð og gerð eru lögð til grundvallar (m.a. viðmiðanir fyrir „litlar“ og „stórar“ þyrpingar, eftir því sem við á),
- viðmiðanir til að meta hvort niðurstöður rannsókna séu jákvæðar, neikvæðar eða tvíræðar,
- aðferðir sem eru notaðar til að ákvarða sýrustig, osmólalstyrk, ef það er gert, og útfellingu, ef við á.

*Niðurstöður:*

- fjöldi frumna í hverri rækt sem eru meðhöndlaðar og fjöldi frumna í hverri rækt sem eru afræktaðar,
- mælipættir fyrir eiturrhrif (hlutfallslegur heildarvöxtur (RTG) fyrir MLA og hlutfallsleg lifun (RS) fyrir TK6),
- merki um útfellingu og hvenær hún er ákvörðuð,
- fjöldi frumna sem er sáð í æti með valvísu efninu og í æti sem er ekki með valvísu efninu,

- fjöldi þyrpinga í ætinu með valvísa efninu og fjöldi þyrpinga í ætinu sem er ekki með valvísa efninu og tengd tíðni stökkbrigða,
- stærð þyrpinga ákveðin í neikvæðum og jákvæðum samanburðum og, ef prófunaríðefnið gefur jákvæða niðurstöðu, í a.m.k. einum styrkleika, og tengd tíðni stökkbrigða,
- tengsl milli styrks og svörunar, ef unnt er,
- gögn um samskeiða, neikvæðan (leysir) og jákvæðan samanburð (styrkleikar og leysar),
- söguleg gögn um neikvæðan samanburð (leysir) og jákvæðan samanburð (styrkleikar og leysar) með styrkbilum, meðaltali og staðalfrávikum; fjöldi prófana sem sögulegi samanburðurinn byggist á,
- tölfræðilegar greiningar (fyrir stakar ræktir og safnsýni samhliða prófunar, ef við á) og p-gildi, ef þau liggja fyrir, og mat á altækum matsstuðli (GEF) fyrir MLA.

#### *Um fjöllum um niðurstöðurnar*

#### *Niðurstaða*

#### **HEIMILDIR**

- 1) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185-190.
- 2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292-299.
- 3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127-140.
- 4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1-5.
- 5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36-40.
- 6) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

- 7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. *Mutation Res.*, 746 (1): 21-28.
- 8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. *Mutation Res.*, 493 (1-2): 101-114.
- 9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol. Sci.*, 109 (1): 96-105.
- 10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. *Proc. National. Academy. Sci. USA*, 87 (1): 51-55.
- 11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/TK<sup>+/-</sup> Leads to TK<sup>-/-</sup> Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, *Mutation Res.*, 84 (1): 169-181.
- 12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y TK<sup>-/-</sup> Mutants Early in their Clonal History, *Mutation Res.*, 147 (5): 237-242.
- 13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFT<sup>r</sup>) Mutants of L5178Y/TK<sup>+/-</sup> Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151 (1): 161-174.
- 14) Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation Res.*, 178 (1): 143-153.
- 15) Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 18 (1): 77-87.
- 16) Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation Res.*, 374 (1): 89-98.
- 17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. *Mol. Carcinogen.*, 28 (4): 203-14.
- 18) Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. *Mutation Res.*, 267 (1): 89-95.
- 19) Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y TK<sup>+/-</sup> -3.7.2C) Forward Mutation Assay. In *Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.)*, Springer Protocols, Humana Press: 27-50.
- 20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. and Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, *Mutation Res.*, 634 (1-2): 177-183.
- 21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutagen.*, 49 (6): 439-452.
- 22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. *Environ. Mutagen.*, 8 (6): 879-886.



- 23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268 (2): 297-305.
- 24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257: 147-204.
- 25) Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. *Mutation Res.*, 626 (1-2): 185-190.
- 26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. *Ann. N.Y. Academy Sci.*, 76: 673-680.
- 27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK<sup>+/-</sup> Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutation Res.*, 59(1): 61-108.
- 28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK<sup>+/-</sup> 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 147 (5): 243-253.
- 29) Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK<sup>+/-</sup> Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 214 (2): 181-193.
- 30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y TK<sup>+/-</sup>-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (2): 127-131.
- 31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y TK<sup>+/-</sup> Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, *Environ. Mol. Mutagen.*, 55 (1): 35-42.
- 32) Storer, R.D., Jaynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y TK<sup>+/-</sup> Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. *Mutation Res.*, 373 (2): 157-165.
- 33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. *Mutagen.*, 19 (4): 263-268.
- 34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 84 (2): 411-416.
- 35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45 (2-3): 162-176.
- 36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. *Cancer Res.*, 55 (1): 12-15.
- 37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Handrit í vinnslu).

- 38) Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.
- 39) Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. Í: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z and Caldwell(Eds), 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.
- 40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. *Mutation Res.*, 94 (2): 467-485.
- 41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. *ATLA*, 33 (3): 261-287.
- 42) Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, *Mutation Res.*, 104 (4-5): 287-294.
- 43) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31 (6): 347-364.
- 44) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113 (3-4): 173-215.
- 45) Natarajan, A.T., Bates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37 (1): 83-90.
- 46) Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. *Mutation Res.*, 66 (3): 277-290.
- 47) Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4 (1): 55-65
- 48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagen.*, 7 (3): 175-177.
- 49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, bls. 85–88.
- 50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312 (3): 241-261.
- 51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28 (1): 51-59.
- 52) UNEP (2001). Stokkhólmssamningur um þrávirk lífræn efni, Umhverfisstofnun Sameinuðu þjóðanna.

- 53) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. Í: Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L. and Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, bls. 91-103.
- 54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5 (6): 795-801.
- 55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122-130.
- 56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. Í: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), Cambridge University Press, bls. 66-101.
- 57) Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32-56.
- 58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36-43.
- 59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Aðgengilegt á: [<https://www.federalregister.gov/a/2012-13774>].
- 60) Honma M. and Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373-384.
- 61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient (TK<sup>-/-</sup>) Mutants from L5178Y/TK<sup>+/-</sup> Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363-378.
- 62) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9-17.
- 63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): 1-8.
- 64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87-90.
- 65) Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.
- 66) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 199.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 67) Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

*I. viðbætur*

## SKILGREININGAR

**Efni sem veldur mislitnun:** Öll íðefni eða ferli sem hafa í för með sér mislitnun í frumum eða lífverum með því að víxlverka á þætti á jafnskiptingar- og rýriskiptingarstigi frumuskiptingar.

**Mislitnun:** Öll frávik frá eðlilegum fjölda tvílitna (eða einlitna) litninga sem nema einum eða fleiri litningum en ekki ef um er að ræða heilt sett eða heil sett litninga (fjöllitnun).

**Stökkbreytivaldur sem veldur basaskiptum:** Íðefni sem valda því að skipti verða á basapörum í DNA-sameindinni.

**Íðefni:** Efni eða blanda.

**Klónunarhæfni:** Hlutfall frumna sem er sáð í litlum þéttleika og geta vaxið til að mynda þyrpingu sem hægt er að telja.

**Efni sem veldur litningabrenglun:** Öll íðefni eða ferli sem valda byggingarlegum litningabreytingum í frumuhópum eða hópum lífvera.

**Frumueiturhrif:** Að því er varðar greiningar sem falla undir þessa prófunaraðferð eru frumueiturhrif greind sem minnkun á hlutfallslegum heildarvexti (RTG) eða hlutfallslegri lifun (RS) í MLA og TK6, eftir því sem við á.

**Frumstökkbreyting:** Genastökkbreyting frá foreldragerð í stökkbrigði sem veldur því að ensímvirkni eða hlutverk táknaða prótínsins breytist eða glatast.

**Fasabreytandi efni:** Íðefni sem valda því að eitt eða nokkur basapör bætast við í DNA-sameindinni eða falla brott úr henni.

**Erfðaeiturhrif:** Almenn hugtak sem nær yfir allar gerðir skaða á DNA eða litningum, þ.m.t. DNA-rof, viðbætur, endurröðun, stökkbreytingar, litningabreytingar og mislitnun. Erfðaeiturhrif hafa ekki öll í för með sér stökkbreytingar eða stöðugar litningaskemmdir.

**Endurröðun í jafnskiptingu:** Meðan frumuskipting stendur yfir verður endurröðun milli samstæðra litningsþráða sem leiðir hugsanlega til vakningar á rofi DNA-tvíþátta eða til taps á arfblendni.

**Stökkbreytandi:** Veldur arfgengri breytingu á röð eða röðum DNA-basapara í litningum eða breytingu á byggingu litninga (litningabreytingum).

**Tíðni stökkbrigða (MF):** Fjöldi stökkbreyttra frumna deilt með fjölda lífvænlegra frumna.

**Svipfarstjáníningartími:** Tíminn sem er liðinn frá meðhöndlun þegar erfðafræðilega breytingin er fest í genamenginu og allar genaafurðir sem fyrir eru hverfa þannig að svipfarseinkennin breytast.

**Hlutfallsleg lifun (RS):** Hlutfallsleg lifun (RS) er notuð sem mælikvarði á meðhöndlunartengd frumueiturhrif. Hún er hlutfallsleg klónunarhæfni (CE) frumna sem er sáð strax að meðhöndlun lokinni, leiðrétt m.t.t. frumutaps í meðhöndlun samanborið við klónunarhæfni í neikvæðum samanburði.

**Hlutfallslegur svifblönduvöxtur (RSG):** Að því er varðar MLA er hlutfallslegur samanlagður svifblönduvöxtur (SG) í tvo daga í prófunarræktinni borinn saman við samanlagðan tveggja daga svifblönduvöxt í neikvæðum samanburði/samanburði með leysi (Clive og Spector, 1975). Hlutfallslegur svifblönduvöxtur (RSG) skal fela í sér hlutfallslegan vöxt prófunarræktarinnar samanborið við neikvæðan samanburð/samanburð með leysi á meðhöndlunartímabilinu.

**Hlutfallslegur heildarvöxtur (RTG):** Í MLA er hlutfallslegur heildarvöxtur (RTG) notaður sem mælikvarði á meðhöndlunartengd frumueiturhrif. Hann er mælikvarði á hlutfallslegan (samanborið við samanburð með burðarefni) vöxt prófunarræktarinnar meðan meðhöndlun stendur yfir, tjáningu í tvo daga og val á stökkbrigðum til klónunar í prófuninni. Hlutfallslegur svifblönduvöxtur (RSG) í hverri prófunarrækt er margfaldaður með hlutfallslegri klónunarhæfni prófunarræktarinnar þegar stökkbrigðin eru valin og tjáður í hlutfalli við klónunarhæfni neikvæðs samanburðar/samanburðar með leysi (Clive og Spector, 1975).

**S9-lifrarþættir:** Flot af lifrarjafningi eftir skiljun við 9000 g, þ.e. útdráttur úr hrárrí lifur.

**S9-blanda:** Blanda af S9-lifrarþættinum og hjálparþáttunum sem eru nauðsynlegir fyrir virkni efnaskiptaensíma.

**Svifblönduvöxtur (SG)** X-föld aukning á fjölda frumna meðan meðhöndlun stendur yfir og tjáningarfasar í MLA. Svifblönduvöxtur (SG) er reiknaður út með því að margfalda x-falda aukningu á degi 1 með x-faldri aukningu á degi 2 fyrir meðhöndlun í skamman tíma (3–4 klst.). Ef 24 klst. meðhöndlun er notuð er svifblönduvöxturinn (SG) x-föld aukning meðan 24 klst. meðhöndlunin stendur yfir margfölduð með x-faldri aukningu á tjáningardegi 1 og 2.

**Samanburður með leysi:** Almennt hugtak til útskýringar á samanburðarræktum sem í er eingöngu settur leysirinn sem er notaður til að leysa upp prófunaríðefnið.

**Prófunaríðefni:** Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

**Ómeðhöndlaður samanburður:** Ræktir sem eru ekki meðhöndlaðar (þ.e. hvorki með prófunaríðefni né leysi) en eru unnar samtímis og á sama hátt og ræktirnar sem prófunaríðefnið er sett í.

## 2. viðbætur

## FORMÚLUR

**Frumueiturhrif**

Fyrir báðar útfærslurnar (agar- og örtítrunarbakki) af MLA

Frumueiturhrif eru skilgreind sem hlutfallslegur heildarvöxtur (RTG), sem felur í sér hlutfallslegan svifblönduvöxt (RSG) á tveggja daga tjáningartímabilinu, og hlutfallsleg klónunarhæfni (RCE) sem fæst þegar stökkbrigðin eru valin. Hlutfallslegur heildarvöxtur (RTG), hlutfallslegur svifblönduvöxtur (RSG) og hlutfallsleg klónunarhæfni (RCE) eru öll gefin upp sem hundraðshluti.

**Útreikningur á hlutfallslegum svifblönduvexti (RSG):** Svifblönduvöxtur 1 ( $SG_1$ ) er vaxtarhraði milli dags 0 og dags 1 (frumstyrkur á degi 1/frumstyrkur á degi 0) og svifblönduvöxtur 2 ( $SG_2$ ) er vaxtarhraði milli dags 1 og dags 2 (frumstyrkur á degi 2/frumstyrkur á degi 1). Hlutfallslegur svifblönduvöxtur (RSG) er samanlagður svifblönduvöxtur ( $SG$ ) ( $SG_1 \times SG_2$ ) fyrir meðhöndluðu ræktunina, samanborið við ómeðhöndlaðan samanburð/samanburð með leysi. Þ.e.:  $RSG = [SG_{1(\text{prófun})} \times SG_{2(\text{prófun})}] / [SG_{1(\text{samanburður})} \times SG_{2(\text{samanburður})}]$   $SG_1$  skal reiknaður út frá upphaflegum frumstyrk sem er notaður við upphaf frummeðhöndlunar. Þetta gildir um öll mismunandi frumueiturhrif sem verða í prófunarrækt(um) meðan frummeðhöndlun stendur yfir.

Hlutfallsleg klónunarhæfni (RCE) er hlutfallsleg klónunarhæfni prófunarræktar, samanborið við hlutfallslega klónunarhæfni ómeðhöndlaðs samanburðar/samanburðar með leysi sem fæst þegar stökkbrigðin eru valin

**Hlutfallslegur heildarvöxtur (RTG):**  $RTG = RSG \times RCE$

TK6

**Hlutfallsleg lifun (RS):**

Frumueiturhrif eru metin með hlutfallslegri lifun, þ.e. klónunarhæfni (CE) frumna sem er sáð strax að meðhöndlun lokinni, leiðrétt m.t.t. frumutaps í meðhöndlun samanborið við klónunarhæfni í neikvæðum samanburðum (með 100% lifun). Leiðréttingu á frumutapi meðan meðhöndlun stendur yfir er hægt að reikna sem hér segir:

$$\text{Leiðrétt klónunarhæfni (CE)} = CE \times \frac{\text{Fjöldi frumna í lok meðhöndlunar}}{\text{Fjöldi frumna við upphaf meðhöndlunar}}$$

Hlutfallsleg lifun (RS) fyrir rækt sem er meðhöndluð með prófunarídegni er reiknuð út sem:

$$RS = \frac{\text{Leiðrétt klónunarhæfni (CE) í meðhöndlaðri rækt}}{\text{Leiðrétt klónunarhæfni (CE) í samanburði með leysi}} \times 100$$

**Tíðni stökkbrigða í bæði MLA og TK6:**

Tíðni stökkbrigða (MF) er klónunarhæfni stökkbreyttra þyrpinga í ætinu með valvísa efninu ( $CE_M$ ), leiðrétt með klónunarhæfninni í ætinu sem er ekki með valvísa efninu þegar stökkbrigðin eru valin ( $CE_V$ ). Það er,  $MF = CE_M / CE_V$ . Útreikningi á þessari tvenns konar klónunarhæfni er lýst hér á eftir fyrir klónunaraðferðir í agar- og örtítrunarbakka.

**Agarbakkauýtferlan af MLA:** Í útfærslu með mjúkum agar í MLA fæst fjöldi þyrpinga á bakkanum fyrir val á stökkbrigðum ( $C_M$ ) og fjöldi þyrpinga á bakkanum sem ekki er valið af eða fyrir klónunarhæfnina (líftala) ( $C_V$ ) með því að telja klónin beint. Þegar 600 frumum er sáð m.t.t. klónunarhæfni (CE) á bakkana fyrir val á stökkbrigðum ( $CE_M$ ) og á bakkana sem ekki er valið af eða fyrir klónunarhæfnina (líftala) ( $CE_V$ ) og  $3 \times 10^6$  frumur eru notaðar til að velja stökkbrigði,

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

**Örtítrunarbakkauýtferlan af MLA og TK6:** Í örtítrunarbakkauýtferlunni af MLA eru  $C_M$  og  $C_V$  ákvörðuð sem afurð úr örtítrunarbökkunum samanlagt (TW) og hugsanlegur fjöldi þyrpinga í hverri holu (P) á örtítrunarbökkunum.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Út frá núll-skilyrðinu í Poisson-dreifingunni (Furth et al., 1981) er P gefið upp með

$$P = -\ln (EW / TW)$$

þar sem EW eru tómar holur og TW eru samtals holur. Þar af leiðandi

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

Að því er varðar örtítrunarbakkauýtferluna af MLA er tíðni stökkbrigða sem mynda litlar þyrpingar og stökkbrigða sem mynda stórar þyrpingar reiknuð út á sama hátt og viðeigandi fjöldi af tónum holum notaður fyrir litlar og stórar þyrpingar.

Að því er varðar TK6 er tíðni stökkbrigða sem mynda litlar þyrpingar og stökkbrigða sem mynda stórar þyrpingar byggð á snemmförkomnum og síðförkomnum stökkbrigðum.

**B.68 PRÓFUNARAÐFERÐ Í GLASI MEÐ SKAMMVINNUM VÁHRIFUM TIL AÐ GREINA Í ÍÐEFNI SEM KALLA FRAM ALVARLEGAN AUGNSKAÐA OG II. ÍÐEFNI SEM EKKI ÞURFA FLOKKUN M.T.T. AUGNERTINGAR EÐA ALVARLEGS AUGNSKAÐA**

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 491 um prófanir (2017). Prófunaraðferð með skammvinnum váhrifum (STE-prófunaraðferðin) er aðferð í glasi sem hægt er að nota, við tiltekna aðstæður og með tilteknum takmörkunum, til hættuflokkunar og merkingar á íðefnum (efnum og blöndum) sem kalla fram alvarlegan augnskaða sem og á þeim sem hvorki þurfa flokkun m.t.t. alvarlegs augnskaða né augnertingar eins og skilgreint er í hnattsamræmdu kerfi Sameinuðu þjóðanna (SP) til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK) (1. heimild) og reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og þökkun efna og blandna (reglugerðin um flokkun, merkingu og þökkun) <sup>(1)</sup>.
2. Árum saman hefur möguleikinn á hættulegum áhrifum íðefna á augu aðallega verið metinn með því að nota prófun í lífi á kanínuaugum (prófunaraðferð B.5 (8. heimild), jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 405 um prófanir). Almenn er viðurkennt að í fyrirsjáanlegri framtíð geti engin ein staðgönguprófun í glasi komið að öllu leyti í stað prófunar í lífi á kanínuaugum til að spá fyrir um öll svörunarsvið alvarlegs augnskaða/augnertingar fyrir mismunandi íðefnaflokk. Stefnumiðaðar samsetningar staðgönguprófunaraðferða, sem eru notaðar innan (stigskiptrar) prófunaráætlunar, gætu þó komið að öllu leyti í stað prófunar á kanínuaugum (2. heimild). Ofansækin nálgun er hönnuð til prófunar á íðefnum sem búið er við, á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga, að hafi mikinn ertingarmátt eða kalli fram alvarlegan augnskaða. Á hinn bóginn er neðansækin nálgun hönnuð til prófunar á íðefnum sem búið er við, á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga, að valdi ekki nægilegri augnertingu til að þörf sé á flokkun. Þó að ekki sé litið á STE-prófunaraðferðina sem heildarvalkost í stað prófunar í lífi á kanínuaugum er hún hentug til notkunar sem hluti af stigskiptri prófunaráætlun vegna lögbundinnar flokkunar og merkingar, t.d. neðansækin nálgun/ofansækin nálgun, til að greina án frekari prófunar í íðefni sem kalla fram alvarlegan augnskaða (1. undirflokkur HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og þökkun) og ii. íðefni (að undanskildum mjög rokgjörnum efnum og öllum föstum íðefnum öðrum en yfirborðsvirkum efnum) sem þurfa ekki flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða (utan flokks í HSK SP/reglugerðinni um flokkun, merkingu og þökkun) (1.–2. heimild). Íðefni sem ekki er spáð að valdi alvarlegum augnskaða (1. undirflokkur HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og þökkun) eða er utan flokks í HSK SP/reglugerðinni um flokkun, merkingu og þökkun (kallar hvorki fram alvarlegan augnskaða né augnertingu) með STE-prófunaraðferðinni myndi þó þurfa viðbótarprófun til að ákveða endanlega flokkun. Enn fremur ætti að hafa samráð við viðeigandi eftirlitsyfirvöld áður en STE-prófunaraðferðin er notuð í neðansækinni nálgun samkvæmt öðrum flokkunarkerfum en HSK SP/reglugerðinni um flokkun, merkingu og þökkun. Val á prófunaraðferð sem á best við og notkun á þessari prófunaraðferð skal skoða í tengslum við leiðbeiningarskjal Efnahags- og framfarastofnunarinnar „Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation“ (14. heimild).
3. Tilgangurinn með þessari prófunaraðferð er að lýsa aðferðum sem eru notaðar til að meta möguleikann á hættulegum áhrifum prófunariðefnis á augu, byggt á getu þess til að kalla fram frumueiturhrif í prófunaraðferð með skammvinnum váhrifum. Frumueitrandi áhrif íðefna á frumur úr glæruþekju er mikilvægur verkunarháttur sem leiðir til skemmda á glæruþekjunni og augnertingar. Lífvænleiki frumna í STE-prófunaraðferðinni er metinn, eftir útdrátt úr frumunum, með meginlegrri mælingu á bláu formasansalti sem lifandi frumur framleiða með umbreytingu með ensímum á líflitnum MTT (3-(4,5-dímetylþíasól-2-ýl)-2,5-dífenýltetrasólíumbrómíð), einnig þekktur sem þíasólýl-blátt tetrasólíumbrómíð (3. heimild). Lífvænleiki frumna sem fæst er borinn saman við samanburð með leysi (hlutfallslegur lífvænleiki) og notaður til að meta möguleikann á að prófunariðefni sé hættulegt fyrir augu. Prófunariðefni er flokkað í 1. undirflokk HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og þökkun þegar styrkleikarnir 5% og 0,05% leiða báðir til lífvænleika frumna sem er minni en eða jafn og ( $\leq$ ) 70%. Á hinn bóginn er því spáð að íðefni sé utan flokks í HSK SP/reglugerðinni um flokkun, merkingu og þökkun þegar báðir styrkleikarnir 5% og 0,05% leiða til lífvænleika frumna sem er yfir ( $>$ ) 70%.
4. Heitið „prófunariðefni“ er notað í þessari prófunaraðferð til að vísa til þess sem er prófað og tengist ekki nothæfi STE-prófunaraðferðarinnar til prófunar á efnum og/eða blöndum. Skilgreiningar eru gefnar upp í viðbætinum.

ATRÍÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFNA Í HUGA Í UPPHAFI

5. Þessi prófunaraðferð byggist á aðferðarlýsingu, sem Kao Corporation (4. heimild) þróaði, sem fór í gegnum tvær mismunandi fullgildingarrannsóknir: aðra hjá *Validation Committee of the Japanese Society for Alternative to Animal Experiments* (fullgildingarnefnd japönsku samtakanna um annars konar aðferðir en tilraunir á dýrum (JSAAE)) (5. heimild)

<sup>(1)</sup> Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1272/2008 frá 16. desember 2008 um flokkun, merkingu og þökkun efna og blandna, um breytingu og niðurfellingu á tilskipunum 67/548/EBE og 1999/45/EB og um breytingu á reglugerð (EB) nr. 1907/2006 (Stjtið. EB L 353, 31.12.2008, bls. 1).



og hina hjá *Japanese Center for the Validation of Alternative Methods* (japanska miðstöðin um fullgildingu staðgöngu-aðferða) (JaCVAM) (6. heimild). NTP samræmingarstofnunin fyrir mat á eiturefnafræðilegum staðgönguaðferðum (NICEATM) og samræmingarnefnd stofnana um fullgildingu staðgönguaðferða (ICCVAM) framkvæmdu jafningjarýni á fullgildingarrannsóknarskýrslum og bakgrunnsskjölum vegna endurskoðunar á prófunaraðferðinni (7. heimild).

6. Þegar STE-prófunaraðferðin var notuð til að greina íðefni (efni og blöndur) sem kalla fram alvarlegan augnskaða (1. undirflokkur HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun) (1. heimild) sýndu gögn sem fengust með aðferðinni um 125 íðefni (þ.m.t. bæði efni og blöndur) heildarnákvæmni sem nemur 83% (104/125), hlutfall falsjávæðra niðurstaðna sem nemur 1% (1/86) og hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna sem nemur 51% (20/39), samanborið við prófun *í lifi* á kanínuaugum (7. heimild). Hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna sem fékkst er ekki mikilvægt í núverandi samhengi vegna þess að öll prófunariðefni, sem kalla fram lífvænleika frumna sem nemur  $\leq 70\%$  við 5% styrk og  $> 70\%$  við 0,05% styrk, myndu því næst verða prófuð með öðrum tilhlýðilega fullgiltum aðferðum til prófunar *í glasi* eða, sem síðasta valkost, með prófun *í lifi* á kanínuaugum, eftir því hvaða kröfur gilda samkvæmt reglum og í samræmi við raðprófunaráætlun og aðferðir með vægi rökstuddra vísbendinga sem er sem stendur mælt með (1. og 8. heimild). Aðallega voru prófuð efni með einum efnisþætti en þó er einnig til takmarkað magn gagna um prófanir á blöndum. Tæknilega séð telst prófunaraðferðin samt sem áður nothæf til prófunar á fjölpátaefnum og blöndum. Áður en þessi aðferð til prófunar á blöndu, sem er framkvæmd til að fá gögn sem fyrirhugað er að nota í eftirlitsskyni, er notuð skal þó skoðað hvort, og þá af hverju, hún gæti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi. Ekki er þörf á slíkri skoðun ef prófun á blöndunni er krafa af hálfu eftirlitsyfirvalda. STE-prófunaraðferðin sýndi ekki aðra sértæka annmarka þegar hún var notuð til að greina hvort prófunariðefni tilheyrðu 1. undirflokki HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun. Rannsakendur geta íhugað að nota þessa prófunaraðferð fyrir prófunariðefni og þá skal lífvænleiki frumna sem nemur  $\leq 70\%$  við bæði 5% og 0,05% styrk samþykktur sem vísbending um svörun sem kallar fram alvarlegan augnskaða sem ætti að flokkast í 1. undirflokk HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun án frekari prófana.
7. Þegar STE-prófunaraðferðin var notuð til að greina íðefni (efni og blöndur) sem þurfa ekki flokkun m.t.t. augneringar og alvarlegs augnskaða (þ.e. utan flokks í HSK SP/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun) sýndu gögn, sem fengust með aðferðinni, um 130 íðefni (þ.m.t. bæði efni og blöndur) heildarnákvæmni sem nemur 85% (110/130), hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna 12% (9/73) og hlutfall falsjávæðra niðurstaðna 19% (11/57) samanborið við prófun *í lifi* á kanínaugum (7. heimild). Ef mjög rokgjörn efni og föst efni, önnur en yfirborðsvirk efni, eru útilokuð úr gagnasafninu eykst heildarnákvæmni í 90% (92/102), hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna í 2% (1/54) og hlutfall falsjávæðra niðurstaðna í 19% (9/48) (7. heimild). Af því leiðir að mögulegur ágalli á STE-prófunaraðferðinni, þegar hún er notuð til að greina prófunariðefni sem þurfa ekki flokkun m.t.t. augneringar og alvarlegs augnskaða (utan flokks í HSK SP/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun), er hátt hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna fyrir i. mjög rokgjörn efni með gufuþrýsting yfir 6 kPa og ii. föst íðefni (efni og blöndur), önnur en yfirborðsvirk efni og blöndur sem samanstanda einungis af yfirborðsvirkum efnunum. Slík íðefni eru útilokuð frá notkunarsviði STE-prófunaraðferðarinnar (7. heimild).
8. Til viðbótar við íðefnin sem getið er í 6. og 7. lið inniheldur gagnasafnið, sem var aflað með STE-prófunaraðferðinni, einnig innanhúsgögn um 40 blöndur sem sýndu, samanborið við Draize-augnprófunina *í lifi*, nákvæmni sem nemur 88% (35/40), hlutfall falsjávæðra niðurstaðna 50% (5/10), og hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna 0% (0/30) við að spá fyrir um blöndur sem þurfa ekki flokkun samkvæmt flokkunarkerfum HSK SP/ reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun (9. heimild). Þess vegna er hægt að nota STE-prófunaraðferðina til að greina blöndur sem utan flokks í HSK SP/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun með neðansækinni nálgun, að undanskildum öðrum föstum blöndum en þeim sem samanstanda einungis af yfirborðsvirkum efnunum af því að hún hentar ekki fyrir föst efni. Enn fremur skal meta blöndur, sem innihalda efni með gufuþrýsting yfir 6kPa, af varfærni til að komast hjá mögulegu vanmati og slíkt skal rökstutt í hverju tilviki fyrir sig.
9. Það er ekki unnt að nota STE-prófunaraðferðina til að greina prófunariðefni sem efni í 2. undirflokki HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun eða í undirflokki 2A (augnering) eða 2B (væg augnering) í HSK SP/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun vegna verulegs fjölda íðefna í 1. undirflokki HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun sem hafa verið vanmetin í 2. undirflokk, undirflokk 2A eða undirflokk 2B og íðefni utan flokks í HSK SP/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun sem voru ofmetin sem efni í 2. undirflokki, undirflokki 2A eða undirflokki 2B (7. heimild). Í þessum tilgangi getur verið nauðsynlegt að gera frekari prófanir með annarri hentugri aðferð.

10. STE-prófunaraðferðin er hentug fyrir prófunaríðefni sem leysast upp eða mynda jafna svifblöndu í a.m.k. 5 mínútur í lífeðlisfræðilegri saltlausn, 5% dímetýlsúlfoxíði í saltlausn eða jarðolíu. STE-prófunaraðferðin hentar ekki fyrir prófunaríðefni sem eru óleysanleg eða geta ekki myndað jafna svifblöndu í a.m.k. 5 mínútur í lífeðlisfræðilegri saltlausn, 5% dímetýlsúlfoxíði í saltlausn eða jarðolíu. Notkun jarðolíu í STE-prófunaraðferðinni er möguleg vegna þess að váhrifin standa í skamman tíma. Af þessum sökum hentar STE-prófunaraðferðin til að spá fyrir um möguleikann á hættulegum áhrifum vatnsóleysanlegra prófunaríðefna á augu (t.d. langra fitualkóhóla eða ketóna) að því tilskildu að þau séu blandanleg í a.m.k. einum af leysunum þremur sem lagðir eru til hér að framan (4. heimild).
11. Heitið „prófunaríðefni“ er notað í þessari prófunaraðferð til að vísa til þess sem verið er að prófa <sup>(1)</sup> og tengist ekki nothæfi STE-prófunaraðferðarinnar til prófunar á efnunum og/eða blöndum.

#### MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

12. STE-prófunaraðferðin er greining í glasi, sem byggist á frumueiturhrifum, sem er gerð á samfelldu einlagi af glærufrumum úr kanínum (SIRC) frá Statens Seruminstitut sem eru ræktaðar í 96 holu örbakka úr pólýkarbónati (4. heimild). Eftir 5 mínútna váhrif frá prófunaríðefni eru frumueiturhrifin mæld meginlega sem hlutfallslegur lífvænleiki SIRC-frumna með því að nota MTT-greiningu (4. heimild). Minnkandi lífvænleiki frumna er notaður til að spá fyrir um möguleikann á skaðlegum áhrifum sem leiða til augnskemmda.
13. Greint hefur verið frá að 80% af lausn, sem er látin drjúpa í auga kanínu, skiljist út gegnum tárupokann innan þriggja til fjögurra mínútna en meira en 80% af lausn, sem er látin drjúpa í mannsauga, skilst út innan einnar mínútu eða tveggja mínútna (10. heimild). Með STE-prófunaraðferðinni er leitast við að áætla þessa váhrifa tíma og eru frumueiturhrif notuð sem endapunktur til að meta umfang skemmda á SIRC-frumum í kjölfar váhrifa frá prófunaríðefni í 5 mínútur.

#### SÝNT FRAM Á HÆFNI

14. Áður en STE-prófunaraðferðin, sem lýst er í þessari prófunaraðferð, er tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur sýna fram á tæknilega hæfni sína með því að flokka með réttum hætti hæfnisefnið ellefu sem mælt er með í töflu 1. Þessi efni voru valin sem dæmigerð fyrir svörunarsvið alvarlegs augnskaða eða alvarlegrar augnertingar, byggt á niðurstöðum úr prófunum í lífi á kanínuaugum (viðmiðunarregla 405 um prófanir) og flokkunarkerfi HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun (1. heimild). Aðrar valviðmiðanir voru m.a. þær að efnið fengjust á almennum markaði, að hággæða tilvísunargögn um rannsóknir í lífi væru fáanleg og að hággæðagögn um rannsóknir í glasi með STE-prófunaraðferðinni væru fáanleg. Ef efni á skránni fæst ekki, eða þegar slíkt er réttlætjanlegt, er hægt að nota annað efni, sem fullnægjandi tilvísunargögn í lífi og í glasi eru tiltæk um, að því tilskildu að notaðar séu sömu viðmiðanir og hér er lýst.

Tafla 1

#### Skrá yfir hæfnisefni

Efni	CAS-númer	Efnaflokkur <sup>(1)</sup>	Eðlisástand	Í lífi undirfl. HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun <sup>(2)</sup>	Leysir í STE-prófun	STE undirfl. HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun
Bensalkóníumklóríð (10% vatnskennt)	8 001-54-5	Óniumsamband	Vökvi	1. undirflokkur	Saltlausn	1. undirflokkur

<sup>(1)</sup> Á sameiginlegum fundi í júní 2013 var einhugur um að nú ætti að beita samræmdari notkun á hugtakinu „prófunaríðefni“, þegar unnt er, í nýjum og uppfærðum prófunaraðferðum til að lýsa því sem er prófað.

Efni	CAS-númer	Efnaflokkur <sup>(1)</sup>	Eðlisástand	Í lífi undirfl. HSK SP/ reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun <sup>(2)</sup>	Leysir í STE-prófun	STE undirfl. HSK SP/ reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun
Triton X-100 (100%)	9 002-93-1	Eter	Vökvi	1. undirflokkur	Saltlausn	1. undirflokkur
Acid Red 92	18 472-87-2	Heturhringliða samband, bróm-samband, klór-samband	Fast efni	1. undirflokkur	Saltlausn	1. undirflokkur
Natríumhýdroxíð	1 310-73-2	Basi, ólífrænt efni	Fast efni	1. undirflokkur <sup>(3)</sup>	Saltlausn	1. undirflokkur
Bútýrólaktón	96-48-0	Laktón, heturhringliða samband	Vökvi	Undirflokkur 2A (2. undirflokkur í reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun)	Saltlausn	Ekki er hægt að setja fram spá
1-oktanól	111-87-5	Alkóhól	Vökvi	Undirflokkur 2A/B <sup>(4)</sup> (2. undirflokkur í reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun)	Jarðolía	Ekki er hægt að setja fram spá
Sýklópentanól	96-41-3	Alkóhól, vetniskolefni, hringað	Vökvi	Undirflokkur 2A/B <sup>(5)</sup> (2. undirflokkur í reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun)	Saltlausn	Ekki er hægt að setja fram spá
2-etoxyétýlasetat	111-15-9	Alkóhól, eter	Vökvi	Utan flokks	Saltlausn	Utan flokks
Dódekan	112-40-3	Vetniskolefni, keðjulaga	Vökvi	Utan flokks	Jarðolía	Utan flokks
Metýlísóbútýlketón	108-10-1	Ketón	Vökvi	Utan flokks	Jarðolía	Utan flokks

Efni	CAS-númer	Efnaflokkur <sup>(1)</sup>	Eðlisástand	Í lífi undirfl. HSK SP/ reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun <sup>(2)</sup>	Leysir í STE-prófun	STE undirfl. HSK SP/ reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun
1,1-dímetylgúanidíns-úlfat	598-65-2	Amidín, brennisteinssamband	Fast efni	Utan flokks	Saltlausn	Utan flokks

- (<sup>1</sup>) Skipað var í iðefnaflokka með því að nota upplýsingar sem fengust úr áður útgefnu efni NICEATM og, ef það var ekki fáanlegt, með því að nota „National Library of Medicine's Medical Subject Headings“ (MeSH®) (fyrir milligöngu ChemIDplus® [National Library of Medicine], aðgengilegt á <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>) og uppbyggingu sem NICEATM ákvarðaði.
- (<sup>2</sup>) Byggt á niðurstöðum úr prófun í lífi á kanínuaugum (OECD-viðmiðunarregla 405 um prófanir) og notkun HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun (1. heimild).
- (<sup>3</sup>) Flokkun í 1. undirflokk byggist á húðætingarmætti 100% natríumhýdroxíðs (skráð sem hæfnisíðefni með húðætingarmátt í OECD-viðmiðunarreglu 435 um prófanir) og viðmiðun fyrir 1. undirflokk HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun (1. heimild).
- (<sup>4</sup>) Flokkun í 2A eða 2B veltur á túlkun á viðmiðun HSK SP til að greina á milli þessara tveggja undirflokka, þ.e. það þurfa tvö dýr af sex á móti fjórum dýrum af sex að sýna svörun á sjöunda degi til að gefa flokkun í undirflokk 2A. Gagnasafnið í lífi hafði að geyma tvær rannsóknir með þremur dýrum í hvorri um sig. Í annarri rannsókninni komu fram áhrif hjá tveimur dýrum af þremur á 7. degi sem gaf tilefni til flokkunar í undirflokk 2A (11. heimild) en í hinni rannsókninni sýndu allir endapunktur bata að stigi núll á sjöunda degi sem gaf tilefni til flokkunar í undirflokk 2B (12. heimild).
- (<sup>5</sup>) Flokkun í 2A eða 2B veltur á túlkun á viðmiðun HSK SP til að greina á milli þessara tveggja undirflokka, þ.e. það þarf eitt dýr af þremur á móti tveimur dýrum af þremur að sýna svörun á sjöunda degi til að gefa flokkun í undirflokk 2A. Í rannsókn í lífi eru notuð þrjú dýr. Allir endapunktur, fyrir ógagnsæi glæru og roða í slímhimnu hjá einu dýri, sýndu bata að stigi núll á sjöunda degi eða fyrr. Dýrið sem náði ekki fullum bata fyrir sjöunda dag hafði ógagnsæi glæru svo nam einu stigi og roða í slímhimnu sem nam einu stigi (á sjöunda degi) en náði fullum bata á fjórtánda degi (11. heimild).

Skammstafanir: CAS-númer = Skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um iðefni

## VERKFERLI

### Tilreiðsla einlagsins af frumum

15. Nota skal SIRC, frumulínu úr glæru úr kanínunum, til að framkvæma STE-prófunaraðferðina. Mælt er með því að SIRC-frumur séu fengnar frá viðurkenndu frumusafni, s.s. „American Type Culture Collection CCL60“.
16. SIRC-frumur eru ræktaðar í rakabættu andrúmslofti við 37 °C og 5% koltvísýring í ræktunarflösku sem inniheldur ræktunaræti sem samanstendur af lágmarksæti Eagles (e. *Eagle's minimum essential medium* (MEM)) með viðbættu 10% af nautgripafósturssermi, 2 mM af L-glútamíni, 50–100 einingum/ml af penisillíni og 50–100 µg/ml af streptómýsín. Aðskilja skal samfestar frumur í ræktunarflöskunni með því að nota trypsínetylendíamíntetraedíksýrulausn, með eða án notkunar á frumusköfu. Frumur eru láttnar fjölga sér (t.d. 2 til 3 umsáningar) í ræktunarflösku áður en þær eru notaðar í venjubundnar prófanir og skal ekki umsáð oftar en 25 sinnum eftir afþíðingu.
17. Frumur, sem eru tilbúnar til notkunar í STE-prófun, eru síðan undirbúnar með viðeigandi þéttleika og sáð í 96 holu bakka. Ráðlagður sáningarþéttleiki frumna er  $6,0 \times 10^3$  frumur í hverri holu þegar frumurnar eru notaðar fjórum dögum eftir sáningu eða  $3,0 \times 10^3$  frumur þegar frumurnar eru notaðar fimm dögum eftir sáningu með rúmmál rækta sem nemur 200 µl. Frumur, sem eru notaðar í STE-prófun og er sáð í ræktunaræti með viðeigandi þéttleika, munu ekki ná meiri samfellu en 80% þegar prófun er gerð, þ.e. fjórum eða fimm dögum eftir sáningu.

**Prófunaríðefni og samanburðarefni borin á**

18. Fyrsta val á leysi til að leysa upp eða útbúa svifblöndu úr prófunaríðefni er lífeðlisfræðileg saltlausn. Ef prófunaríðefni sýnir litla leysni eða ef ekki er hægt að leysa það upp eða það myndar ekki jafna svifblöndu í a.m.k. 5 mínútur í saltlausn er notað 5% dímetýlsúlfoxíð (CAS-númer 67-68-5) í saltlausn sem annað val á leysi. Að því er varðar prófunaríðefni sem er ekki hægt að leysa upp eða það myndar ekki jafna svifblöndu í a.m.k. 5 mínútur í annaðhvort saltlausn eða 5% dímetýlsúlfoxíði í saltlausn er jarðolía (CAS-númer 8 042-47-5) notuð sem þriðja val á leysi.
19. Prófunaríðefni eru leyst upp eða útbúin jöfn svifblanda í völdum leysi við styrk sem nemur 5% (massahlutfall) og þynnt enn frekar, tífalt með raðþynningu, í 0,5% og 0,05% styrk. Hvert prófunaríðefni skal prófað bæði í 5% og 0,05% styrk. Frumur, sem eru ræktaðar í 96 holu bakka, eru látnar verða fyrir váhrifum frá 200 µl/holu af annaðhvort 5% eða 0,05% styrk prófunaríðefnislausnar (eða sviflausn) í fimm mínútur við stofuhita. Prófunaríðefni (efni með einum efnisþætti eða fjölþættaefni eða blöndur) teljast vera óblönduð efni og eru þynnt eða svifblanda útbúin samkvæmt aðferðinni, óháð hreinleika þeirra.
20. Ræktunarætið, sem lýst er í 16. lið, er notað sem samanburður með æti í hverjum bakka í hverri endurtekningu. Enn fremur á einnig að láta frumurnar verða fyrir váhrifum frá sýnum með samanburði með leysi í hverjum bakka í hverri endurtekningu. Staðfest hefur verið að leysarnir, sem eru tilgreindir í 18. lið, hafa engin skaðleg áhrif á lífvænleika SIRC-frumna.
21. Í STE-prófunaraðferðinni á að nota 0,01% natríumlárylsúlfat í saltlausn sem jákvæðan samanburð í hverjum bakka í hverri endurtekningu. Til að reikna út lífvænleika frumna í jákvæða samanburðinum verður hver bakki í hverri endurtekningu einnig að innihalda leysissamanburð með saltlausn.
22. Blanksýni er nauðsynlegt til að ákvarða uppbót fyrir ljóspéttni og skal prófað í holum sem innihalda einungis fosfatstillta saltlausn en hvorki kalsíum og magnesíum né frumur.
23. Hvert sýni (prófunaríðefni við 5% og 0,05%, samanburður með æti, samanburður með leysi og jákvæður samanburður) skal prófað í þremur settum í hverri endurtekningu með því að láta frumurnar verða fyrir váhrifum í 200 µl af viðeigandi prófunar- eða samanburðaríðefni í 5 mínútur við stofuhita.
24. Viðmiðunarefni eru gagnleg til að meta augnertingarmátt óþekktra íðefna í tilgreindum íðefna- eða vöruflokki eða til að meta hlutfallslegan ertingarmátt augnertandi efnis á tilteknu ertingarsvörunarsviði.

**Mæling á lífvænleika frumna**

25. Eftir váhrif eru frumurnar skolaðar tvisvar með 200 µl af fosfatstilltri saltlausn og 200 µl af MTT-laun (0,5 mg MTT/ml af ræktunaræti) er bætt við. Eftir tveggja klst. hvarf tíma í hitakassa (37 °C, 5% koltvísýringur) er MTT-launinni hella af, MTT-formasan dregið út með því að bæta við 200 µl af 0,04 N saltsýru-ísóprópánóli í 60 mín í myrkri við stofuhita og gleypni MTT-formasanlausnarinnar mæld með bakkalesara við 570 nm. Prófunaríðefnin trufla MTT-greininguna (með litgjöfum eða beinum afoxurum MTT-litar) einungis ef marktækt magn prófunaríðefnis verður eftir í prófunarkerfinu eftir skolun eftir váhrif, sem er tilfellið þegar um er að ræða þrívíða endurgerða glæru úr mönnum eða endurgerða húðvefi manns, en skiptir ekki máli fyrir tvívíðar frumuréttir sem eru notaðar í STE-prófunaraðferðinni.

**Túlkun á niðurstöðum og spálíkan**

26. Ljósþéttigildin, sem fást með hverju prófunaríðefni, eru síðan notuð til að reikna út lífvænleika frumna í samanburði við samanburðinn með leysinum sem er fastsettur við 100%. Hlutfallslegur lífvænleiki frumna er gefinn upp sem hundraðshluti og fæst með því að deila í ljósþéttigildi prófunaríðefnis með ljósþéttigildni samanburðar með leysi eftir að ljósþéttigildi blanksýnis hefur verið dregið frá báðum gildunum.

$$\text{Lífvænleiki frumna(\%)} = \frac{(\text{Ljósþéttni}_{570} \text{ prófunaríðefnis}) - (\text{Ljósþéttni}_{570} \text{ blanksýnis})}{(\text{Ljósþéttni}_{570} \text{ samanburðar með leysi}) - (\text{Ljósþéttni}_{570} \text{ blanksýnis})} \times 100$$

Á sama hátt er hlutfallslegur lífvænleiki frumna í hverjum samanburði með leysi gefinn upp sem hundraðshluti og fæst með því að deila í ljósþéttigildi hvers samanburðar með leysi með ljósþéttigildi samanburðar með æti eftir að ljósþéttigildi blanksýnis hefur verið dregið frá báðum gildunum.

27. Framkvæma skal þrjár óháðar endurtekningar sem hver um sig inniheldur samhlíða prófun í þremur holum (þ.e.  $n = 9$ ). Meðaltalið úr holunum þremur fyrir hvert prófunaríðefni og samanburð með leysi í sérhverri óháðri endurtekningu er notað til að reikna út meðaltal hlutfallslegs lífvænleika frumna. Lokameðtal lífvænleika frumna er reiknað út frá óháðu endurtekningunum þremur.
28. Þröskuldsgildi lífvænleika frumna fyrir greiningu á prófunaríðefnum sem kalla fram alvarlegan augnskaða (1. undirflokkur HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun) og prófunaríðefnum sem þurfa ekki flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða (utan flokks í HSK SÞ/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun) eru gefin upp hér á eftir.

Tafla 2

**Spálíkan fyrir STE-prófunaraðferðina**

Lífvænleiki frumna		Flokkun samkvæmt HSK/SÞ/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun	Gildissvið
Við 5%	Við 0,05%		
> 70%	> 70%	Utan flokks	Efni og blöndur, að undanskildum i. mjög rokgjörnum efnum með gufuþrýsting yfir 6 kPa <sup>(1)</sup> og ii. föst íðefni (efni og blöndur) önnur en yfirborðsvirk efni og blöndur sem samanstanda einungis af yfirborðsvirkum efnum
≤ 70%	> 70%	Ekki er hægt að setja fram spá	Á ekki við
≤ 70%	≤ 70%	1. undirflokkur	Efni og blöndur <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Meta skal blöndur, sem innihalda efni með gufuþrýsting yfir 6kPa, af varfærni til að komast hjá mögulegu vanmati og slíkt skal rökstutt í hverju tilviki fyrir sig.

<sup>(2)</sup> Byggt á niðurstöðum sem fengust aðallega með efnum með einum efnisþætti en þó er einnig til takmarkað magn af gögnum um prófanir á blöndum. Tæknilega séð telst prófunaraðferðin samt sem áður nothæf til prófunar á fjölþáttaeftum og blöndum. Áður en þessi aðferð til prófunar á blöndu, sem er framkvæmd til að fá gögn sem fyrirhugað er að nota í eftirlitsskyni, er notuð skal skoðað hvort, og þá af hverju, hún gæti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi. Ekki er þörf á slíkri skoðun ef prófun á blöndunni er krafa af hálfu eftirlitsyfirvalda.

**Samþykktarviðmiðanir**

29. Prófunarniðurstöður teljast vera ásættanlegar þegar allar eftirfarandi viðmiðanir eru uppfylltar:

- a) Ljósþéttni samanburðar með æti (váhrif frá ræktunaræti) skal vera 0,3 eða hærra eftir að ljósþéttni blanksýnis hefur verið dregin frá.

- b) Lífvænleiki samanburðar með leysi skal vera 80% eða hærrí samanburði við samanburð með æti. Ef margir samanburðir með leysi eru notaðir í hverri endurtekningu skal hver þessara samanburða sýna lífvænleika frumna sem er yfir 80% til að prófunaríðefnin sem eru prófuð með þessum leysum uppfylli skilyrðin.
- c) Lífvænleiki frumna, sem fæst með jákvæðum samanburði (0,01% natríumlárylsúlfat), skal vera innan tveggja staðalfrávikna frá sögulegu meðaltali. Uppfæra skal efri og neðri samþykkismörk fyrir jákvæða samanburðinn oft, þ.e. á þriggja mánaða fresti eða í hvert sinn sem samþykktarhæf prófun er gerð í rannsóknarstofum þar sem prófanir eru sjaldan framkvæmdar (þ.e. sjaldnar en einu sinni í mánuði). Ef rannsóknarstofa lýkur ekki við nægilegan fjölda tilrauna til að staðfesta tölfræðilega sterka dreifingu jákvæða samanburðarins er ásættanlegt að nota efri og neðri samþykkismörkin sem hönnuður aðferðarinnar fastsetti, þ.e. á bilinu 21,1% til 62,3% samkvæmt rannsóknar-sögulegum gögnum rannsóknarstofunnar, meðan verið er að byggja upp innri dreifingu meðan fyrstu venjubundnu prófanirnar standa yfir.
- d) Staðalfrávik fyrir endanlegan lífvænleika frumna, leitt út frá þremur óháðum endurtekningum, skal vera undir 15% bæði fyrir 5% og 0,05% styrkleika prófunaríðefnisins.

Ef ein þessara viðmiðana eða nokkrar þeirra eru ekki uppfylltar skal ekki nota niðurstöðurnar og framkvæma skal aðrar þrjár óháðar endurtekningar.

#### GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

##### Gögn

30. Greint er frá gögnum um hverja holu fyrir sig (t.d. gildi fyrir lífvænleika frumna) fyrir hverja samhliða prófun sem og heildarmeðaltali, staðalfrávikni og flokkun.

##### Prófunarskýrsla

31. Eftirtaldir upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

##### *Prófunaríðefni og samanburðarefni*

- Efni með einum efnisþætti: efnafræðileg samngreining s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-skráningarnúmer, SMILES-eða InChI-kóði, byggingarformúla og/eða aðrar auðkenningar.
- Fjölpáttaefni, UVCB-efni og blanda: Lýsing á eiginleikum eins og kostur er, t.d. með efnakenni (sjá hér að framan), hreinleika, magnbundu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli (sjá hér að framan), að því marki sem unnt er.
- Eðlisástand, rokgirmi, sýrustig, LogP, sameindabygnd, íðefnaflokkur og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli fyrir framkvæmd rannsóknarinnar, að því marki sem unnt er.
- Hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.
- Meðhöndlun fyrir prófun, ef við á (t.d. hitun, mölun).
- Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.

##### Skilyrði fyrir prófunaraðferðina og verkferli

- Heiti og heimilisfang bakhjarls, prófunarstöðvar og rannsóknarstjóra.
- Lýsing á prófunaraðferðinni sem er notuð.

- Frumulína sem er notuð, uppruni hennar, sáningarnúmer og samfella frumna sem eru notaðar í prófunina.
- Upplýsingar um prófunaraðferðina sem er notuð.
- Fjöldi endurtekninga og samskonar sýna sem eru notuð.
- Styrkleikar prófunaríðefna sem eru notaðir (ef frábrugðnir því sem mælt er með).
- Rökstuðningur fyrir vali á leysi fyrir hvert prófunaríðefni.
- Tímalengd váhrifa frá prófunaríðefninu (ef frábrugðin þeirri sem mælt er með).
- Lýsingar á öllum breytingum á prófunaraðferðinni.
- Lýsing á þeim matsviðmiðunum og viðmiðunum fyrir ákvarðanir sem eru notaðar.
- Tilvísanir í rannsóknarsögulegt meðaltal fyrir jákvæðan samanburð og staðalfrávik:
- Sýnt fram á hæfni rannsóknarstofunnar til að framkvæma prófunaraðferðina (t.d. með prófun á hæfnisefnum) eða sýnt fram á samanburðarnákvæma framkvæmd prófunaraðferðarinnar yfir lengri tíma.

#### *Niðurstöður*

- Að því er varðar hvert prófunaríðefni og samanburðarefni og hvern prófaðan styrkleika skal setja einstök ljósþéttigildi í hverri holu fyrir samhliða prófun, meðaltal ljósþéttigilda fyrir hverja óháða endurtekningu, lífvænleika frumna í % fyrir hverja óháða endurtekningu og lokameðaltal fyrir lífvænleika frumna í % og staðalfrávik fyrir endurtekningarnar þrjár upp í töfluformi.
- Niðurstöður fyrir æti, leysi og jákvæðan samanburð þar sem sýnt er fram á viðeigandi viðmiðanir fyrir samþykkt rannsóknar.
- Lýsing á öðrum áhrifum sem fram komu.
- Afleidd flokkun í heild sinni með tilvísun í spálíkanið/ákvörðunarviðmiðanir sem eru notaðar.

#### **Umfjöllun um niðurstöðurnar**

#### *Niðurstöður*

#### **HEIMILDIR**

- 1) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-1170 06-1. Aðgengilegt á: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev05/05files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html)
- 2) Scott L, et al. (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace in vivo Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. Toxicol. In Vitro 24, 1-9.



- 3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- 4) Takahashi Y, et al. (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an In Vitro Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22,760-770.
- 5) Sakaguchi H, et al. (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25,796-809.
- 6) Kojima H, et al. (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, bls.1 855-1 869.
- 7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Aðgengilegt á: [[http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox\\_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf](http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf)].
- 8) Kafli B.5 í þessum viðauka, Bráð augnerting/augnæting.
- 9) Saito K, et al. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.
- 10) Mikkelsen TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm. Sci.* 1 648-1 653.
- 11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Brussels, Belgium.
- 12) Gautheron P, et al. (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an In Vitro Assay of Ocular Irritancy. *Fundam Appl Toxicol.* 18, 442-449.
- 13) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 14) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

*Viðbætur*

## SKILGREININGAR

**Nákvæmni:** Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktu viðmiðunargildi niðurstaða úr prófun er. Nákvæmni er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferða og einn þáttur gildis (e. *relevance*). Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli réttra niðurstaðna úr prófunaraðferð (13. heimild).

**Viðmiðunarefni:** Efni sem er notað sem viðmiðunarstaðall fyrir prófunaríðefni. Viðmiðunarefni skal hafa eftirfarandi eiginleika, i) einsleitun og áreiðanlegan uppruna, ii) líkindi í byggingu og virkni við efnaflokkinn (e. *class of substances*) sem er verið að prófa, iii) þekkt eðlisfræðilega/efnafræðilega eiginleika, iv) stuðningsgögn um þekkt áhrif og v) þekktan mátt á sviði æskilegrar svörunar.

**Neðansækin nálgun:** Þrepskipt aðferð sem er notuð fyrir prófunaríðefni sem talið er að þurfi ekki flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða sem hefst með því að skilja þau íðefni sem þurfa ekki flokkun (neikvæð niðurstaða) frá öðrum íðefnum (jákvæð niðurstaða).

**Íðefni:** Efni eða blanda.

**Augnerting:** Breytingar, sem eiga sér stað í auga eftir að prófunaríðefni hefur verið borið á það, sem ganga algerlega til baka innan 21 dags. Jafngildir „afturhverf áhrif á augu“ og 2. undirflokkur HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun

**Falsneikvæðar niðurstöður:** Hlutfall allra jákvæðra íðefna sem eru ranglega greind með prófunaraðferð sem neikvæð. Hlutfallið er ein vísbending um nothæfi prófunaraðferðar.

**Falsjákvæðar niðurstöður:** Hlutfall allra neikvæðra íðefna sem eru ranglega greind með prófunaraðferð sem jákvæð. Hlutfallið er ein vísbending um nothæfi prófunaraðferðar.

**Hætta:** Sá eðlislægi eiginleiki efnis eða aðstæðna að geta valdið skaðlegum áhrifum þegar lífvera, kerfi, hópur eða undirhópur kemst í snertingu við það efni.

**Samanburður með æti:** Ómeðhöndlað, samhliða sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis. Sýnið er unnið með sýnum, sem hafa verið meðhöndluð með prófunaríðefni og öðrum samanburðarsýnum, til að ákvarða hvort leysirinn víxlverkar við prófunarkerfið.

**Blanda:** Blanda eða lausn tveggja eða fleiri efna.

**Efni með einum efnisþætti:** Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi að a.m.k. 80% (massahlutfall).

**MTT:** 3-(4,5-dímetylþíásól-2-ýl)-2,5-dífenýltetrasólúmbrómíð, þíásólýl-blátt tetrasólúmbrómíð.

**Fjölþáttaefni:** Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem fleiri en einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi í styrk sem nemur  $\geq 10\%$  (massahlutfall) og  $< 80\%$  (massahlutfall). Fjölþáttaefni er afleiðing af framleiðsluferli. Mismunurinn á blöndu og fjölþáttaefni er sá að blandan fæst með blöndun tveggja eða fleiri efna án efnahvarfs. Fjölþáttaefni er afleiðing af efnahvarfi.

**OD:** Ljósþéttni.

**Jákvæður samanburður:** Samskonar sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis og er meðhöndlað með efni sem vitað er að framkallar jákvæða svör. Til að tryggja að hægt sé að meta breytileika í svörum jákvæða samanburðarins yfir tíma skal þessi jákvæða svörin þó ekki vera of kröftug.

**Gildi:** Lýsing á sambandi prófunarinnar og áhrifanna, sem miðað er við, og hvort sambandið hefur merkingu og er gagnlegt miðað við tiltekinn tilgang. Gildið lýsir því að hvaða marki prófunin nær að mæla rétt eða spá fyrir um líffræðilegu áhrifin sem miðað er við. Gildi felur í sér umfjöllun um nákvæmni (samsvör) prófunaraðferðar (10. heimild).

**Áreiðanleiki:** Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma prófunaraðferð með samanburðarnákvæmni hjá hverri rannsóknarstofu og hjá mismunandi rannsóknarstofum í tiltekinn tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Áreiðanleiki er metinn með því að reikna út einseturssamanburðarnákvæmni og fjölsetra samanburðarnákvæmni og einsetursendurtekningarnákvæmni (13. heimild).

**Næmi:** Hlutfall allra jákvæðra/virkra íðefna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Næmi er mælikvarði á nákvæmni prófunaraðferðar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunaraðferðar (10. heimild).

**Alvarlegur augnskaði:** Vefjaskemmdir í auga eða alvarlega sjónskerðing, eftir að prófunariðefni hefur verið sett á framflöt augans (2. heimild), sem ganga ekki algerlega til baka innan 21 dags frá því það var sett á. Jafngildir „afturhverf áhrif á augu“ og 1. undirflokkur HSK Sp/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og þökkun

**Samanburður með leysi eða burðarefni:** Ómeðhöndlað sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis, þ.m.t. leysinn eða burðarefnið, og er unnið með sýnum, sem eru meðhöndluð með prófunariðefninu, og með öðrum samanburðarsýnum til að ákvarða grunnviðmiðunarsvörin fyrir sýnin sem eru meðhöndluð með prófunariðefninu, leystu í sama leysi eða burðarefni. Þegar þetta sýni er prófað með samskeiða samanburðarsýni með æti sýnir það einnig fram á hvort leysirinn eða burðarefnið víxlverkar við prófunarkerfið.

**Sértæki:** Hlutfall allra neikvæðra/óvirkra íðefna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Sértæki er mælikvarði á nákvæmni prófunaraðferðar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunaraðferðar (13. heimild).

**Efni:** Frumefni og efnasambönd þess, náttúruleg eða unnin með framleiðsluferlum, þ.m.t. öll aukefni, sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika þess, og öll óhreinindi, sem stafa frá vinnslunni, en þó ekki leysiefni sem skilja má frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess.

**Yfirborðsvirkt efni:** Íðefni, s.s. þvotta- og hreinsiefni, sem getur minnkað yfirborðsspennu vökva og gerir því þannig kleift að freyða eða ganga inn í fast efni; efnið er einnig þekkt sem blotefni.

**Prófunariðefni:** Sérhvert efni og blanda sem eru prófuð með þessari prófunaraðferð.

**Stigskipt prófunaráætlun:** Þrepskipt prófunaráætlun þar sem allar upplýsingar um prófunariðefnið eru rýndar í tiltekinni röð og notað til þess ferlið með vægi rökstuddra vísbendinga á hverju stigi til að ákvarða hvort fyrir liggja nægar upplýsingar til að taka ákvörðun um hættuflokkun áður en farið er á næsta stig. Ef hægt er að ákvarða ertingarmátt prófunariðefnis á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga eru frekari prófanir ekki nauðsynlegar. Ef ekki er hægt að ákvarða ertingarmátt prófunariðefnis á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga skal framkvæma þrepskipta raðprófun á dýrum þar til hægt er að flokka efnið með ótvíræðum hætti.

**Ofansækin nálgun:** Þrepskipt aðferð sem er notuð fyrir prófunariðefni sem talið er að valdi alvarlegum augnskaða sem hefst með því að skilja þau íðefni sem kalla fram alvarlegan augnskaða (jákvæð niðurstaða) frá öðrum íðefnum (neikvæð niðurstaða).

**Hnattsamræmt kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK SP):** Kerfi til flokkunar íðefna (efna og blandna), samkvæmt stöðluðum tegundum og stigum eðlisrænnar hættu, heilbrigðishættu og umhverfishættu, sem tekur til samsvarandi hættuboðsatriða, s.s. hættumerkja, viðvörunarorða, hættusetninga, varnaðarsetninga og öryggisblaða, til að miðla upplýsingum um skaðleg áhrif íðefnanna í því skyni að vernda fólk (þ.m.t. vinnuveitendur, launafólk, flytjendur, neytendur og bráðaliða) og umhverfið (1. heimild).

**1. undirflokkur HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun:** Sjá „Alvarlegur augnskaði“.

**2. undirflokkur HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun:** Sjá „Augnering“.

**Útan flokks í HSK SP/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun:** Íðefni sem eru ekki flokkuð sem 1. eða 2. undirflokkur HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun (eða sem undirflokkur 2A eða undirflokkur 2B í HSK SP).

**UVCB-efni:** efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.

**B.69. PRÓFUNARAÐFERÐ MEÐ ENDURGERÐRI ÞEKJU SEM LÍKIST GLÆRU ÚR MÖNNUM (RhCE) TIL AÐ GREINA ÍÐEFNI SEM EKKI ÞURFA FLOKKUN OG MÆRKGUN M.T.T. AUGNERTINGAR EÐA ALVARLEGS AUGNSKAÐA**

## INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 492 um prófanir (2017). *Alvarlegur augnskaði* er vefjaskemmd í auga eða alvarleg sjónskerðing sem kemur fram eftir að prófunariðefni er borið á framflöt augans, sem gengur ekki til baka innan 21 dags frá því að það er borið á, eins og skilgreint er í hnattsamræmdu kerfi Sameinuðu þjóðanna (SP) til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK)] (1. heimild) og reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og þökkun efna og blandna (reglugerðin um flokkun, merkingu og þökkun)<sup>(1)</sup>. Einnig samkvæmt HSK SP og reglugerðinni um flokkun, merkingu og þökkun er *augnerting* breytingar í auga, eftir að prófunariðefni hefur verið borið á framflöt augans, sem ganga algerlega til baka innan 21 dags frá því að efnið var borið á. Prófunariðefni sem kalla fram alvarlegan augnskaða eru flokkuð í 1. undirflokk HSK SP og reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og þökkun en þau sem kalla fram augnertingu eru flokkuð í 2. undirflokk HSK SP og reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og þökkun. Íðefni sem eru ekki flokkuð m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða eru skilgreind sem efni sem uppfylla ekki kröfurnar varðandi flokkun í 1. eða 2. undirflokk HSK SP og reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og þökkun (2A eða 2B), þ.e. vísað til þeirra sem utan flokks í HSK SP og reglugerðinni um flokkun, merkingu og þökkun.
2. Mat á alvarlegum augnskaða/augnertingu hefur oftast falið í sér notkun tilraunadýra (prófunaraðferð B.5 (2. heimild)). Val á prófunaraðferð sem á best við og notkun á þessari prófunaraðferð skal skoða í tengslum við leiðbeiningarskjal Efnahags- og framfarastofnunarinnar „Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye Irritation“ (39. heimild).
3. Í þessari prófunaraðferð er lýst aðferð *í glasi* sem gerir það kleift að sanngreina íðefni (efni og blöndur) sem ekki þurfa flokkun og merkingu m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða í samræmi við HSK SP og reglugerðina um flokkun, merkingu og þökkun. Þar er notuð endurgerð þekja sem líkist glæru úr mönnum (RhCE) sem líkir nákvæmlega eftir vefjafraðilegum, formfræðilegum, lífefnafræðilegum og lífedlisfræðilegum eiginleikum glæruþekju úr mönnum. Fjórar aðrar prófunaraðferðir *í glasi* hafa verið fullgiltar, taldar vísindalega traustar og samþykktar sem prófunaraðferðir B.47 (3. heimild), B.48 (4. heimild), B.61 (5. heimild) og B.68 (6. heimild).
4. Þessi prófunaraðferð nær yfir tvær fullgiltar prófanir þar sem notuð eru RhCE-lfön sem eru fánleg á almennum markaði. Fullgildingarránsóknir til að meta augnertingu/alvarlegan augnskaða (7.–13. heimild) hafa verið framkvæmdar með því að nota EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) og SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). Í hvorri prófun um sig eru notuð RhCE-vefjalfön, sem fást á almennum markaði, sem prófunarkerfi og vísað er til þeirra í eftirfarandi texta sem fullgiltu viðmiðunaraðferðanna (VRM) – annars vegar fullgilt viðmiðunaraðferð 1 (VRM 1) og hins vegar fullgilt viðmiðunaraðferð 2 (VRM 2). Út frá þessum fullgildingarránsóknum og óháðri jafningjaryni á þeim (9. og 12. heimild) var komist að þeirri niðurstöðu að EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT geti greint rétt íðefni (bæði efni og blöndur) sem þurfa ekki flokkun og merkingu m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða samkvæmt HSK SP og mælt var með prófununum sem vísindalega gildum í þeim tilgangi (13. heimild).
5. Nú er almennt viðurkennt að í fyrirsjáanlegri framtíð geti engin ein aðferð til augnertingarprófunar *í glasi* komið að öllu leyti í stað Draize-augnprófunarinnar *í lífi* (2. og 14. heimild) til að spá fyrir um öll svörunarsvið alvarlegs augnskaða/augnertingar fyrir mismunandi íðefnaflokka. Stefnumiðaðar samsetningar nokkurra staðgönguprófunaraðferða innan (stigskiptrar) prófunaráætlunar, s.s. neðansækin nálgun/ofansækin nálgun, gætu þó komið að öllu leyti í stað Draize-augnprófunarinnar (15. heimild). Neðansækin nálgun (15. heimild) er hönnuð til að nota þegar búist er við, á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga, að íðefni valdi ekki nægilegri augnertingu til að þörf sé á flokkun en ofansækin nálgun (15. heimild) er hönnuð til að nota þegar búist er við, á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga, að íðefni valdi alvarlegum augnskaða. Mælt er með EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT til að greina íðefni, sem þurfa ekki flokkun og merkingu m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða samkvæmt HSK SP/reglugerðinni um flokkun, merkingu og þökkun (utan flokks), án frekari prófunar innan prófunaráætlunar á borð við neðansækna nálgun/ofansækna nálgun sem Scott *et al.* lögðu til, t.d. sem fyrsta stig í neðansækinni nálgun eða sem eitt af síðustu stigunum í ofansækinni nálgun (15. heimild). Þó er EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT ekki ætlað að greina á milli 1. undirflokks (alvarlegur

(1) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1272/2008 frá 16. desember 2008 um flokkun, merkingu og þökkun efna og blandna, um breytingu og niðurfellingu á tilskipunum 67/548/EBE og 1999/45/EB og um breytingu á reglugerð (EB) nr. 1907/2006 (Stjtúð. ESB L 353, 31.12.2008, bls. 1).

augnskaði) HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun og 2. undirflokks (augnerting) HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun. Þessa aðgreiningu þarf að fjalla um í öðru aðferðarþrepi prófunaráætlunar (15. heimild). Prófunariðefni sem reynist þurfa flokkun m.t.t. augnertingar/alvarlegs augnskaða með EpiOcular™ EIT eða SkinEthiC™ HCE EIT mun því þurfa viðbótarprófanir (*í glasi og/eða í lífi*) til að endanleg niðurstaða náist (utan flokks, 2. undirflokkur eða 1. undirflokkur HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun), t.d. með því að nota prófunaraðferð B.47, B.48, B.61 eða B.68.

6. Tilgangurinn með þessari prófunaraðferð er að lýsa aðferð sem er notuð til að meta möguleikann á að prófunariðefni sé hættulegt fyrir augu, byggt á getu þess til að kalla fram frumueiturhrif í RhCE-vefjalíkani eins og þau mælast með MTT-greiningunni (16. heimild) (sjá 21. lið). Lífvænleiki RhCE-vefjar eftir váhrif frá prófunariðefni er ákvarðaður með samanburði við vef sem er meðhöndlaður með neikvæðu samanburðarefni (% lífvænleiki) og síðan notaður til að spá fyrir um möguleikann á að prófunariðefni sé hættulegt fyrir augu.
7. Nothæfisstaðlar (17. heimild) eru tiltækir til að auðvelda fullgildingu á nýjum eða breyttum prófunum *í glasi* sem byggjast á RhCE, sem eru svipaðar og EpiOcular™ EIT og SkinEthiC™ HCE EIT, í samræmi við meginreglurnar í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 34 (18. heimild) og gefa færi á tímanlegum breytingum á OECD-viðmiðunarreglu 492 um prófanir til að bæta þeim við. Aðeins er hægt að tryggja gagnkvæma samþykkt gagna (MAD), samkvæmt samkomulagi Efnahags- og framfarastofnunarinnar, fyrir prófanir sem eru fullgiltar samkvæmt nothæfisstöðlunum ef þessar prófanir hafa verið endurskoðaðar og felldar inn í samsvarandi viðmiðunarreglu OECD um prófanir.

#### SKILGREININGAR

8. Skilgreiningar eru gefnar í 1. viðbæti.

#### ATRÍÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFI Á HUGA Í UPPHAFI

9. Þessi prófunaraðferð er byggð á þrívíðum RhCE-vefjalíkönunum, sem fást á almennum markaði, sem eru framleidd með því að nota annað hvort fyrsta stigs hymnisfrumur úr mönnum (þ.e. EpiOcular™ OCL-200) eða frumur glæruþekju úr mönnum sem hafa verið gerðar ódauðlegar (þ.e. SkinEthiC™ HCE/S). RhCE-vefjalíkonin EpiOcular™ OCL-200 og SkinEthiC™ HCE/S eru svipuð og þrívíð bygging glæruþekju *í lífi* og eru framleidd með því að nota frumur úr tegundum sem miðað er við (19.–20. heimild). Enn fremur eru frumueiturhrif, sem eru afleiðing af því þegar íðefni fer í gegnum glærana og framköllun frumu- og vefjaskemmda, mæld beint með prófuninni; frumueitrandi svörun segir síðan til um alvarlegan augnskaða/augnertingu *í lífi* í heild sinni. Frumuskemmdir geta orðið vegna ýmissa verkunarháttanna (sjá 20. lið) en frumueiturhrif eru mikilvægur, ef ekki helsti, verkunarmátinn sem ákvarðar samanlagða svörun við íðefni í formi alvarlegs augnskaða/augnertingar sem kemur aðallega fram *í lífi* sem ógagnsæi glæru, lithimnubólga, roði í slímhimnu og/eða tárubjúgur í slímhimnu, óháð eðlisefnafræðilegum ferlum sem liggja til grundvallar vefjaskemmdum.
10. Margt konar íðefni, sem ná yfir fjölbreyttar íðefnategundir, íðefnaflokka, sameindapýngdir, LogP, efnafræðilega byggingu o.s.frv., voru prófuð í fullgildingarrannsókninni sem liggur til grundvallar þessari prófunaraðferð. EpiOcular™ EIT-fullgildingargagnagrunnurinn innihélt 113 íðefni alls sem ná yfir 95 mismunandi lífræna virka hópa samkvæmt QSAR-verkfærakistugreiningu Efnahags- og framfarastofnunarinnar (e. *OECD QSAR toolbox analysis*) (8. heimild). Meirihluti þessara íðefna voru efni með einum efnisþætti en nokkur fjölþáttaefni (þ.m.t. 3 einsleitar fjölliður, 5 samfjölliður og 10 ígildi fjölliðna (e. *quasi polymer*) voru einnig tekin með í rannsókninni. Með tilliti til eðlisástands og undirflokka HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun var dreifing prófuðu íðefnanna 113 sem hér segir: 13 vökvar í 1. undirflokki, 15 föst efni í 1. undirflokki, 6 vökvar í undirflokki 2A, 10 föst efni í undirflokki 2A, 7 vökvar í undirflokki 2B, 7 föst efni í undirflokki 2B, 27 vökvar utan flokks og 28 föst efni utan flokks (8. heimild). SkinEthiC™ HCE EIT-fullgildingargagnagrunnurinn innihélt 200 íðefni alls sem ná yfir 165 mismunandi lífræna virka hópa (8. og 10.–11. heimild). Meirihluti þessara íðefna voru efni með einum efnisþætti en nokkur fjölþáttaefni (þ.m.t. 10 fjölliður) voru einnig tekin með í rannsókninni. Með tilliti til eðlisástands og undirflokka HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun var dreifing prófuðu íðefnanna 200 sem hér segir: 27 vökvar í 1. undirflokki, 24 föst efni í 1. undirflokki, 19 vökvar í undirflokki 2A, 10 föst efni í undirflokki 2A, 9 vökvar í undirflokki 2B, 8 föst efni í undirflokki 2B, 50 vökvar utan flokks og 53 föst efni utan flokks (10.–11. heimild).

11. Þessi prófunaraðferð á við um efni og blöndur og um föst efni, vökva, hálfköst efni og vax. Vökvarnir mega vera vatnskenndir eða ekki vatnskenndir og föstu efnin mega vera leysanleg eða óleysanleg í vatni. Föstu efnin skulu möluð í fínt duft áður en þau eru borin á, ef þess er nokkur kostur, en engin önnur formeðhöndlun á sýninu er nauðsynleg. Ekki er búið að meta lofttegundir og úðaefti í fullgildingarrannsókn. Þó að það sé hugsanlegt að hægt sé að prófa lofttegundir og úðaefti með RhCE-tækninni er ekki hægt að prófa þau með núverandi prófunaraðferð.
12. Prófunaríðefni sem gleypa ljós á sama sviði og MTT-formasan (á náttúrulegan hátt eða eftir meðhöndlun) og prófunaríðefni sem geta afoxað líflitinn MTT beint (í MTT-formasan) geta truflað mælingar á lífvænleika vefs og þörf er á aðlöguðum samburði til leiðréttingar. Gerð aðlagaðs samburðar sem kann að vera þörf á fer eftir því hvers konar truflun prófunaríðefnið veldur og eftir aðferðinni sem er notuð til að mængreina MTT-formasan (sjá 36.–42. lið).
13. Niðurstöður, sem urðu til í forfullgildingarrannsóknum (21.–22. heimild) og fullum fullgildingarrannsóknum (8. og 10.–11. heimild), sýndu að hægt er að yfirfæra bæði EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT yfir á rannsóknarstofur sem talið er að hafi ekki reynslu af því að framkvæma greiningarnar og að þau séu einnig samburðarnákvæm innan og milli rannsóknarstofa. Byggt á þessum rannsóknum er samburðarnákvæmnin, að því er varðar samsvörun spáa sem hægt er að búast við að fáist með EpiOcular™ EIT út frá gögnum um 113 íðefni, við 95% markið innan rannsóknarstofa og 93% milli rannsóknarstofa. Samburðarnákvæmnin, að því er varðar samsvörun spáa sem hægt er að búast við að fáist með SkinEthic™ HCE EIT út frá gögnum um 120 íðefni, er við 92% markið innan rannsóknarstofa og 95% milli rannsóknarstofa.
14. Hægt er að nota EpiOcular™ EIT til að greina íðefni sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða samkvæmt flokkunarkerfi HSK SP og reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun. Út frá þeim gögnum sem fengust í fullgildingarrannsókninni (8. heimild) er heildarnákvæmni EpiOcular™ EIT 80% (byggt á 112 íðefnum), næmi 96% (byggt á 57 íðefnum), hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna 4% (byggt á 57 íðefnum), sértæki 63% (byggt á 55 íðefnum) og hlutfall falsjálkvæðra niðurstaðna 37% (byggt á 55 íðefnum) þegar þau eru borin saman við gögn úr augnprófunum á kanínu með aðferð *í lífi* (prófunaraðferð B.5) (2. og 14. heimild) sem eru flokkuð samkvæmt flokkunarkerfi HSK SP og reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun. Í rannsókn þar sem 97 íðefnasamsetningar í landbúnaði voru prófaðar með EpiOcular™ EIT var sýnt fram á svipað nothæfi prófunaraðferðarinnar fyrir þessa tegund blandna og fékkst í fullgildingarrannsókninni (23. heimild). Dreifing samsetninganna 97 var sem hér segir: 21 í 1. undirflokk, 19 í undirflokk 2A, 14 í undirflokk 2B og 43 utan flokks, flokkaðar samkvæmt flokkunarkerfi HSK SP á grundvelli tilvísunargagna úr augnprófunum *í lífi* á kaninum (prófunaraðferð B.5) (2. og 14. heimild). Eftirfarandi gildi fengust (23. heimild): heildarnákvæmni 82% (byggt á 97 samsetningum), næmi 91% (byggt á 54 samsetningum), hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna 9% (byggt á 54 samsetningum), sértæki 72% (byggt á 43 samsetningum) og hlutfall falsjálkvæðra niðurstaðna 28% (byggt á 43 samsetningum).
15. Hægt er að nota SkinEthic™ HCE EIT til að greina íðefni sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða samkvæmt flokkunarkerfi HSK SP og reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun. Út frá þeim gögnum sem fengust í fullgildingarrannsókninni (10.–11. heimild) er heildarnákvæmni SkinEthic™ HCE EIT 84% (byggt á 200 íðefnum), næmi 95% (byggt á 97 íðefnum), hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna 5% (byggt á 97 íðefnum), sértæki 72% (byggt á 103 íðefnum) og hlutfall falsjálkvæðra niðurstaðna 28% (byggt á 103 íðefnum) þegar þau eru borin saman við gögn úr augnprófunum á kanínu með aðferð *í lífi* (prófunaraðferð B.5) (2. og 14. heimild) sem eru flokkuð samkvæmt flokkunarkerfi HSK SP og reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun.
16. Hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna sem fengust með báðum RhCE-prófununum, annaðhvort með efnunum eða blöndum, fellur innan 12% heildarlíkna á því að íðefni séu annað hvort greind sem efni í 2. undirflokk HSK SP og reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun eða utan flokks í HSK SP og reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun í endurteknum prófunum með Draize-augnprófuninni *í lífi*; þetta stafar af innbyggðum breytileika aðferðarinnar innan prófunarinnar (24. heimild). Hlutfall falsjálkvæðra niðurstaðna sem fengust með báðum RhCE-prófunaraðferðunum með efnunum eða blöndum er ekki úrslitaatriði í tengslum við þessa prófunaraðferð vegna þess að öll prófunaríðefni, sem kalla fram lífvænleika vefja sem er jafn eða minni en fastsett þröskuldsgildi (sjá 44. lið), koma til með að útheimta frekari prófanir með öðrum prófunaraðferðum *í glasi* eða, sem síðasta valkost, á kaninum, eftir því hvaða kröfur gilda samkvæmt reglum, þar sem notuð er raðprófunaráætlun í samræmi við aðferðina með vægi rökstuddra vísbendinga. Hægt er að nota þessar

prófunaraðferðir fyrir allar gerðir íðefna og þá skal samþykkja að með neikvæðri niðurstöðu flokkist íðefni ekki þannig að það sé augnertandi og valdi alvarlegum augnskaða (utan flokks í HSK SP og reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun). Hafa skal samráð við viðeigandi eftirlitsyfirvöld áður en EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT eru notuð samkvæmt öðrum flokkunarkerfum en HSK SP/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun.

17. Þessi prófunaraðferð er takmörkuð að því leyti að hún gerir ekki kleift að greina á milli augnertingar/afturhverfra áhrifa á augu (2. undirflokkur) og alvarlegs augnskaða/varanlegra áhrifa á augu (1. undirflokkur), eins og það er skilgreint í HSK SP og reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun, né heldur á milli augnertandi efna (valkvæður undirflokkur 2A) og vægt augnertandi efna (valkvæður undirflokkur 2B), eins og það er skilgreint í HSK SP og reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun (1. heimild). Í þessu skyni er þörf á frekari prófunum með öðrum aðferðum til prófunar í glasi.
18. Heitið „prófunaríðefni“ er notað í þessari prófunaraðferð til að vísa til þess sem verið er að prófa <sup>(1)</sup> og tengist ekki nothæfi RhCE-aðferðarinnar til prófunar á efnum og/eða blöndum.

#### MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

19. Prófunaríðefnið er borið staðbundið á a.m.k. tvö þrívíð RhCE-vefjalíkön og lífvænleiki vefja er mældur eftir váhrif og viðstöðutímabil eftir meðhöndlun. RhCE-vefir eru endurgerðir úr fyrsta stigs hyrnisfrumum úr mönnum eða úr frumum glæruþekju úr mönnum, sem hafa verið gerðar ódauðlegar, sem hafa verið ræktaðar í nokkra daga til að þær myndi lagskipta, mjög aðgreinda flöguþekju sem er formfræðilega lík þeirri sem er að finna í glæru í mönnum. EpiOcular™ RhCE-vefjalíkanið samanstendur af a.m.k. 3 lífvænlegum frumulögum og yfirborði án hornefnismyndunar með byggingu sem er lík glæru og er hliðstæð því sem finnst í *lffi*. SkinEthic™ HCE RhCE-vefjalíkanið samanstendur af a.m.k. 4 lífvænlegum frumulögum, þ.m.t. stuðlalaga grunnfrumur (e. *columnar basal cell*), millistigsvængfrumur (e. *transitional wing cell*) og grunnlæggar flöguþekjufumur (e. *superficial squamous cell*) sem líkjast þeim sem eru í eðlilegri glæruþekju í mönnum (20. og 26. heimild).
20. Alvarlegur augnskaði/augnerting sem íðefni kalla fram, sem kemur aðallega fram í *lffi* sem ógagnsæi glæru, lithimnubólga, roði í slímhimnu og/eða tárubjúgur í slímhimnu, er afleiðing keðjuverkandi atburða sem hefjast þegar íðefni fer í gegnum glæruna og/eða slímhimnuna og framköllun frumuskemmda. Frumuskemmdir geta orðið vegna ýmissa verkunarháttá, þ.m.t.: frumuhimnurof (t.d. vegna yfirborðsvirkra efna, lífrænna leysa); storknun stórsameinda (aðallega prótína) (t.d. vegna yfirborðsvirkra efna, lífrænna leysa, basa og síra); sápu myndun lípíða (t.d. vegna basa) og alkýlun eða annars konar samgild víxlverkun við stórsameindir (t.d. vegna bleikiefna, peroxíða og alkýlandi efna) (15. og 27.–28. heimild). Þó hefur verið sýnt fram á að frumueiturhrif eru mikilvægur, ef ekki helsti, verkunarmátinn sem ákvarðar samanlagða svörun við íðefni í formi alvarlegs augnskaða/augnertingar, óháð eðlisefnafræðilegum ferlum sem liggja til grundvallar vefjaskemmdum (29.–30. heimild). Enn fremur ákvarðast máttur íðefnis til að valda alvarlegum augnskaða/augnertingu fyrst og fremst af umfangi upphafsskaðans (31. heimild) sem samsvarar umfangi frumudauða (29. heimild) og umfangi svörunar þar á eftir og endanlegri útkomu (32. heimild). Þess vegna hafa efni sem eru lítið ertandi yfirleitt einungis áhrif á yfirborð glæruþekjunnar, vægt ertandi og í meðallagi ertandi efni skaða aðallega þekjuna og yfirborð uppistöðuvefs og efni sem eru mjög ertandi skaða þekjuna, djúplægan uppistöðuvef og stundum innþekju glærunnar. Mæling á lífvænleika RhCE-vefjalíkans eftir staðbundin váhrif frá íðefni til að greina íðefni sem þurfa ekki flokkun m.t.t. alvarlegs augnskaða/augnertingar (utan flokks í HSK SP og reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun) byggist á þeirri forsendu að öll íðefni, sem kalla fram alvarlegan augnskaða eða augnertingu, muni kalla fram frumueiturhrif í glæruþekjunni og/eða slímhimnunni.

(1) Á sameiginlegum fundi Efnahags- og framfarastofnunarinnar í júní 2013 var einhugur um að nú ætti að beita samræmdari notkun á hugtakinu „prófunaríðefni“, þegar unnt er, í nýjum og uppfærðum OECD-viðmiðunarreglum um prófanir til að lýsa því sem er prófað.



21. Lífvænleiki RhCE-vefja er yfirleitt mældur með umbreytingu með ensínum í lífvænlegum frumum vefsins á líflitnum MTT [3-(4,5-dímetyl)þíasól-2-yl)-2,5-dífenýltetrasólúmbromíð, þíasólýl-blár-tetrasólúmbromíð, CAS-nr. 298-93-1] í blátt MTT-formasansalt sem er mælt meginlega eftir útdrátt úr vefjum (16. heimild). Íðefni sem þurfa ekki flokkun og merkingu samkvæmt HSK SP/reglugerðinni um flokkun, merkingu og þökkun (utan flokks) eru greind sem íðefni sem draga ekki úr lífvænleika vefs niður fyrir skilgreind viðmiðunarmörk (þ.e. lífvænleiki vefja > 60% í EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EITL <sup>(1)</sup> eða > 50% í SkinEthic™ HCE EITS <sup>(2)</sup> (sjá 44. lið).

#### SÝNT FRAM Á HÆFNI

22. Áður en RhCE-prófanir eru teknar til reglubundinnar notkunar í eftirlitsskyni skulu rannsóknarstofur sýna fram á tæknilega hæfni með því að spá rétt fyrir um hæfnisíðefnin 15 sem eru talin upp í töflu 1. Þessi íðefni voru valin úr íðefnum sem voru notuð í fullgildingarrannsóknum á fullgiltu viðmiðunaraðferðunum (8. og 10.–11. heimild). Valið innihélt, að því marki sem unnt var, íðefni sem: i. ná yfir mismunandi eðlisástand; ii. ná yfir öll svið svörunar í lífi m.t.t. alvarlegs augnskaða/augnertingar byggt á hágæðaniðurstöðum, sem fengust í viðmiðunarprófun í lífi á kaninum (prófunaraðferð B.5) (2. og 14. heimild), og flokkunarkerfi HSK SP (þ.e. 1. undirflokkur, undirflokkur 2A eða undirflokkur 2B eða utan flokks) (1. heimild) og flokkunarkerfi reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og þökkun (þ.e. 1. undirflokkur, 2. undirflokkur eða utan flokks); iii. ná yfir ýmsa þætti í lífi-flokkun (25.–25. heimild); iv. eru dæmigerð fyrir íðefnaflokkana sem voru notaðir í fullgildingarrannsókninni (8. og 10.–11. heimild); v. ná yfir gott og breitt úrval af lífrænum virkum hópum (8. og 10.–11. heimild); vi. eru með vel skilgreinda efnafræðilega byggingu (8. og 10.–11. heimild); vii. eru lítaðir og/eða beinir afoxarar MTT-litar; viii. gáfu samanburðarnákvæmar niðurstöður með RhCE-prófunaraðferðum meðan fullgilding þeirra stóð yfir; ix. spáð var rétt fyrir um þau með RhCE-prófunaraðferðunum meðan fullgildingarrannsóknir á þeim stóðu yfir; x. ná yfir öll svið svörunar í glasi, byggt á hágæðagögnum sem fengust með RhCE-prófunaraðferðunum (0–100% lífvænleiki); fást á almennum markaði; og xii. þeim fylgir ekki óásættanlegur kostnaður við kaup og/eða förgun. Ef skráð íðefni er ekki fánlegt eða ef ekki er hægt að nota það af öðrum réttlætunlegum ástæðum er hægt að nota annað íðefni sem uppfyllir viðmiðanirnar sem lýst er hér að framan, t.d. eitt af íðefnunum sem voru notuð við fullgildinguna á fullgiltu viðmiðunaraðferðinni (VRM). Þó skal færa rök fyrir slíkum frávikum.

Tafla 1

#### Skrá yfir hæfnisíðefni

Efnaheiti	CAS-númer	Lífrænn virkur hópur <sup>(1)</sup>	Eðlisástand	VRM1 lífvænleiki (%) <sup>(2)</sup>	VRM2 lífvænleiki (%) <sup>(3)</sup>	VRM-spá	Afoxari MTT-litar	Litatrúflun
<b>1. undirflokkur í lífi <sup>(4)</sup></b>								
Metýlþióglýkólat	2 365-48-2	Karboxýlsýru-ester, þíóalkóhól	Fljótandi	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	Ekki er hægt að setja fram spá	J (sterk)	N
Hýdroxýetýlakrýlat	818-61-1	Akrýlat, alkóhól	Fljótandi	7,5 ± 4,7 <sup>(5)</sup>	1,6 ± 1,0	Ekki er hægt að setja fram spá	N	N
2,5-dímetyl-2,5-hexandíól	110-03-2	Alkóhól	Fast	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	Ekki er hægt að setja fram spá	N	N
Natríumoxalat	62-76-0	Oxókarboxýlsýra	Fast	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	Ekki er hægt að setja fram spá	N	N
<b>Undirflokkur 2A í lífi <sup>(4)</sup></b>								
2,4,11,13-tetraasetra-dekan-díímídamíd, N,N"-bis(4-klórófenýl)-3,12-díímínó-, dí-D-glúkonat (20%, vatnskennt) <sup>(6)</sup>	18 472-51-0	Arómatískt heturhringað halíð, arýlhalíð, díhýdroxýlhópur, gúanídín	Fljótandi	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	Ekki er hægt að setja fram spá	N	J (væg)

<sup>(1)</sup> EITL: EIT (augnertingarprófun) fyrir vökva ef um er að ræða SkinEthic™ HCE

<sup>(2)</sup> EITS: EIT (augnertingarprófun) fyrir föst efni ef um er að ræða SkinEthic™ HCE

Efnaheiti	CAS-númer	Lífrænn virkur hópur <sup>(1)</sup>	Eðlisástand	VRM1 lífvænleiki (%) <sup>(2)</sup>	VRM2 lífvænleiki (%) <sup>(3)</sup>	VRM-spá	Afoxari MTT-lítar	Litatrúflun
Natríumbensóat	532-32-1	Arýl, karboxýlsýra	Fast	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	Ekki er hægt að setja fram spá	N	N

**Undirflokkur 2B í lífi <sup>(4)</sup>**

Díetyltólúamíð	134-62-3	Bensamíð	Fljótandi	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	Ekki er hægt að setja fram spá	N	N
2,2-dímetýl-3-metylenbísýkló [2.2.1] heptan	79-92-5	Greinótt alkan með þrígreindu kolefni, alkan, bísýklóheptan, brúaðir kolefnishringir (e. <i>bridged-ring carbocycles</i> ), sýklóalkan	Fast	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	Ekki er hægt að setja fram spá	N	N

**Utan flokks í lífi <sup>(4)</sup>**

1-etyl-3-metylimídasólíumetylsúlfat	3425 73-75-5	Alkoxý, ammóníumsalt, arýl, imídasól, súlfat	Fljótandi	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Utan flokks	N	N
Díkaprýlýleter	629-82-3	Alkoxý, eter	Fljótandi	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Utan flokks	N	N
Píperónýlbútoxíð	51-03-6	Alkoxý, bensodíoxól, bensýl, eter	Fljótandi	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Utan flokks	N	N
Pólýetylenglýkól (PEG-40) hert laxerólía	61 788-85-0	Akýlal, alkóhól, allýl, eter	Seig-fljótandi	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Utan flokks	N	N
1-(4-klórfenýl)-3-(3,4-díklórfenýl)úrea	101-20-2	Arómatískt heturhringað halíð, arýlhalíð, þvagefnisafleiður	Fast	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	Utan flokks	N	N
2,2'-metylen-bis-(6-(2H-bensótríasól-2-ýl)-4-(1,1,3,3-tetrametylbútýl)-fenól)	1035 97-45-1	Greinótt alkan með fjórgreindu kolefni, brædd kolefnishringuð arómatísk efnasambönd, brædd mettuð heturhringasambönd, forefni kínónefnasambanda, tertbútýl	Fast	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	Utan flokks	N	N

Efnaheiti	CAS-númer	Lífrænn virkur hópur <sup>(1)</sup>	Eðlisástand	VRM1 lífvænleiki (%) <sup>(2)</sup>	VRM2 lífvænleiki (%) <sup>(3)</sup>	VRM-spá	Afoxari MTT-litar	Litatrufun
Kalíumtetraflúoróbórat	14 075-53-7	Ólífrænt salt	Fast	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Utan flokks	N	N

## Skammstafanir:

CASRN = skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um iðefni; VRM1 = fullgilt viðmiðunaraðferð 1, EpiOcular™ EIT; VRM2 = fullgilt viðmiðunaraðferð 2, SkinEthic™ HCE EIT; litatrufun = litatrufun við mælingu á staðalgleyfni (ljósbéttni) MTT-formasans.

- (1) Lífrænn virkur hópur sem er úthlutað eftir stigskiptri greiningu samkvæmt verkfærakistu Efnahags- og framfarastofnunarinnar 3,1 (8. heimild).  
 (2) Byggt á niðurstöðum sem fengust með EpiOcular™ EIT í EURL ECVAM/Cosmetics Europe Eye Irritation Validation Study (EIVS) (8. heimild).  
 (3) Byggt á niðurstöðum sem fengust með SkinEthic™ HCE EIT í fullgildingarrannsókninni (10.–11. heimild).  
 (4) Byggt á niðurstöðum úr prófun *í lifi* á kanínuaugum (prófunaraðferð B.5/OECD-viðmiðunaregla 405 um prófanir) (2. og 14. heimild) og með notkun á HSK SP.  
 (5) Byggt á niðurstöðum sem fengust í CEFIC Consortium for *in vitro* Eye Irritation testing strategy (CON4EI) Study.  
 (6) Flokkun í 2A eða 2B veltur á túlkun á viðmiðun HSK SP til að greina á milli þessara tveggja undirflokka, þ.e. það þarf eitt dýr af þremur á móti tveimur dýrum af þremur að sýna svörun á sjöunda degi til að gefa flokkun í undirflokk 2A. Í rannsókn *í lifi* voru notuð þrjú dýr. Allir endapunktur, fyrir utan ógagnsæi glæru hjá einu dýri, sýndu bata að stigi núll á sjöunda degi eða fyrir. Dýrið sem náði ekki fullum bata fyrir sjöunda dag hafði ógagnsæi glæru svo nam einu stigi (á sjöunda degi) en náði fullum bata á níunda degi.

23. Mælt er með því að notendur sannprófi tálmaeiginleika vefjanna eftir viðtöku þeirra samkvæmt leiðbeiningum frá framleiðanda RhCE-vefjalíkansins sem hluta af prófun á hæfni (sjá 25., 27. og 30. lið). Þetta er sérstaklega mikilvægt ef vefirnir eru fluttir um langan veg eða flutningurinn tekur langan tíma. Þegar prófun hefur verið notuð á árangursríkan hátt og hæfni í notkun hennar hefur verið náð og sýnt fram á hana þá er ekki nauðsynlegt að sannprófa hana að staðaldri. Ef prófun er notuð að staðaldri er þó mælt með að því að haldið sé áfram að meta tálmaeiginleikana með reglulegu millibili.

## VERKFERLI

24. Prófanirnar sem falla sem stendur undir þessa prófunaraðferð eru hinar vísindalega gildu EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT (9. og 12.–13. heimild) sem vísað er til sem fullgiltir viðmiðunaraðferðar (annars vegar fullgilt viðmiðunaraðferð 1 (VRM1) og hins vegar fullgilt viðmiðunaraðferð 2 (VRM2)). Staðlaðar verklagsreglur fyrir RhCE-prófunaraðferðirnar eru fáanlegar og skulu notaðar þegar prófunaraðferðirnar eru innleiddar og notaðar á rannsóknarstofu (34.–35. heimild). Í eftirfarandi málsgreinum og í 2. viðbæti er lýsing á helstu þáttum og tilhögun RhCE-prófananna.

## ÞÆTTIR Í RHCE-PRÓFUNARAÐFERÐINNI

## Almenn skilyrði

25. Nota skal viðeigandi frumur úr mönnum til að endurgera þrívíðan glæruvíðan þekjuvef sem skal samsettur úr stigvaxandi lagskiptum frumum en ekki úr horngerðum frumum. RhCE-vefjalíkanið er undirbúið í innleggi með gropinni tilbúinni hinu sem næringarefni geta farið í gegnum til frumnanna. Mörg lög af lífvænlegum þekjufrumum án hornefnismyndunar skulu vera til staðar í endurgerðri glæruvíðri þekju. Þekjufrumuborð RhCE-vefjalíkansins skal vera í beinni snertingu við loft til að geta orðið fyrir beinum, staðbundnum váhrifum frá prófunaríðefnum á svipaðan hátt og glæruþekja yrði fyrir váhrifum *í lifi*. RhCE-vefjalíkanið skal mynda virkan tálma sem er nægilega traustur til að standast það að frumueitrandi viðmiðunarefni gangi hratt inn í það, t.d. Triton X-100 eða natríumdódekýlsúlfat. Sýna skal fram á tálmaþráir og hana má meta með því að ákvarða annaðhvort þann váhrifatíma sem þarf til að draga úr lífvænleika vefjarins um 50% (ET<sub>50</sub>) þegar viðmiðunarefni er borið á í tilteknum, föstum styrk (t.d. 100 µl af 0,3% (rúmmálshlutfall) Triton X-100) eða styrk viðmiðunarefnis sem dregur úr lífvænleika vefjarins um 50% (IC<sub>50</sub>) eftir fastan váhrifatíma (t.d. 30 mínútna meðhöndlun með 50 µl af natríumdódekýlsúlfati (sjá 30. lið). Afmörkunareiginleikar RhCE-vefjalíkansins skulu koma í veg fyrir að prófunaríðefni flytjist framhjá jaðri lífvænlega vefjarins sem gæti leitt til skerðingar á getu líkansins til að lýsa váhrifum á hornhimnu. Frumur úr mönnum, sem eru notaðar til að byggja upp RhCE-vefjalíkanið, skulu vera lausar við mengun af völdum baktería, veira, berfryminga og sveppa. Birgirinn skal athuga dauðhreinsað ástand vefjalíkansins m.t.t. þess að mengun af völdum sveppa og baktería sé ekki fyrir hendi.

## Virkniaðstæður

## Lífvænleiki

26. Greiningin sem er notuð til að mægnreina lífvænleika vefja er greining með MTT-lit (16. heimild). Lífvænlegar frumur í RhCE-vefjalíkani afoxa líflitinn MTT í útfellingu af bláu MTT-formasani sem er svo dregin úr vefnum með ísóprópánólí

(eða svipuðum leysi). Hægt er að magngreina útdregið MTT-formasan annaðhvort með mælingu á staðalgleypni (ljóspéttni (OD)) eða litrófsmælingaraðferð með háþrýsti-/útháþrýstivöskviljun (e. *HPLC/UPLC-spectrophotometry procedure*) (36. heimild). Ljóspéttni hreins útdrattarleysis skal vera nægilega lítil, þ.e. < 0,1. Notendur RhCE-vefjalíkans skulu ganga úr skugga um að hver framleiðslulota RhCE-vefjalíkansins sem er notað uppfylli skilgreindar viðmiðanir fyrir neikvæðan samanburð. Ásættanleg svið fyrir ljóspéttningildi neikvæðs samanburðar fyrir fullgiltar viðmiðunaraðferðir eru tilgreind í töflu 2. Notandi litrófsmælingar með háþrýsti-/útháþrýstivöskviljun skal nota ljóspéttnisvið fyrir neikvæðan samanburð, sem er tilgreint í töflu 2, sem samþykktarviðmiðun fyrir neikvæða samanburðinn. Það skal skjalfest í prófunarskýrslunni að vefir, sem eru meðhöndlaðir með neikvæðu samanburðarefni, séu stöðugir í ræktun (veiti samsvarandi niðurstöður við mælingar á lífvænleika vefja) meðan váhrifatímabil prófunarinnar stendur yfir. Framleiðandi vefjarins skal fylgja svipuðu verklagi sem hluta af gæðaeftirliti með afhendingu vefjaframleiðslulotanna, en í þessu tilfalli geta aðrar samþykktarviðmiðanir átt við en þær sem eru tilgreindar í töflu 2. Hönnuður eða seljandi RhCE-vefjalíkansins skal staðfesta ásættanlegt svið (efri og neðri mörk) fyrir ljóspéttningildi neikvæða samanburðarins (gæðaeftirlitsskilyrði fyrir prófunaraðferðina).

Tafla 2

### Ásættanleg svið fyrir ljóspéttningildi neikvæðs samanburðar (fyrir notendur prófunar)

Prófun	Neðri ásættanleikamörk	Efri ásættanleikamörk
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (bæði fyrir aðferðarlýsingu með vökva og með föstum efnunum)	> 0,8 <sup>(1)</sup>	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (bæði fyrir aðferðarlýsingu með vökva og með föstum efnunum)	> 1,0	≤ 2,5

<sup>(1)</sup> Í þessum ásættanleikamörkum er tekið tillit mögulegrar lengingar á flutninga-/geymslutíma (t.d. > 4 dagar) sem komið hefur í ljós að hefur ekki áhrif á nothæfi prófunaraðferðarinnar (37. heimild).

#### Tálmavirkni

27. RhCE-vefjalíkanið skal vera nægilega þykkt og traust til að standast það að frumueitrandi viðmiðunarefni gangi hratt inn í það, t.d. miðað við ET<sub>50</sub> (Triton X-100) eða IC<sub>50</sub> (natríumdódekýlsúlfat) (tafla 3). Hönnuður eða seljandi RhCE-vefjalíkans sem er notað skal sýna fram á tálmavirkni hvernar framleiðslulotu RhCE-vefjalíkansins þegar vefirnir eru afhentir endanlegum notanda (sjá 30. lið).

#### Formfræði

28. Vefjafræðileg rannsókn á RhCE-vefjalíkaninu skal sýna fram á byggingu þekju sem líkist glæru úr mönnum (þ.m.t. að minnsta kosti 3 lög af lífvænlegum þekjufrumum og yfirborð án hornefnismyndunar). Að því er varðar fullgiltar viðmiðunaraðferðir hefur hönnuður eða seljandi staðfest viðeigandi formfræði og því þarf notandi prófunaraðferðarinnar ekki að sýna fram á hana aftur fyrir hverja vefjalotu sem er notuð.

#### Samanburðarnákvæmni

29. Niðurstöður úr jákvæða og neikvæða samanburðinum skulu sýna fram á samanburðarnákvæmni í langan tíma.

#### Gæðaeftirlit

30. RhCE-vefjalíkanið skal eingöngu notað ef hönnuður eða seljandi sýnir fram á að hver framleiðslulota RhCE-vefjalíkansins sem er notað uppfylli skilgreindar viðmiðanir fyrir afhendingu framleiðslunnar en af þeim skipta lífvænleiki (26. liður) og tálmavirkni (sjá 27. lið) mestu máli Hönnuður eða seljandi RhCE-vefjalíkansins skal staðfesta ásættanleg svið (efri og neðri mörk) fyrir tálmavirknina, eins og hún mælist með ET<sub>50</sub> eða IC<sub>50</sub> (sjá 25.–26. lið). Ásættanlegt svið ET<sub>50</sub> og IC<sub>50</sub>, sem hönnuður eða seljandi RhCE-vefjalíkansins notar sem gæðaeftirlitsviðmiðun fyrir afhendingu framleiðslulota (notað í fullgiltum viðmiðunaraðferðum), er tilgreint í töflu 3. Hönnuður eða seljandi RhCE-vefjalíkansins skal láta notendum prófunaraðferðarinnar í té gögn sem sýna fram á að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir afhendingu framleiðslunnar svo þeir geti sett þessar upplýsingar í prófunarskýrsluna. Einungis er hægt að samþykka niðurstöður, sem fást með vefjum sem uppfylla allar þessar viðmiðanir fyrir afhendingu framleiðslunnar, sem áreiðanlegar til að spá fyrir um iðefni sem þurfa ekki flokkun og merkingu m.t.t. augneringar eða alvarlegs augnskaða í samræmi við HSK SP/reglugerðina um flokkun, merkingu og pökkun.

Tafla 3

## Gæðaeftirlitsviðmiðun fyrir afhendingu framleiðslulota

Prófun	Neðri ásættanleikamörk	Efri ásættanleikamörk
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl af 0,3% (rúmmálshlutfall) Triton X-100)	ET <sub>50</sub> = 12,2 mín	ET <sub>50</sub> = 37,5 mín
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (30 mínútna meðhöndlun með 50 µl af natríumdódekýlsúlfati)	IC <sub>50</sub> = 1 mg/ml	IC <sub>50</sub> = 3,2 mg/ml

## Prófunaríðefni og samanburðarefni borin á

31. Nota skal a.m.k. tvö samhlíða vefjasýni fyrir hvert prófunaríðefni og fyrir hvert samanburðarefni í hverri keyrslu. Notaðar eru tvær mismunandi aðferðarlýsingar meðhöndlunar, önnur fyrir fljótandi prófunaríðefni og hin fyrir föst prófunaríðefni (34.–35. heimild). Að því er varðar báðar aðferðir og aðferðalýsingar skal væta yfirborð vefjalíkansins með kalsíum- og magnesíumlausri fosfatstilltri saltlausn Dulbeccos (Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-laus DPBS) áður en prófunaríðefnið er borið á til að líkja eftir rakaadstæðum í mannsauganu. Meðhöndlun vefjanna hefst með váhrifum frá prófunaríðefni eða -íðefnum og samanburðarefnum. Að því er varðar báðar aðferðarlýsingar meðhöndlunar í báðum fullgiltu viðmiðunaraðferðunum skal bera nægilegt magn af prófunaríðefni eða samanburðarefni á til að þekja yfirborð þekjunnar jafnt en þó ekki ótakmarkaðan skammt.
32. Prófunaríðefni, sem hægt er að láta drjúpa úr pípettu við 37 °C eða lægri hita (með því að nota ruðningspípettu), eru meðhöndluð eins og vökvar í fullgiltu viðmiðunaraðferðunum; að öðrum kosti skal meðhöndla þau sem föst efni (sjá 33. lið). Í fullgiltu viðmiðunaraðferðunum er fljótandi prófunaríðefnum dreift jafnt yfir yfirborð vefjarins (þ.e. notkun að lágmarki 60 µl/cm<sup>2</sup>) (sjá 2. viðbæti, (33.–34. heimild)). Forðast skal áhrif á háráðar (yfirborðsspennuáhrif), sem geta orðið vegna þess að magnið sem er sett í innskotsbollann (á yfirborð vefjarins) er svo lítið, að því marki sem mögulegt er til að tryggja rétta skómmun á vefinn. Vefir, sem eru meðhöndlaðir með fljótandi prófunaríðefnum, eru látnir standa í 30 mín við stöðluð ræktunarskilyrði (37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO<sub>2</sub>, ≥ 95% rakastig). Við lok váhrifatímabilsins skal fjarlægja fljótandi prófunaríðefnið og samanburðarefnin varlega af yfirborði vefjarins með því að skola hann vandlega með Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-lausri fosfatstilltri saltlausn við stofuhita. Þessu skolunarþrepi er fylgt eftir með idýfingu í nýtt æti við stofuhita eftir váhrifin (til að fjarlægja allt prófunaríðefni sem vefurinn hefur dregið í sig) í fyrirframskilgreindan tíma sem er breytilegur eftir því hvaða fullgilta viðmiðunaraðferð (VRM) er notuð. Að því er varðar fullgilta viðmiðunaraðferð 1 (VRM 1) eingöngu er viðstaða í nýju æti eftir váhrif við stöðluð ræktunarskilyrði beitt áður en MTT-greiningin er framkvæmd (sjá 2. viðbæti, 34.–35. heimild)).
33. Prófunaríðefni, sem ekki er hægt að láta drjúpa úr pípettu við hitastig sem er allt að 37 °C, eru meðhöndluð eins og föst efni í fullgiltu viðmiðunaraðferðunum (VRM). Magn prófunaríðefnis sem borið er á skal nægja til að þekja allt yfirborð vefjarins, þ.e. notkun að lágmarki 60 mg/cm<sup>2</sup> (2. viðbæti). Prófa skal föst efni í fingerðu duftformi þegar því verður við komið. Vefir, sem eru meðhöndlaðir með föstum prófunaríðefnum, eru ræktaðir í fyrirframskilgreindan tíma (eftir því hvaða fullgilta viðmiðunaraðferð (VRM) er notuð) við stöðluð ræktunarskilyrði (sjá 2. viðbæti, (34.–35. heimild)). Við lok váhrifatímabilsins skal fjarlægja fasta prófunaríðefnið og samanburðarefnin varlega af yfirborði vefjarins með því að skola hann vandlega með Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-lausri fosfatstilltri saltlausn við stofuhita. Þessu skolunarþrepi er fylgt eftir með idýfingu í nýtt æti við stofuhita eftir váhrifin (til að fjarlægja allt prófunaríðefni sem vefurinn hefur dregið í sig) í fyrirframskilgreindan tíma, sem er breytilegur eftir því hvaða fullgilta viðmiðunaraðferð er notuð, og síðan ræktun í nýju æti eftir váhrif við stofuhita við stöðluð ræktunarskilyrði áður en MTT-greiningin er framkvæmd (sjá 2. viðbæti, 34.–35. heimild)).

34. Samskeiða neikvæðir og jákvæðir samanburðir skulu teknir með í hverri keyrslu til að sýna fram á að lífvænleiki (ákvarðaður með neikvæða samanburðinum) og næmi (ákvörðuð með jákvæða samanburðinum) vefjanna sé innan ásættanleikasviðs sem er skilgreint á grundvelli rannsóknarsögulegra gagna. Samskeiða neikvæður samanburður gefur einnig grunnlínuna (100% lífvænleiki vefjar) til að reikna út hlutfallslegt hundraðshlutfall lífvænleika í vefjum sem eru meðhöndlaðir með prófunaríðefninu (% lífvænleiki<sub>prófun</sub>). Jákvætt samanburðarefni, sem mælt er með að sé notað með fullgiltu viðmiðunaraðferðunum, er óblandað metýlasetat (CAS-nr. 79-20-9, fæst á almennum markaði, t.d. hjá Sigma-Aldrich, pöntunarnr. # 45 997; fljótandi). Neikvæð samanburðarefni, sem mælt er með að séu notuð með fullgilti viðmiðunaraðferð 1 (VRM1) og fullgilti viðmiðunaraðferð 2 (VRM2), eru ofurhrein H<sub>2</sub>O og Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-laus fosfatstill saltlausn, eftir því sem við á. Þetta voru þau samanburðarefni sem voru notuð í fullgildingarrannsóknum á fullgiltu viðmiðunaraðferðunum (VRM) og þau sem flest rannsóknarsöguleg gögn eru til um. Notkun á hentugum staðgöngukosti fyrir jákvæð eða neikvæð samanburðarefni skal rökstudd með vísindalegum og fullnægjandi hætti. Neikvæðir og jákvæðir samanburðir skulu prófaðir eftir sömu aðferðarlýsingu(m) og er(u) notuð/notaðar fyrir prófunaríðefnin sem eru tekin með í keyrslunni (þ.e. fyrir fljótandi og/eða föst efni). Þessari framkvæmd skal fylgt eftir með meðhöndlunarváhrifum, skolon, ídýfingu eftir váhrif og viðstöðu eftir váhrif, eftir atvikum, eins og lýst er fyrir samanburðarprófanir sem eru keyrðar samskeiða fljótandi prófunaríðefnum (sjá 32. lið), eða fyrir samanburðarprófanir sem eru keyrðar samskeiða föstum prófunaríðefnum (sjá 33. lið), áður en MTT-greiningin er gerð (sjá 35. lið) (34.–35. heimild). Eitt sett af neikvæðum og jákvæðum samanburðum nægir fyrir öll prófunaríðefni í sama eðlisástandi (fljótandi eða föst) sem eru tekin með í sömu keyrslunni.

#### Mælingar á lífvænleika vefja

35. Greining með MTT er stöðluð meginleg aðferð (16. heimild) sem skal nota til að mæla lífvænleika vefs í þessari prófunaraðferð. Hún er samrýmanleg við notkun í þrívíðu vefjalíkani. MTT-greiningin er framkvæmd strax eftir viðstöðutímabilið eftir váhrif. Í fullgiltu viðmiðunaraðferðunum (VRM) er sýni af RhCE-vefjalíkani sett í 0,3 ml af 1 mg/ml MTT-lausun í 180 ± 15 mín við stöðluð ræktunarskilyrði. Lífvænlegar frumur í RhCE-vefjalíkaninu afoxa líflitinn MTT í útfellingu af bláu MTT-formasani. Útfellta bláa MTT-formasanið er síðan dregið út úr vefnum með því að nota viðeigandi magn af ísóprópanóli (eða svipuðum leysi) (34.–35. heimild). Útdrættir úr vefjum, sem eru prófaðir með fljótandi prófunaríðefnum, skulu teknir bæði ofan og neðan af vefjunum en útdrættir úr vefjum, sem eru prófaðir með föstum prófunaríðefnum, skulu einungis teknir neðan af vefnum (til að lágmarka alla hugsanlega mengun ísóprópanól-útdráttarlausnarrinnar af völdum prófunaríðefnis sem hefur e.t.v. orðið eftir á vefnum). Einnig má taka útdrætti úr vefjum, sem eru prófaðir með fljótandi prófunaríðefnum sem skolast ekki auðveldlega af, neðan af vefnum eingöngu. Neikvæð og jákvæð samanburðarefni, sem eru prófuð samskeiða, skulu meðhöndluð á svipaðan hátt og prófaða íðefnið. Hægt er að magngreina útdregið MTT-formasan annaðhvort með mælingu á staðalgleypni (ljóspéttni) við 570 nm á síukvarðabili sem er að hámarki ± 30 nm eða litrófsmælingaraðferð með háþrýsti/-útháþrýstivöskvaskiljun (sjá 42. lið) (11. og 36. heimild).
36. Ljósfræðilegir eiginleikar prófunaríðefnisins eða efnafræðileg verkun þess á MTT geta truflað mælingu á MTT-formasani og leitt til rangs mats á lífvænleika vefjarins. Prófunaríðefni geta truflað mælingu á MTT-formasani með beinni afoxun MTT í blátt MTT-formasan og/eða með litatruflun ef prófunaríðefnið gleypir í sig, annað hvort frá náttúrunnar hendi eða vegna meðhöndlunar, á sama ljóspéttnisviði og MTT-formasanið (þ.e. í kringum 570 nm). Gera skal forathuganir fyrir prófun til að unnt sé að greina mögulega beina MTT-afoxara og/eða litatruflandi íðefni og nota skal viðbótarsamanburði til að greina og leiðrétta fyrir hugsanlegri truflun frá slíkum prófunaríðefnum (sjá 37.–41. lið). Þetta skiptir einkum máli þegar tiltekið prófunaríðefni er ekki skolað algerlega af RhCE-vefjalíkaninu eða þegar það gengur inn í glærulíku þekjuna og er því fyrir hendi í RhCE-vefjalíkaninu þegar MTT-greiningin er gerð. Að því er varðar prófunaríðefni sem gleypa ljós á sama sviði og MTT-formasan (á náttúrulegan hátt eða eftir meðhöndlun), sem samrýmast ekki mælingu á staðalgleypni (ljóspéttni) MTT-formasans vegna of mikillar truflunar, þ.e. mikil gleypni við 570 ± 30 nm, má nota litrófsmælingaraðferð með háþrýsti/-útháþrýstivöskvaskiljun til að mæla MTT-formasanið (sjá 41.–42. lið) (11. og 36. heimild). Í stöðluðum verklagsreglum fyrir fullgiltu viðmiðunaraðferðirnar (34.–35. heimild) er ítarleg lýsing á því hvernig á að greina og leiðrétta fyrir beinni afoxun MTT og truflun frá litunarefnum (34.–35. heimild). Flæðirit til skýringar, sem veita leiðbeiningar um hvernig á að greina og meðhöndla beina afoxara MTT-litar og/eða litatruflandi íðefni fyrir fullgiltu viðmiðunaraðferð 1 (VRM1) og fullgiltu viðmiðunaraðferð 2 (VRM 2), er einnig að finna í III. viðbæti annars vegar og í IV. viðbæti hins vegar.

37. Til að greina hugsanlega truflun frá prófunaríðefnum sem gleypa í sig ljós á sama sviði og MTT-formasan (á náttúrulegan hátt eða eftir meðhöndlun) og ákvarða þörf fyrir viðbótarsamanburði er prófunaríðefninu bætt í vatn og/eða ísóprópanól og látið standa hæfilega lengi við stofuhita (sjá 2. viðbæti, (34.–35. heimild)). Ef prófunaríðefni í vatni og/eða ísóprópanóli gleypir í sig nægilegt ljós á sviðinu  $570 \pm 20$  nm fyrir fullgilta viðmiðunaraðferð 1 (VRM1) (sjá 3. viðbæti), eða ef lituð lausn fæst þegar prófunaríðefnið er blandað með vatni fyrir fullgilta viðmiðunaraðferð 2 (VRM 2) (sjá 4. viðbæti), er gert ráð fyrir að prófunaríðefnið trufla mælingu á staðalgleypni (ljóspéttni) MTT-formasans og framkvæma skal frekari samanburði á litgjöfum eða, að öðrum kosti, nota litrófsmælingu með háþrýsti/-útháþrýstivöskvaskiljun, en í því tilviki er ekki þörf á þessum samanburði (sjá 41.–42. lið og III. og IV. viðbæti) (34.–35. heimild). Þegar mæling á staðalgleypni (ljóspéttni) er gerð skal hvert truflandi prófunaríðefni borið á a.m.k. tvö lífvænleg samhliða vefjasýni sem gangast undir alla prófunaraðferðina en eru ræktað í æti í stað MTT-launar á meðan á MTT-ræktunarþreppinu stendur til að fá samanburð fyrir ósértæka litun í lifandi vef (NSC<sub>lifandi</sub>) (34.–35. heimild). Samanburður NSC<sub>lifandi</sub> skal gerður samskeiða prófuninni á litaða prófunaríðefninu og ef um er að ræða margar prófanir skal gera óháðan samanburð NSC<sub>lifandi</sub> fyrir hverja framkvæmda prófun (í hverri keyrslu) vegna eðlislægs líffræðilegs breytileika lifandi vefjar. Raunverulegur lífvænleiki vefjar er reiknaður út sem: hundraðshlutfall lífvænleika vefjar, fengið með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum frá truflandi prófunaríðefni og ræktaður í MTT-laun ( $\% \text{ lífvænleiki}_{\text{prófun}}$ ) að frádregnu hundraðshlutfalli ósértækrar litunar sem er fengið með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum frá truflandi prófunaríðefni og ræktaður í æti án MTT, sem er keyrður samskeiða prófuninni sem er leiðrétt ( $\% \text{ NSC}_{\text{lifandi}}$ ), þ.e. raunverulegur lífvænleiki vefjar =  $[\% \text{ lífvænleiki}_{\text{prófun}}] - [\% \text{ NSC}_{\text{lifandi}}]$ .
38. Til að greina beina afoxara MTT-litar beint skal bæta hverju prófunaríðefni út í nýtilreidda MTT-laun. Viðeigandi magni prófunaríðefnis er bætt við MTT-laun og blandan er látin standa í u.þ.b. 3 klst. við stöðluð ræktunarskilyrði (sjá III. og IV. viðbæti) (34.–35. heimild). Ef MTT-blandan sem inniheldur prófunaríðefnið (eða sviflausn fyrir óleysanleg prófunaríðefni) verður blá/fjólublá er gert ráð fyrir að prófunaríðefnið afoxi MTT beint og framkvæma skal frekari athuganir á virkni ólífvænlegra RhCE-vefjalíkana, óháð því hvort notuð er mæling á staðalgleypni (ljóspéttni) eða litrófsmælingaraðferð með háþrýsti/-útháþrýstivöskvaskiljun. Í þessari viðbótathugun á virkni er notaður dauður vefur sem hefur einungis eftirstandandi efnaskiptavirkni en gleypir í sig og heldur prófunaríðefninu á svipaðan hátt og lífvænlegur vefur. Dauðir vefir fyrir fullgilta viðmiðunaraðferð 1 (VRM1) eru útbúnir með því að láta þá verða fyrir váhrifum við lágt hitastig (dreppir með frystingu). Dauðir vefir fyrir fullgilta viðmiðunaraðferð 2 (VRM 2) eru útbúnir með framlengdum viðstöðutíma (t.d. í a.m.k.  $24 \pm 1$  klst.) í vatni og síðan geymdir við lágt hitastig (drekktir í vatni). Hvert prófunaríðefni sem afoxar MTT-litinn er sett á a.m.k. tvö samhliða sýni úr dauðum vef sem gangast undir alla prófunaraðferðina til að fá samanburð fyrir ósértæka afoxun MTT (NSMTT) (34.–35. heimild). Stakur NSMTT-samanburður nægir fyrir hvert prófunaríðefni, án tillits til óháðra prófana/keyrslna sem gerðar eru. Raunverulegur lífvænleiki vefjar er reiknaður út sem: hundraðshlutfall lífvænleika vefjar, fengið með lifandi vef sem var látinn verða fyrir váhrifum frá afoxara MTT-litar ( $\% \text{ lífvænleiki}_{\text{prófun}}$ ), að frádregnu hundraðshlutfalli ósértækrar MTT-afoxunar sem er fengið með dauðum vef sem var látinn verða fyrir váhrifum af sama afoxara MTT-litar, reiknað út í samanburði við neikvæða samanburðinn sem er keyrður samskeiða prófuninni sem er leiðrétt ( $\% \text{ NSMTT}$ ), þ.e. raunverulegur lífvænleiki vefjar =  $[\% \text{ lífvænleiki}_{\text{prófun}}] - [\% \text{ NSMTT}]$ .
39. Að því er varðar prófunaríðefni sem sanngreint er að valdi bæði litatruflun (sjá 37. lið) og beinni afoxun MTT (sjá 38. lið) er einnig þörf á þriðju gerðinni af samanburði, auk NSMTT-samanburðar og NSC<sub>lifandi</sub>-samanburðar sem er lýst í undangengnum liðum, við mælingu á staðalgleypni (ljóspéttni). Þetta á yfirleitt við um dökklituð prófunaríðefni sem gleypa í sig ljós á sviðinu  $570 \pm 30$  nm (t.d. blár, fjólublár, svartur) þar eð eðlislægur litur þeirra hindrar mat á getu þeirra til beinnar afoxunar MTT, eins og lýst er í 38. lið. Þetta þvingar sjálfkrafa fram notkun á NSMTT-samanburðum ásamt NSC<sub>lifandi</sub>-samanburðum. Bæði lifandi og dauðir vefir geta ísogáð og geymt prófunaríðefni sem bæði NSMTT- og NSC<sub>lifandi</sub>-samanburðir eru gerðir fyrir. Í þessu tilviki leiðréttir NSMTT-samanburðurinn því e.t.v. ekki eingöngu fyrir hugsanlegri beinni afoxun MTT af völdum prófunaríðefnisins heldur einnig fyrir litatruflun sem kemur til vegna ísogs og geymdar dauðra vefja á prófunaríðefninu. Þetta gæti leitt til tvöfaldrar leiðréttingar á litatruflun þar eð samanburður NSC<sub>lifandi</sub> leiðréttir þegar fyrir litatruflun sem kemur til vegna ísogs og geymdar lifandi vefja á prófunaríðefninu. Til að koma í veg fyrir mögulega tvöfalda leiðréttingu fyrir litatruflun þarf að gera þriðja samanburðinn fyrir ósértæka litun með dauðum vef (NSC<sub>dauður</sub>) sjá III. og IV. viðbæti (34.–35. heimild). Í þessum viðbótarsamanburði er prófunaríðefnið sett á

minnst tvö samhlíða sýni úr dauðum vef sem gangast undir allt prófunarferlið en eru ræktuð í æti í stað MTT-lausnar á meðan á MTT-ræktunarþrepinu stendur. Stakur samanburður  $NSC_{\text{dauður}}$  nægir fyrir hvert prófunariðefni, óháð fjölda óháðra prófana/keyslna sem gerðar eru, en skal gerður samskiða NSMTT-samanburði og með sömu vefjalotu. Raunverulegur lífvænleiki vefjar er reiknaður út sem: hundraðshlutfall lífvænleika vefjar, fengið með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum af prófunariðefninu ( $\% \text{Lífvænleiki}_{\text{prófun}}$ ), að frádrögnum  $\% \text{NSMTT}$ , að frádrögnum  $\% \text{NSC}_{\text{lifandi}}$ , að viðbættu hundraðshlutfalli ósértækrar litunar sem er fengið með dauðum vef sem er látinn verða fyrir váhrifum af truflandi prófunariðefni og ræktaður í æti án MTT, reiknað út í samanburði við neikvæða samanburðinn sem er keyrður samskiða prófuninni sem er leiðrétt ( $\% \text{NSC}_{\text{dauður}}$ ) (þ.e. raunverulegur lífvænleiki vefjar =  $[\% \text{Lífvænleiki}_{\text{prófun}}] - [\% \text{NSMTT}] - [\% \text{NSC}_{\text{lifandi}}] + [\% \text{NSC}_{\text{dauður}}]$ ).

40. Mikilvægt er að taka mið af því að ósértæk afoxun MTT og ósértæk litatruflun getur aukið ljóspéttni (þegar gerðar eru mælingar á staðalgleyfni) vefjaútdráttarinn þannig að hún lendi utan línuleikasviðs litrófsmælisins og að ósértæk afoxun MTT getur einnig aukið toppflatarmál MTT-formasansins (þegar gerðar eru litrófsmælingar með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun) í vefjaútdráttinum þannig að það lendi utan línuleikasviðs litrófsmælisins. Á þeim grundvelli er mikilvægt að hver rannsóknarstofa ákvarði ljóspéttni/línuleikasvið toppflatarmáls fyrir sinn litrófsmæli með t.d. MTT-formasani (CAS-númer 57 360-69-7), sem fæst á almennum markaði hjá t.d. Sigma-Aldrich (pöntunarnr. # M2003) áður en prófun á prófunariðefnum í eftirlitsskyni hefst.

41. Mæling á staðalgleyfni (ljóspéttni) með notkun litrófsmælis er viðeigandi til að meta beina afoxara MTT-litar og prófunariðefni sem trufla litun þegar truflunin sem kemur í ljós við mælingu á MTT-formasani er ekki of mikil (þ.e. ljóspéttni vefjaútdráttanna, sem fæst með prófunariðefni án nokkrar leiðréttingar fyrir beinni MTT-afoxun og/eða litatruflun, mælist innan línuleikasviðs litrófsmælisins). Engu að síður skulu niðurstöður fyrir prófunariðefni sem valda  $\% \text{NSMTT}$  og/eða  $\% \text{NSC}_{\text{lifandi}} \geq 60\%$  ((fullgilt viðmiðunaraðferð 1 (VRM1) og fullgilt viðmiðunaraðferð 2 (VRM2) fyrir aðferðarlýsingu með vökva) eða 50% (fullgilt viðmiðunaraðferð 2 (VRM2) fyrir aðferðarlýsingu með föstum efnunum) af neikvæða samanburðinum teknar með fyrirvara þar eð þetta er ákvarðað þröskuldsgildi sem er notað í fullgildu viðmiðunaraðferðunum til að skilja á milli flokkaðra og óflokkaðra íðefna (sjá 44. lið). Þó er ekki hægt að mæla staðalgleyfni (ljóspéttni) þegar truflun við mælingar á MTT-formasani er of mikil (þ.e. leiðir til óleiðréttrar ljóspéttni prófunarvefjaútdráttanna sem fellur utan við línuleikasviðs litrófsmælisins). Lituð prófunariðefni eða prófunariðefni sem verða lituð þegar þau komast í snertingu við vatn eða ísóprópanól, sem trufla mælingu á staðalgleyfni (ljóspéttni) MTT-formasans of mikið, er þó enn hægt að meta með því að nota litrófsmælingar með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun (sjá III. og IV. viðbæti). Þetta stafar af því að litrófsmælingakerfið með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun gerir kleift að skilja MTT-formasanið frá íðefninu fyrir magnákvörðun (36. heimild). Af þessum sökum er ekki þörf á  $NSC_{\text{lifandi}}$  eða  $NSC_{\text{dauður}}$  samanburði þegar litrófsmæling með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun er notuð, óháð íðefninu sem er prófað. Samt sem áður skal nota NSMTT-samanburð ef grunur er um að prófunariðefnið afoxi MTT beint (samkvæmt aðferðinni sem lýst er í 38. lið). Einnig skal nota NSMTT-samanburði með prófunariðefnum í lit (eigin litur eða sem kemur fram í vatni) sem hindrar mat á getu þeirra til beinnar afoxunar MTT, eins og lýst er í 38. lið. Þegar litrófsmæling með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun er notuð til að mæla MTT-formasan er hundraðshlutfall lífvænleika vefjar reiknað út sem hundraðshlutfall toppflatarmáls MTT-formasans, sem fæst með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum frá prófunariðefninu, í samanburði við toppgildi MTT-formasans sem er fengið með samskiða neikvæðum samanburði. Að því er varðar prófunariðefni sem geta afoxað MTT beint er raunverulegur lífvænleiki vefjar reiknaður út sem:  $\% \text{Lífvænleiki}_{\text{prófun}}$  að frádrögnum  $\% \text{NSMTT}$  eins og lýst er í síðasta málsliðnum í 38. lið. Að lokum skal tekið fram að ekki er unnt að meta með RhCE-prófunaraðferðum beina afoxara MTT-litar, eða beina afoxara MTT-litar sem geta einnig truflað litun, sem verða eftir í vefjum eftir meðhöndlun og afoxa MTT að svo miklu leyti að þeir leiða til ljóspéttni (með notkun staðlaðrar ljóspéttnimælingar) eða toppflatarmáls (með litrófsmælingu með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun) prófaðs vefjaútdráttar sem lendir utan línuleikasviðs litrófsmælisins, þó að ekki sé búist við að slíkt gerist nema í undantekningartilvikum.



42. Nota má litrófsmælingu með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun með öllum gerðum prófunaríðefna (lituð, ólituð, afoxarar MTT-litar og efni sem eru það ekki) til að mæla MTT-formasan (11. og 36. heimild). Vegna fjölbreytni litrófsmælingakerfa með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun er ekki mögulegt að hver notandi geti skapað nákvæmlega sömu kerfisskilyrðin. Sýna skal fram á hæfi litrófsmælingakerfis með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun sem slíks áður en það er notað til að magngreina MTT-formasan úr vefjaútdrætti með því að sýna að samþykktarviðmiðanirnar séu uppfylltar fyrir staðlaða mælipætti fyrir hæfi, á grundvelli þeirra sem lýst er í leiðbeiningum Matvæla- og lyfjaeftirlits Bandaríkjanna fyrir iðnaðinn um fullgildingu lífgreiningaraðferða (36. og 38. heimild). Þessir helstu mælipættir og samþykktarviðmiðanirnar þeirra eru sýnd í 5. viðbæti. Um leið og samþykktarviðmiðanirnar, sem eru skilgreindar í 5. viðbæti, eru uppfylltar telst litrófsmælingakerfið með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun hæft til mælingar á MTT-formasani samkvæmt rannsóknarskilyrðunum sem lýst er í þessari prófunaraðferð.

### Samþykktarviðmiðanir

43. Í hverri keyrslu þar sem notaðar eru RhCE-vefjaframleiðslulotur sem standast gæðaeftirlit (sjá 30. lið) skulu vefir, sem eru meðhöndlaðir með neikvæðu samanburðarefni, sýna ljóspéttni sem endurspeglar gæði vefjanna sem hafa farið gegnum öll skref sendingar- og viðtökuflerlisins og alla meðhöndlun samkvæmt aðferðarlýsingu og skulu ekki falla utan rannsóknarsögulegra fastsettra marka sem lýst er í töflu 2 (sjá 26. lið). Á sama hátt skulu vefir, sem eru meðhöndlaðir með jákvæðu samanburðarefni, þ.e. metýlasetati, sýna meðaltal vefjalífvænleika  $< 50\%$  í samanburði við neikvæða samanburðinn í fullgiltri viðmiðunaraðferð 1 (VRM1), annaðhvort með aðferðarlýsingu með vökva eða með föstum efnunum, og  $\leq 30\%$  (aðferðarlýsing með vökva) eða  $\leq 20\%$  (aðferðarlýsing með föstum efnunum) í samanburði við neikvæða samanburðinn í fullgiltri viðmiðunaraðferð 2 (VRM2) og endurspeglar þannig getu vefjanna til að sýna svörun við ertandi prófunaríðefni við skilyrði prófunaraðferðarinnar (34.–35. heimild). Breytileiki milli samhliða vefjasýna með prófunaríðefnum og samanburðarefnum skal falla innan ásættanlegra marka (þ.e. mismunur á lífvænleika milli tveggja samhliða vefjasýna skal vera undir 20% eða þá að staðalfrávikidi milli þriggja samhliða vefjasýna skal ekki fara yfir 18%). Ef annað hvort neikvæði eða jákvæði samanburðurinn í keyrslu lendir utan ásættanlegs sviðs telst keyrslan ekki fullgild og skal hún endurtekin. Ef breytileiki milli samhliða vefjasýna með prófunaríðefni lendir utan ásættanlegs sviðs verður að líta svo á að prófunin sé ekki fullgild og prófunaríðefnið skal prófað aftur.

### Túlkun á niðurstöðum og spálíkan

44. Nota skal ljóspéttnigildi/toppflatarmál, sem fást með samhliða vefjaútdrættum, fyrir hvert prófunaríðefni til að reikna út meðalhundraðshlutfall vefjalífvænleika (meðaltal milli samhliða vefjasýna), staðlað að neikvæða samanburðinum sem er fastsettur við 100%. Þröskuldsgildi hundraðshluta lífvænleika frumna til að greina prófunaríðefni sem þurfa ekki flokkun og merkingu m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða (utan flokks í HSK SP og reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun) er tilgreint í töflu. Niðurstöðurnar skulu túlkaðar sem hér segir:

— Prófunaríðefnið er greint sem efni sem þarf ekki flokkun og merkingu samkvæmt HSK SP og reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun (utan flokks) ef meðalhundraðshlutfall vefjalífvænleika eftir váhrif og viðstöðu eftir váhrif er herra en ( $>$ ) fastsetta þröskuldsgildið fyrir hundraðshluta lífvænleika vefja eins og sýnt er í töflu 4. Í þessu tilviki er ekki þörf á frekari prófunum með öðrum prófunaraðferðum.

— Ef meðalhundraðshlutfall vefjalífvænleika eftir váhrif og viðstöðu eftir váhrif er lægra en eða jafnt og ( $\leq$ ) fastsetta þröskuldsgildið fyrir hundraðshluta lífvænleika vefja er ekki hægt að setja fram spá eins og sýnt er í töflu 4. Í þessu tilviki er þörf á frekari prófunum með öðrum prófunaraðferðum vegna þess að RhCE-prófunaraðferðir sýna tiltekinn fjölda falsjákvæðra niðurstaðna (sjá 14.–15. lið) og geta ekki skilið á milli 1. undirflokks og 2. undirflokks í HSK SP og reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun (sjá 17. lið).

Tafla 4

## Spálíkon samkvæmt flokkun HSK SP og reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun

Fullgilt viðmiðunaraðferð (VRM)	Utan flokks	Ekki er hægt að setja fram spá
VRM 1 - EpiOcular™ EIT (fyrir báðar aðferðarlýsingar)	Meðaltal vefjalífvænleika > 60%	Meðaltal vefjalífvænleika ≤ 60%
VRM 2 - SkinEthic™ HCE EIT (fyrir aðferðarlýsingu með vökva)	Meðaltal vefjalífvænleika > 60%	Meðaltal vefjalífvænleika ≤ 60%
VRM2 - SkinEthic™ HCE EIT (fyrir aðferðarlýsingu með föstum efnum)	Meðaltal vefjalífvænleika > 50%	Meðaltal vefjalífvænleika ≤ 50%

45. Stök prófun sem er samsett úr a.m.k. tveimur samhliða vefjasýnum ætti að nægja fyrir prófunaríðefni ef niðurstaðan er ótvíræð. Ef niðurstöður eru óvissar, t.d. ef ósamsvörin er í samhliða mælingum og/eða meðalhundraðshlutfall vefjalífvænleika er  $60 \pm 5\%$  (fullgilt viðmiðunaraðferð 1 (VRM1) og fullgilt viðmiðunaraðferð 2 (VRM 2) með vökva) eða  $50 \pm 5\%$  (fullgilt viðmiðunaraðferð 2 (VRM 2) með föstum efnum) skal tekið til athugunar að gera aðra prófun, sem og þá þriðju ef ósamræmi er á milli niðurstaðna úr fyrstu prófununum tveimur.
46. Taka má til athugunar mismunandi þröskuldsgildi hundraðshluta lífvænleika vefja, sem greina flokkuð prófunaríðefni frá óflokkuðum prófunaríðefnum, fyrir tiltekna tegundir blandna, eftir því sem við á og er réttlætandi, til þess að auka heildarárangur prófunaraðferðarinnar fyrir þessar tegundir blandna (sjá 14. lið). Viðmiðunariðefni geta komið að gagni við að meta mátt óþekktara íðefna til að valda alvarlegum augnskaða/agnertingu eða vöruflokk þeirra eða til að meta hlutfallslega möguleika á eiturrifum flokkaðs prófunaríðefnis á augu innan tiltekins sviðs jákvæðrar svörunar.

## GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

## Gögn

47. Setja skal gögn um einstök samhliða vefjasýni í keyrslu (t.d. ljóspéttigildi/toppflatarmál MTT-formasans og útreiknuð gögn um hundraðshlutfall vefjalífvænleika fyrir prófunaríðefnið og samanburðina og spá um endanlega RhCE-prófunaraðferð) fram í töfluformi fyrir hvert prófunaríðefni, þ.m.t. gögn úr endurteknum prófunum eins og við á. Þar að auki skal gera grein fyrir meðalhundraðshlutfalli vefjalífvænleika og mismuninum á lífvænleika milli tveggja samhliða vefjasýna (ef  $n = 2$  samhliða vefjasýni) eða staðalfrávik (ef  $n \geq 3$  samhliða vefjasýni) fyrir hvert stakt prófunaríðefni og samanburð. Ef truflun frá prófunaríðefni kemur í ljós við mælingu á MTT-formasani gegnum beina MTT-afoxun og/eða litatruflun skal greina frá því fyrir hvert prófunaríðefni.

## Prófunarskýrsla

48. Eftirtaldir upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

## Prófunaríðefni

Efni með einum efnisþætti

— Efnafraðileg sannaðgreining s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-skráningarnúmer, SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla og/eða aðrar auðkenningar.

— Eðlisástand, rokgirmi, sýrustig, LogP, sameindþyngd, íðefnaflokkur og aðrir eðlisefnafraðilegir eiginleikar sem skipta máli fyrir framkvæmd rannsóknarinnar, að því marki sem unnt er.

- Hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.
- Meðhöndlun fyrir prófun, ef við á (t.d. hitun, mölun).
- Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.

#### Fjölþáttaefni, UVCB-efni og blanda

- Lýsing á eiginleikum eins og kostur er, t.d. með efnakenni (sjá hér á undan), hreinleika, magnbundu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli (sjá hér á undan), að því marki sem unnt er.
- Eðlisástand og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli fyrir framkvæmd rannsóknarinnar, að því marki sem unnt er.
- Hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.
- Meðhöndlun fyrir prófun, ef við á (t.d. hitun, mölun).
- Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.

#### Jákvæð og neikvæð samanburðarefni

- Efnafræðileg sanna greining s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-skráningarnúmer, SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla og/eða aðrar auðkenningar.
- Eðlisástand, rokgirni, sameindabygnd, íðefnaflokkur og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli fyrir framkvæmd rannsóknarinnar, að því marki sem unnt er.
- Hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.
- Meðhöndlun fyrir prófun, ef við á (t.d. hitun, mölun).
- Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.
- Rökstuðningur fyrir því að nota annan neikvæðan samanburð en ofurhreint H<sub>2</sub>O eða Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-lausa fosfatstillta saltlausn, ef við á.
- Rökstuðningur fyrir því að nota annan jákvæðan samanburð en óblandað metýlasetat, ef við á.
- Tilvísanir í rannsóknarsögulegar niðurstöður fyrir jákvæðan og neikvæðan samanburð sem sýna viðeigandi viðmiðanir fyrir ásætlanlegar keyrslur.

#### Upplýsingar um bakhjarl og prófunarstöð

- Heiti og heimilisfang bakhjarls, prófunarstöðvar og rannsóknarstjóra.
- *RhCE-vefjalíkan og aðferðarlýsing sem eru notuð (með rökstuðningi fyrir valinu, ef við á)*

*Skilyrði fyrir prófunaraðferðina*

- RhCE-vefjalíkan sem er notað, þ.m.t. númer framleiðslulotu.
- Bylgjulengd og bandsía (ef við á) sem eru notuð til að magngreina MTT-formasan og línuleikasvið mælibúnaðar (t.d. litrófsmælir).
- Lýsing á aðferðinni sem er notuð til að magngreina MTT-formasan.
- Lýsing á litrófsmælingakerfi með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun sem er notað, ef við á.
- Heildarupplýsingar til stuðnings notkun á tilteknu RhCE-vefjalíkani, þ.m.t. nothæfi þess. Í þeim skal eftirfarandi felast án þess þó að einkorðast við það:
  - i. Gæðaeftirlit með lífvænleika (birgir).
  - ii. Lífvænleiki við prófunaraðferðarskilyrðin (notandi).
  - iii. Gæðaeftirlit með tálmaþvirkni.
  - iv. Formfræði, ef hún liggur fyrir.
  - v. Samanburðarnákvæmni og forspágeta.
  - vi. Annað gæðaeftirlit með RhCE-vefjalíkaninu, ef það liggur fyrir.
- Tilvísanir í rannsóknarsöguleg gögn um RhCE-vefjalíkanið. Í þeim skal eftirfarandi felast án þess þó að einkorðast við það: Ásættanleiki gæðaeftirlitsgagna með tilvísun í rannsóknarsöguleg gögn um framleiðslulotur.
- Yfirlýsing þess efnis að prófunarstöðin hafi sýnt fram á hæfni við notkun prófunaraðferðarinnar fyrir reglubundna notkun með því að prófa hæfnisíðefnin.

*Samþykktarviðmiðanir fyrir keyrslur og prófanir*

- Meðaltal fyrir jákvæðan og neikvæðan samanburð og ásættanleikasvið á grundvelli rannsóknarsögulegra gagna.
- Ásættanlegur breytileiki milli samhliða vefjasýna fyrir jákvæðan og neikvæðan samanburð.
- Ásættanlegur breytileiki milli samhliða vefjasýna fyrir prófunaríðefnið.

*Prófunaraðferð*

- Upplýsingar um prófunarferlið sem er notað.
- Skammtar prófunaríðefnis og samanburðarefnis sem eru notaðir.
- Tímalengd og hitastig við váhrif, ídýfing eftir váhrif og stöðutímabil eftir váhrif (eftir atvikum).
- Lýsingar á öllum breytingum á prófunaraðferðinni.

- Tilgreining á samanburðinum sem var notaður fyrir beina afoxara MTT-litar og/eða litandi prófunaríðefni, ef við á.
- Fjöldi samhliða vefjasýna sem eru notuð fyrir hvert prófunaríðefni og samanburðir (jákvæður samanburður, neikvæður samanburður, NSMTT, NSC<sub>lifandi</sub> og NSC<sub>dauður</sub>, ef við á).

#### Niðurstöður

- Töflusetning gagna um stök prófunaríðefni og samanburðarefni fyrir hverja keyrslu (þ.m.t. endurteknar tilraunir, ef við á) og hverja samhliða mælingu, þ.m.t. ljóspéttnigildi eða toppflatarmál MTT-formasans, hundradshlutfall lífvænleika vefja, meðalhundraðshlutfall lífvænleika vefja, mismunur milli samhliða vefjasýna eða staðalfrávik og endanleg spá.
- Ef við á, niðurstöður úr samanburðum sem eru notaðir fyrir beina afoxara MTT-litar og/eða lituð prófunaríðefni, þ.m.t. ljóspéttnigildi eða toppflatarmál MTT-formasans, %NSMTT, %NSC<sub>lifandi</sub>, %NSC<sub>dauður</sub>, mismunur milli samhliða vefjasýna eða staðalfrávik, endanlegt rétt hundradshlutfall lífvænleika vefja og endanleg spá.
- Niðurstöður sem fengust með prófunaríðefninu eða prófunaríðefnunum og samanburðarefnunum í tengslum við skilgreindar samþykktarviðmiðanir fyrir keyrslur og prófanir.
- Lýsingar á öðrum áhrifum sem fram komu, t.d. litun vefja vegna litaðs prófunaríðefnis.

#### Umfjöllun um niðurstöðurnar

#### Niðurstæða

#### HEIMILDIR

- 1) UN (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York and Geneva: United Nations. Aðgengilegt á: [http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf](http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf)
- 2) Kafli B.5 í þessum viðauka, Bráð augnerting/augnæting
- 3) Kafli B.47 í þessum viðauka, BCOP-prófunaraðferðin (aðferð til prófunar á ógagnsæi og gegndræpi glæru úr nautgrip) til greiningar á i. íðefnum sem kalla fram alvarlegan augnskaða og ii. íðefnum sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða.
- 4) Kafli B.48 í þessum viðauka, ICE-prófunaraðferðin (aðferð til prófunar á einangruðu auga úr kjúklingi) til greiningar á i. íðefnum sem kalla fram alvarlegan augnskaða og ii. íðefnum sem ekki þurfa flokkun.
- 5) Kafli B.61 í þessum viðauka, prófunaraðferð með flúrskinslausnarleka til greiningar á efnunum sem eru ætandi og mjög ertandi fyrir augu.
- 6) Kafli B.68 í þessum viðauka, prófunaraðferð í glasi með skammvinnnum váhrifum til að greina i. íðefni sem kalla fram alvarlegan augnskaða og ii. íðefni sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða.
- 7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010, 261-266.

- 8) EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28 125 EN; doi:10.2787/41680. Aðgengilegt á: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280>
- 9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28 173 EN; doi: 10.2787/0436 97. Aðgengilegt á: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702>
- 10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D., Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.
- 11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.
- 12) URL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28 175 EN; doi: 10.2787/3903 90. Aðgengilegt á: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704>
- 13) EC EURL ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Manuscript in Preparation).
- 14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. *Journal of Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.
- 15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.
- 16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- 17) OECD (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 18) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- 19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.
- 20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. Í: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), *Alternative Toxicological Methods*, CRC Press, bls. 147-159.
- 21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619-626.
- 22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1 476-1 488.
- 23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.
- 24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.
- 25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.
- 26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.
- 27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatotoxicology* Marzulli F.N. and Maibach H.I. (Eds.), 4<sup>th</sup> Edition, bls. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.
- 28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons* Klaassen C.D.(Ed.), 7<sup>th</sup> Edition, bls. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.
- 29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922–936.

- 30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.
- 31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115–130.
- 32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2 610–2 625.
- 33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41–54.
- 34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Aðgengilegt á: [<https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>].
- 35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Aðgengilegt á: <https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>
- 36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.
- 37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.
- 38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Aðgengilegt á: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>
- 39) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.



*I. viðbætur*

## SKILGREININGAR

**Nákvæmni:** Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktu viðmiðunargildi niðurstaða úr prófun er. Nákvæmni er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferða og einn þáttur gildis. Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli réttra niðurstaðna úr prófunaraðferð (18. heimild).

**Viðmiðunariðefni:** Íðefni sem er notað sem viðmiðunarstaðall fyrir prófunariðefni. Viðmiðunariðefni skal hafa eftirfarandi eiginleika: i) einsleit og áreiðanlegan uppruna m.t.t. greiningar á því og lýsingar á eiginleikum, ii) líkindi í byggingu, virkni og/eða íðefna- eða vöruflokk sem er svipaður og íðefni(n) sem er verið að prófa, iii) þekkt eðlisefnafræðilega eiginleika, iv) stuðningsgögn um þekkt áhrif og v) þekktan mátt á sviði æskilegrar svörunar.

**Neðansækin nálgun:** Þrepkipt aðferð sem er notuð fyrir prófunariðefni sem talið er að þurfi ekki flokkun og merkingu m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða sem hefst með því að skilja þau íðefni sem þurfa ekki flokkun og merkingu (neikvæð niðurstaða) frá öðrum íðefnum (jákvæð niðurstaða).

**Íðefni:** Efni eða blanda.

**Samsvörun:** Sjá „Nákvæmni“.

**Glæra:** Gagnsær, fremsti hluti augans sem þekur lithimnuna og augasteininn og hleypir ljósi inn í augað.

**CV** (e. *Coefficient of variation*): Frávíksstuðull.

**Dev:** (e. *Deviation*) Frávik.

**EIT:** (e. *Eye Irritation Test*): Augnertingarprófun.

**EURL ECVAM:** Tilvísunarrannsóknarstofa Evrópusambandsins fyrir annars konar aðferðir en prófanir á dýrum.

**Augnerting:** Breytingar, sem eiga sér stað í auga eftir að prófunariðefni hefur verið borið á framflöt augans, sem ganga algerlega til baka innan 21 dags. Jafngildir „Afturhverf áhrif á augu“ og „2. undirflokkur HSK SP/reglugerðin um flokkun, merkingu og þökkun“.

**ET<sub>50</sub>:** Sá váhrifatími sem þarf til að draga úr lífvænleika vefjar um 50% við notkun viðmiðunariðefnis við tilgreindan, fastan styrk.

**Falsneikvæðar niðurstöður:** Hlutfall allra jákvæðra efna sem eru ranglega greind með prófunaraðferð sem neikvæð. Hlutfallið er ein vísbending um nothæfi prófunaraðferðar.

**Falsjákvæðar niðurstöður:** Hlutfall allra neikvæðra efna sem eru ranglega greind með prófunaraðferð sem jákvæð. Hlutfallið er ein vísbending um nothæfi prófunaraðferðar.

**Hætta:** Sá eðlislægi eiginleiki efnis eða aðstæðna að geta valdið skaðlegum áhrifum þegar lífvera, kerfi, hópur eða undirhópur kemst í snertingu við það efni.

**HCE:** SkinEthic™ Human Corneal Epithelium.

**HPLC:** Háþrýstivöskviljun.

**IC<sub>50</sub>:** Sá styrkur viðmiðunariðefnis sem dregur úr lífvænleika vefjar um 50% eftir fastan váhrifa tíma (t.d. 30 mínútna meðhöndlun með natríumtódekýlsúlfati).

**Ótakmarkaður skammtur:** Það magn prófunariðefnis sem er borið á RhCE-vefjalíkanið og er umfram magnið sem þarf til að hylja yfirborð þekjunnar fullkomlega og jafnt.

**Varanleg áhrif á augu:** Sjá „Alvarlegur augnskaði“.

**LLOQ:** Neðri magngreiningarmörk.

**LogP:** Logri fyrir deilistuðul oktanóls/vatns.

**Blanda:** Blanda eða lausn tveggja eða fleiri efna.

**Efni með einum efnisþætti:** Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi að a.m.k. 80% (massahlutfall).

**Fjölpáttæfni:** Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem fleiri en einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi í styrk sem nemur  $\geq 10\%$  (massahlutfall) og  $< 80\%$  (massahlutfall). Fjölpáttæfni er afleiðing af framleiðsluferli. Mismunurinn á blöndu og fjölpáttæfni er sá að blandan fæst með blöndun tveggja eða fleiri efna án efnahvarfs. Fjölpáttæfni er afleiðing af efnahvarfi.

**MTT:** 3-(4,5-dímetylþíasól-2-ýl)-2,5-dífenýltetrasólúmbrómíð, þíasólýl-blátt tetrasólúmbrómíð.

**Neikvæður samanburður:** Sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis og er meðhöndlað með efni sem vitað er að framkallar ekki jákvæða svörun í prófunarkerfinu. Sýnið er unnið með sýnum, sem hafa verið meðhöndluð með prófunariðefni, og öðrum samanburðarsýnum og er notað til að ákvarða 100% lífvænleika vefjar.

**Ekki flokkað:** Íðefni sem eru ekki flokkuð m.t.t. augnertingar (2. undirflokkur HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og þökkun eða undirflokkar 2A eða 2B) eða alvarlegs augnskaða (1. undirflokkur HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og þökkun). Jafngildir „utan flokks í HSK SP og reglugerðinni um flokkun, merkingu og þökkun“.

**NSC<sub>dauður</sub>:** Samanburður fyrir ósértæka litun með dauðum vef.

**NSC<sub>lifandi</sub>:** Samanburður fyrir ósértæka litun með lifandi vef.

**NSMTT:** Ósértæk afoxun MTT.

**OD:** Ljósþéttni.

**Nothæfisstaðlar:** Staðlar, byggðir á fullgilti prófunaraðferð sem var talin vísindalega gild, sem eru grundvöllur fyrir mat á samanburðarhæfi tillagðrar prófunaraðferðar sem er samsvarandi fullgiltu aðferðinni með tilliti til verkunarmáta og virkni. Þeir fela í sér: i) grundvallarþætti prófunaraðferðarinnar, ii) lágmarksskrá yfir viðmiðunariðefni sem valin eru úr þeim íðefnum sem voru notuð til að sýna fram á ásætlanlegt nothæfi fullgiltu prófunaraðferðarinnar og iii) gildi fyrir nákvæmni og áreiðanleika sem eru sambærilegir þeim sem fengust með fullgiltu prófunaraðferðinni og sem eiga að fást með tillögðu prófunaraðferðinni þegar hún er metin út frá lágmarksskránni yfir viðmiðunariðefni (18. heimild).

**Jákvæður samanburður:** Sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis og er meðhöndlað með efni sem vitað er að framkallar jákvæða svörun í prófunarkerfinu. Sýnið er unnið með sýnum sem hafa verið meðhöndluð með prófunariðefni og öðrum samanburðarsýnum. Til að tryggja að hægt sé að meta breytileika í svörun jákvæða samanburðarins yfir tíma skal þessi jákvæða svörun þó ekki vera of kröftug.

**Gildi:** Lýsing á sambandi prófunarinnar og áhrifanna, sem miðað er við, og hvort sambandið hefur merkingu og er gagnlegt miðað við tiltekinn tilgang. Gildið lýsir því að hvaða marki prófunin nær að mæla rétt eða spá fyrir um líffræðilegu áhrifin sem miðað er við. Gildi felur í sér umfjöllun um nákvæmni (samsvörun) prófunaraðferðar (18. heimild).

**Áreiðanleiki:** Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma prófunaraðferð með samanburðarnákvæmni hjá hverri rannsóknarstofu og hjá mismunandi rannsóknarstofum í tiltekinn tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Áreiðanleiki er metinn með því að reikna út einseturssamanburðarnákvæmni og fjölsetra samanburðarnákvæmni og einsetursendurtekningarnákvæmni (18. heimild).

**Staðgönguprófun:** Prófun sem er hönnuð til að koma í stað prófunar, sem notuð er að staðaldri og samþykkt til hættugreiningar og/eða áhættumats, og sem hefur verið sýnt fram á að verndar heilbrigði manna eða dýra eða umhverfið, eftir því sem við á, til jafns við eða betur en samþykktá prófunin við allar hugsanlegar prófunaraðstæður og fyrir öll hugsanleg prófunariðefni (18. heimild).

**Samanburðarnákvæmni:** Samkvæmni í niðurstöðum sem fást með endurteknum prófunum á sama prófunariðefninu með því að nota sömu aðferðarlýsingu prófunar (sjá áreiðanleika) (18. heimild).

**Afturhverf áhrif á augu:** Sjá „Augnerting“.

**RhCE:** Endurgerð þekja sem líkist glæru úr mönnum.

**Keyrsla:** Keyrsla samanstandur af einu eða fleirum prófunariðefnum sem eru prófuð samskiða með neikvæðum samanburði og með jákvæðum samanburði.

**SD:** Staðalfrávik.

**Næmi:** Hlutfall allra jákvæðra/virkra prófunarefna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Næmi er mælikvarði á nákvæmni prófunaraðferðar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunaraðferðar (18. heimild).

**Alvarlegur augnskaði:** Vefjaskemmd í auga eða alvarleg sjónskerðing, sem kemur fram eftir að prófunariðefni er borið á framflöt augans, sem gengur ekki algerlega til baka innan 21 dags frá því að efnið var borið á. Jafngildir „Afturhverf áhrif á augu“ og „1. undirflokkur HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og þökkun“.

**Staðlaðar verklagsreglur:** Formleg, skrifleg málsmeðferð þar sem því er nákvæmlega lýst hvernig á að framkvæma sértækar reglubundnar og prófunarsértækar aðferðir á rannsóknarstofu. Þetta er krafa samkvæmt góðum starfsvenjum við rannsóknir.

**Sértæki:** Hlutfall allra neikvæðra/óvirkra prófunarefna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Sértæki er mælikvarði á nákvæmni prófunaraðferðar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunaraðferðar (18. heimild).

**Efni:** Frumefni og efnasambönd þess, náttúruleg eða unnin með framleiðsluferlum, þ.m.t. öll aukefni, sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika þess, og öll óhreinindi, sem stafa frá vinnslunni, en þó ekki leysiefni sem skilja má frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess.

**Prófun:** Stakt prófunariðefni í samskeiða prófun á a.m.k. tveimur samhliða vefjasýnum eins og skilgreint er í samsvarandi stöðluðum verklagsreglum.

**Lífvænleiki vefjar:** Mælipáttur fyrir heildarvirkni frumuhóps í endurgerðum vef sem geta þeirra til að draga úr líflitnum MTT sem samsvarar, háð endapunktinum sem mældur er og tilhögun prófunar, heildartölu og/eða lífsþrótti lifandi frumna.

**Ofansækin nálgun:** Þrepskipt aðferð sem er notuð fyrir íðefni sem talið er að valdi alvarlegum augnskaða sem hefst með því að skilja þau íðefni sem kalla fram alvarlegan augnskaða (jákvæð niðurstaða) frá öðrum íðefnum (neikvæð niðurstaða).

**Prófunariðefni:** Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

**Stigskipt prófunaráætlun:** Þrepskipt prófunaráætlun þar sem prófunaraðferðir eru notaðar raðbundið. Allar fyrirbyggjandi upplýsingar um prófunariðefnið eru rýndar á hverju aðferðarþrepi og notað til þess ferlið með vægi rökstuddra vísbendinga til að ákvarða hvort fyrir liggja nægar upplýsingar til að taka ákvörðun um hættuflokkun áður en farið er á næsta stig. Ef hægt er að ákvarða hugsanlega hættu/mátt prófunariðefnis, á grundvelli fyrirbyggjandi upplýsinga á tilteknu aðferðarþrepi, eru frekari prófanir ekki nauðsynlegar (18. heimild).

**ULOQ:** Efri magngreiningarmörk.

**Hnattsamræmt kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK SP):** Kerfi til flokkunar íðefna (efna og blandna), samkvæmt stöðluðum tegundum og stigum eðlisrænnar hættu, heilbrigðishættu og umhverfishættu, sem tekur til samsvarandi hættuboðsatriða, s.s. skýringarmynda, viðvörunarorða, hættusetninga, varnaðarsetninga og öryggisblaða til að miðla upplýsingum um skaðleg áhrif þeirra til verndar fólki (þ.m.t. vinnuveitendur, starfsmenn, flytjendur, neytendur og bráðaliðar) og umhverfinu (1. heimild).

**1. undirflokkur HSK SP og reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og þökkun:** Sjá „Alvarlegur augnskaði“.

**2. undirflokkur HSK SP og reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og þökkun:** Sjá „Augnerting“.

**Útan flokks í HSK SP og reglugerðinni um flokkun, merkingu og þökkun:** Íðefni sem uppfylla ekki kröfurnar varðandi flokkun í 1. eða 2. undirflokk HSK SP/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og þökkun (eða undirflokk 2A eða 2B í HSK SP/reglugerðinni um flokkun, merkingu og þökkun). Jafngildir „Ekki flokkað“.

**UPLC:** Útháprýstivökvaskiljun.

**UVCB-efni:** efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.

**Fullgild prófunaraðferð:** Prófunaraðferð sem telst hafa fullnægjandi gildi og áreiðanleika í tilteknum tilgangi og sem byggist á vísindalega traustum meginreglum. Prófunaraðferð er aldrei fullkomlega algild, einungis í tengslum við skilgreindan tilgang (18. heimild).

**Fullgilt prófunaraðferð:** Prófunaraðferð sem búið er að ljúka fullgildingarrannsóknum fyrir til að ákvarða gildi hennar (þ.m.t. nákvæmni) og áreiðanleika í tilteknum tilgangi. Mikilvægt er að taka mið af því að fullgilt prófunaraðferð er e.t.v. ekki nægilega nothæf, með tilliti til nákvæmni og áreiðanleika, til að teljast samþykktarhæf fyrir fyrirhugaðan tilgang (18. heimild).

**VRM:** Fullgilt viðmiðunaraðferð.

**VRM1:** Vísað er til EpiOcular™ EIT sem fullgiltrar viðmiðunaraðferðar 1.

**VRM2:** Vísað er til SkinEthic™ HCE EIT sem fullgiltrar viðmiðunaraðferðar 2.

**Vægi rökstuddra vísbendinga:** Ferli sem felst í því að vega og meta styrkleika og veikleika ýmissa upplýsinga við að draga ályktun um hugsanlega hættu af tilteknu prófunarefni og styðja þá niðurstöðu rökum.

2. viðbætur

HELSTU ÞÆTTIR PRÓFANA Í RHCE-PRÓFUNUM SEM ERU FULLGILTAR TIL AÐ GREINA ÍDEFNI SEM ÞURFA EKKI FLOKKUN OG MERKINGU M.T.T. AUGNERTINGAR EÐA ALVARLEGS AUGNSKAÐA

Þættir prófunar	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
	Vökvar (hægt að láta drjúpa úr pípettu við $37 \pm 1$ °C eða lægra hitastig í 15 mín)	Föst efni (ekki hægt að láta drjúpa úr pípettu)	Vökvar og seigfljótandi efni (hægt að láta drjúpa úr pípettu)	Föst efni (ekki hægt að láta drjúpa úr pípettu)
Aðferðarlýsingar				
Yfirborð líkans	0,6 cm <sup>2</sup>	0,6 cm <sup>2</sup>	0,5 cm <sup>2</sup>	0,5 cm <sup>2</sup>
Fjöldi samhliða vefjasýna	A.m.k. 2	A.m.k. 2	A.m.k. 2	A.m.k. 2
Forathugun vegna litatrufunar	<p>50 µl + 1 ml H<sub>2</sub>O í 60 mín við <math>37 \pm 2</math> °C, <math>5 \pm 1\%</math> CO<sub>2</sub>, <math>\geq 95\%</math> rakastig (ólituð prófunaríðefni), eða 50 µl + 2 ml ísóprópanól blandað í 2–3 klst. við stofuhita (lituð prófunaríðefni)</p> <p>→ ef ljóspéttni prófunaríðefnisins við <math>570 \pm 20</math> nm, eftir að ljóspéttni fyrir ísóprópanól eða vatn hefur verið dregin frá, er <math>&gt; 0,08</math> (sem samsvarar u.þ.b. 5% af meðaltali ljóspéttni neikvæða samanburðarins) skal gera aðlagðan samanburð með lifandi vef.</p>	<p>50 mg + 1 ml H<sub>2</sub>O í 60 mín við <math>37 \pm 2</math> °C, <math>5 \pm 1\%</math> CO<sub>2</sub>, <math>\geq 95\%</math> rakastig (ólituð prófunaríðefni)</p> <p>og/eða</p> <p>50 mg + 2 ml ísóprópanól blandað í 2–3 klst. við stofuhita (lituð og ólituð prófunaríðefni)</p> <p>→ ef ljóspéttni prófunaríðefnisins við <math>570 \pm 20</math> nm, eftir að ljóspéttni fyrir ísóprópanól eða vatn hefur verið dregin frá, er <math>&gt; 0,08</math> (sem samsvarar u.þ.b. 5% af meðaltali ljóspéttni neikvæða samanburðarins) skal gera aðlagðan samanburð með lifandi vef.</p>	<p>10 µl + 90 µl H<sub>2</sub>O blandað í <math>30 \pm 2</math> mín við stofuhita (<math>18\text{--}28</math> °C)</p> <p>→ ef prófunaríðefnið er lituð skal gera aðlagðan samanburð með lifandi vef</p>	<p>10 mg + 90 µl H<sub>2</sub>O blandað í <math>30 \pm 2</math> mín við stofuhita</p> <p>→ ef prófunaríðefnið er lituð skal gera aðlagðan samanburð með lifandi vef</p>

Þættir prófunar	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
	Forathugun vegna beinnar afoxunar MTT	50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml lausn í 180 ± 15 mín við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO <sub>2</sub> , ≥ 95% rakastig → ef lausnin verður blá/fjólublá skal gera aðlagðan samanburð með vef sem hefur verið drepinn með frystingu (50 µl af dauðhreinsuðu afjónuðu vatni í MTT-lausn eru notaðir sem neikvæður samanburður)	50 mg + 1 ml MTT 1 mg/ml lausn í 180 ± 15 mín við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO <sub>2</sub> , ≥ 95% rakastig → ef lausnin verður blá/fjólublá skal gera aðlagðan samanburð með vef sem hefur verið drepinn með frystingu (50 µl af dauðhreinsuðu afjónuðu vatni í MTT-lausn eru notaðir sem neikvæður samanburður)	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml lausn í 180 ± 15 mín við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO <sub>2</sub> , ≥ 95% rakastig → ef lausnin verður blá/fjólublá skal gera aðlagðan samanburð með vef sem hefur verið drekkt í vatni (30 µl af dauðhreinsuðu afjónuðu vatni í MTT-lausn eru notaðir sem neikvæður samanburður)
Formeðhöndlun	20 µl af Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> -lausri fosfatstilltri saltlausn í 30 ± 2 mín við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO <sub>2</sub> , ≥ 95% rakastig, varið ljósi.	20 µl af Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> -lausri fosfatstilltri saltlausn í 30 ± 2 mín við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO <sub>2</sub> , ≥ 95% rakastig, varið ljósi.	—	—
Meðhöndlunarskammtar og notkun	50 µl (83,3 µl/cm <sup>2</sup> )	50 mg (83,3 mg/cm <sup>2</sup> ) með kvörðuðu áhaldi (t.d. sléttfullri skeið sem er kvörðuð þannig að hún rúmi 50 mg af natríumklóríði).	10 µl af Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> -lausri fosfatstilltri saltlausn + 30 ± 2 µl (60 µl/cm <sup>2</sup> ) Nota skal nælonmöska fyrir seigfljótandi efni	30 µl af Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> -lausri fosfatstilltri saltlausn + 30 ± 2 mg (60 mg/cm <sup>2</sup> )
Váhrifatími og hitastig	30 mín (± 2 mín) í ræktunaræti við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO <sub>2</sub> , ≥ 95% rakastig	6 klst. (± 0,25 klst.) í ræktunaræti við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO <sub>2</sub> , ≥ 95% rakastig	30 mín (± 2 mín) í ræktunaræti við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO <sub>2</sub> , ≥ 95% rakastig	4 klst. (± 0,1 klst.) í ræktunaræti við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO <sub>2</sub> , ≥ 95% rakastig

Þættir prófunar	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Skolun við stofuhita	3 sinnum í 100 ml af Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> -lausri fosfatstilltri saltlausn	3 sinnum í 100 ml af Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> -lausri fosfatstilltri saltlausn	20 ml af Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> -lausri fosfatstilltri saltlausn	25 ml af Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> -lausri fosfatstilltri saltlausn
Ídýfing eftir váhrif	12 mín (± 2 mín) við stofuhita í ræktunaræti	25 mín (± 2 mín) við stofuhita í ræktunaræti	30 mín (± 2 mín) við 37 °C, 5% CO <sub>2</sub> , 95% rakastig í ræktunaræti	30 mín (± 2 mín) við stofuhita í ræktunaræti
Viðstaða eftir váhrif	120 mín (± 15 mín) í ræktunaræti við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO <sub>2</sub> , ≥ 95% rakastig	18 klst. (± 0,25 klst.) í ræktunaræti við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO <sub>2</sub> , ≥ 95% rakastig	Engin	18 klst. (± 0,5 klst.) í ræktunaræti við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO <sub>2</sub> , ≥ 95% rakastig
Neikvæður samanburður	50 µl H <sub>2</sub> O Prófað samskeiða	50 µl H <sub>2</sub> O Prófað samskeiða	30 ± 2 µl af Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> -lausri fosfatstilltri saltlausn Prófað samskeiða	30 ± 2 µl af Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> -lausri fosfatstilltri saltlausn Prófað samskeiða
Jákvæður samanburður	50 µl metýlasetat Prófað samskeiða	50 µl metýlasetat Prófað samskeiða	30 ± 2 µl metýlasetat Prófað samskeiða	30 ± 2 µl metýlasetat Prófað samskeiða



Þættir prófunar	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
MTT-lausn	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT-viðstöðutími hitastig	180 mín (± 15 mín) við 37 ± 2 °C, 5±1% CO <sub>2</sub> , ≥ 95% rakastig	180 mín (± 15 mín) við 37 ± 2 °C, 5±1% CO <sub>2</sub> , ≥ 95% rakastig	180 mín (± 15 mín) við 37 ± 2 °C, 5±1% CO <sub>2</sub> , ≥ 95% rakastig	180 mín (± 15 mín) við 37 ± 2 °C, 5±1% CO <sub>2</sub> , ≥ 95% rakastig
Útdráttarleysir.	2 ml ísóprópanól (útdráttur ofan og neðan af innleggi með því að stinga gat á vefinn)	2 ml ísóprópanól (útdráttur neðan af innleggi með því að stinga gat á vefinn)	1,5 ml ísóprópanól (útdráttur ofan og neðan af innleggi)	1,5 ml ísóprópanól (útdráttur neðan af innleggi)
Útdráttartími og hitastig	2–3 klst. með hristingi (~120 rpm) við stofuhita eða yfir nótt við 4–10 °C	2–3 klst. með hristingi (~120 rpm) við stofuhita eða yfir nótt við 4–10 °C	4 klst. með hristingi (~120 rpm) við stofuhita eða a.m.k. yfir nótt án hristings við 4–10 °C	Að minnsta kosti 2 klst. með hristingi (~120 rpm) við stofuhita
Mæling á ljóspéttni	570 nm (550–590 nm) án viðmiðunarsú	570 nm (550–590 nm) án viðmiðunarsú	570 nm (540–600 nm) án viðmiðunarsú	570 nm (540–600 nm) án viðmiðunarsú
Gæðaeftirlit með vef	Meðhöndlun með 100 µl af 0,3% (rúmmálshlutfall) Triton X-100 12,2 mín ≤ ET <sub>50</sub> ≤ 37,5 mín	Meðhöndlun með 100 µl af 0,3% (rúmmálshlutfall) Triton X-100 12,2 mín ≤ ET <sub>50</sub> ≤ 37,5 mín	30 mín meðhöndlun með natríumdódekýlsúlfati (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC <sub>50</sub> ≤ 3,5 mg/ml	30 mín meðhöndlun með natríumdódekýlsúlfati (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC <sub>50</sub> ≤ 3,2 mg/ml

Þættir prófunar	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Samþykktarviðmiðanir	<p>1. Meðaltal ljóspéttni samhliða vefjasýna sem eru meðhöndluð með neikvæðum samanburði skal vera <math>&gt; 0,8</math> og <math>&lt; 2,5</math></p> <p>2. Meðallífvænleiki samhliða vefjasýna sem eru látin verða fyrir váhrifum í 30 mín með jákvæða samanburðinum, gefinn upp sem hundraðshlutfall neikvæða samanburðarins, skal vera <math>&lt; 50\%</math></p> <p>3. Mismunur á lífvænleika milli tveggja samhliða vefjasýna skal vera innan við 20%</p>	<p>1. Meðaltal ljóspéttni samhliða vefjasýna sem eru meðhöndluð með neikvæðum samanburði skal vera <math>&gt; 0,8</math> og <math>&lt; 2,5</math></p> <p>2. Meðallífvænleiki samhliða vefjasýna sem eru látin verða fyrir váhrifum í 6 klukkustundir með jákvæða samanburðinum, gefinn upp sem hundraðshlutfall neikvæða samanburðarins, skal vera <math>&lt; 50\%</math></p> <p>3. Mismunur á lífvænleika milli tveggja samhliða vefjasýna skal vera innan við 20%</p>	<p>1. Meðaltal ljóspéttni samhliða vefjasýna sem eru meðhöndluð með neikvæðum samanburði skal vera <math>&gt; 1,0</math> og <math>\leq 2,5</math></p> <p>2. Meðallífvænleiki samhliða vefjasýna sem eru látin verða fyrir váhrifum í 30 mín með jákvæða samanburðinum, gefinn upp sem hundraðshlutfall neikvæða samanburðarins, skal vera <math>\leq 30\%</math></p> <p>3. Mismunur á lífvænleika milli tveggja samhliða vefjasýna skal vera innan við 20%</p>	<p>1. Meðaltal ljóspéttni samhliða vefjasýna sem eru meðhöndluð með neikvæðum samanburði skal vera <math>&gt; 1,0</math> og <math>\leq 2,5</math></p> <p>2. Meðallífvænleiki samhliða vefjasýna sem eru látin verða fyrir váhrifum í 4 klst. með jákvæða samanburðinum, gefinn upp sem hundraðshlutfall neikvæða samanburðarins, skal vera <math>\leq 20\%</math></p> <p>3. Mismunur á lífvænleika milli tveggja samhliða vefjasýna skal vera innan við 20%</p>





## 5. viðbætur

HELSTU MÆLIÞÆTTIR OG SAMÞYKKTARVIÐMIÐANIR FYRIR HÆFI LITRÓFSMÆLINGAKERFIS MED HÁÞRÝSTI-  
ÚTHÁÞRÝSTIVÖKVASKILJUN TIL MÆLINGAR Á MTT-FORMASANI SEM ER DREGIÐ ÚR RHCE-VEFJALÍKÖNUM

Mæliþáttur	Aðferðarlýsing úr leiðbeiningum matvæla- og lyfjaeftirlits Bandaríkjanna (36. og 38. heimild)	Samþykktarviðmiðanir
Valvísi	Greining á ísóprópanóli, lifandi blanksýni (ísóprópanólútdráttur úr lifandi RhCE-vefjalíkönunum án meðhöndlunar), dautt blanksýni (ísóprópanólútdráttur úr dauðum RhCE-vefjalíkönunum án meðhöndlunar) og á leysilit (t.d. metýlenbláma).	Svæði <sub>trúflun</sub> ≤ 20% af svæði <sub>LLOQ</sub> <sup>(1)</sup>
Samkvæmni	Gæðaeftirlit (þ.e. MTT-formasan við 1,6 µg/ml, 16 µg/ml og 160 µg/ml) í ísóprópanóli (n = 5)	FS ≤ 15% eða ≤ 20% vegna LLOQ
Nákvæmni	Gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n = 5)	% frávika ≤ 15% eða ≤ 20% vegna LLOQ
Áhrif efniviðarins	Gæðaeftirlit í lifandi blanksýni (n = 5)	85% ≤ % áhrif efniviðarins ≤ 115%
Yfirfærsla	Greining á ísóprópanóli eftir staðli ULOQ (*)	Svæði <sub>trúflun</sub> ≤ 20% af svæði <sub>LLOQ</sub>
Samanburðarnákvæmni (innan sama dags)	Þrjú óháðir kvörðunarferlar (á grundvelli sex samfelldra þynninga MTT-formasans í ísóprópanóli í hlutföllum 1:3, þar sem byrjað er á ULOQ, þ.e. 200 µg/ml). Gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n = 5)	Kvörðunarferlar: % frávika ≤ 15% eða ≤ 20% vegna LLOQ Gæðaeftirlit: % frávika ≤ 15% og FS ≤ 15%
Samanburðarnákvæmni (innan sama dags)	1. dagur: Einn kvörðunarferill og gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n = 3) 2. dagur: Einn kvörðunarferill og gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n = 3) 3. dagur: Einn kvörðunarferill og gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n = 3)	
Skammtífastöðugleiki MTT-formasans í RhCE - vefjaútdrætti	Gæðaeftirlit í lifandi blanksýni (n = 3), greint á degi tilreiðslu og eftir 24 klst. geymslu við stofuhita	% frávika ≤ 15%
Langtífastöðugleiki MTT-formasans í RhCE - vefjaútdrætti, ef þörf krefur	Gæðaeftirlit í lifandi blanksýni (n=3), greint á degi tilreiðslu og eftir nokkurra daga geymslu við -20 °C	% frávika ≤ 15%

(1) LLOQ: Nedri magngreiningarmörk, skilgreind til að ná yfir 1–2% lífvænleika vefjar, þ.e. 0,8 µg/ml.

(2) ULOQ: Efri magngreiningarmörk, skilgreind þannig að þau eru a.m.k. tvöfalt hærrí en hæsti styrkur MTT-formasans í ísóprópanólútdráttum úr neikvæðum samanburðum sem búist er við (~70 µg/ml í fullgiltu viðmiðunaraðferðinni), þ.e. 200 µg/ml.

**B.70 GREINING Í GLASI MEÐ ENDURRÓÐUÐUM ESTRÓGENVIÐTAKA ÚR MÖNNUM (hrER) TIL AÐ GREINA ÍÐEFNI MEÐ BINDINGASÆKNI VIÐ ESTRÓGENVIÐTAKA**

## ALMENNUR INNGANGUR

**Viðmiðunarregla OECD um prófanir byggð á nothæfi**

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 493 um prófanir (2015). Viðmiðunarregla 493 um prófanir er viðmiðunarregla um prófanir byggð á nothæfi (PBTG), þar sem lýst er aðferðarfræði greininga *í glasi* með endurröðuðum viðtaka úr mönnum til að greina efni með bindingasækni við estrógenviðtaka (hrER-bindingagreiningar). Hún samanstendur af tveimur samsvarandi greiningum, með tilliti til verkunarmáta og virkni, til greiningar á efnum sem bindast estrógenviðtökum (þ.e. ER $\alpha$ ) og ætti að auðvelda þróun nýrra samsvarandi eða breyttra greininga í samræmi við meginreglurnar um fullgildingu sem settar eru fram í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um fullgildingu og alþjóðlega staðfestingu á nýjum eða uppfærðum prófunaraðferðum fyrir hættumat (1. heimild). Fullgiltu viðmiðunarprófunaraðferðirnar (2. viðbætur og 3. viðbætur) sem leggja grunninn að þessari viðmiðunarreglu um prófanir byggða á nothæfi eru:

— „Freyberger-Wilson (FW) In Vitro Estrogen Receptor (ER) Binding Assay Using a Full Length Human Recombinant ER $\alpha$ “ (2. heimild) og

— „The Chemical Evaluation and Research Institute (CERI) In Vitro Estrogen Receptor Binding Assay Using a Human Recombinant Ligand Binding Domain Protein“ (2. heimild).

Nothæfisstaðlar (3. heimild) eru tiltækir til að auðvelda þróun og fullgildingu svipaðra prófunaraðferða fyrir sömu endapunkta hættu og gefa færi á tímanlegum breytingum á viðmiðunarreglu 493 um prófanir byggð á nothæfi þannig að hægt sé að bæta nýjum, svipuðum greiningum við uppfærða viðmiðunarreglu um prófanir byggð á nothæfi. Þó verður svipuðum prófunargreiningum einungis bætt við eftir endurskoðun og samþykki Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir því að nothæfisstaðlar séu uppfylltir. Greiningarnar sem er að finna í viðmiðunarreglu 493 um prófanir er unnt að nota jafnt til að uppfylla kröfur landa um niðurstöður úr prófunum á bindingu við estrógenviðtaka (ER) og njóta um leið góðs af gagnkvæmri samþykkt gagna samkvæmt samkomulagi Efnahags- og framfarastofnunarinnar.

**Bakgrunnur og meginreglur greininganna sem falla undir þessa prófunaraðferð**

2. Efnahags- og framfarastofnunin hafði frumkvæði að forgangsaðgerð árið 1998 til að endurskoða fyrirbyggjandi viðmiðunarreglur fyrir prófanir og þróa nýjar viðmiðunarreglur fyrir skimun og prófun á hugsanlega innkirtlatruflandi efnum. Hugtakarammi Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir prófun og mat á innkirtlatruflandi íðefnum var endurskoðaður árið 2012. Upphaflega sem og endurskoðaða hugtakarammann er að finna sem viðauka í leiðbeiningarskjali um staðlaðar viðmiðunarreglur um prófanir til að meta íðefni með tilliti til innkirtlatruflandi eiginleika (4. heimild). Hugtakaramminn samanstendur af fimm stigum, hvert stig samsvarar mismunandi stigi líffræðilegs margbreytileika. ER-bindingagreiningarnar, sem lýst er í þessari prófunaraðferð, tilheyrja 2. stigi sem felur í sér greiningar *í glasi* sem veita upplýsingar um valið eða valin gangvirki/valinn eða valda ferla innkirtlastarfsemi. Þessi prófunaraðferð er fyrir greiningar *í glasi* á bindingu við viðtaka og henni er ætlað að greina bindla  $\alpha$ -estrógenviðtaka (ER $\alpha$ ) úr mönnum.
3. Sýnt hefur verið fram á með skýrum hætti gildi ER-bindingagreiningar *í glasi* fyrir líffræðilega virkni. ER-bindingagreiningum er ætlað að greina íðefni sem geta mögulega truflað estrógenhormónaferlið og þær hafa verið mikið notaðar undanfarna tvo áratugi til að lýsa eiginleikum dreifingar estrógenviðtaka í vefjum sem og til að greina estrógenviðtakaörva/-blokka. Þessar greiningar endurspeglar víxlverkun bindils-viðtaka sem er fyrsta stig estrógenboðmiðunarleiðarinnar og nauðsynleg fyrir æxlunarstarfsemi hjá öllum hryggdýrum.

4. Víxlverkun estrógens við estrógenviðtaka (ER) getur haft áhrif á umritun estrógenstýrðra gena og kallað fram áhrif, sem tengjast ekki genamenginu, sem geta leitt til örvarunar eða heftingar á frumufærlum, þ.m.t. þau sem eru nauðsynleg fyrir frumufjölgun, eðlilegan fósturþroska og æxlunarstarfsemi (5.–7. heimild). Truflun á eðlilegum estrógenvirkum kerfum getur e.t.v. komið af stað skaðlegum áhrifum á eðlilega þroskun (einstaklingsmyndun), frjósemisheilbrigði og heilleika æxlunarfærakerfisins. Óviðeigandi boðmiðlun estrógenviðtaka geta leitt til áhrifa s.s. aukinnar áhættu á hormónaháðu krabbameini, skertrar frjósemi og breytinga á vexti og þroskun fósturs (8. heimild).
5. Bindingagreiningar í glasi byggjast á beinni víxlverkun efnis við tiltekinn bindistað fyrir viðtakabindil sem stýrir genaumrituninni. Lykilþátturinn í bindingagreiningu á endurröðuðum viðtaka fyrir  $\alpha$ -estrógen úr mönnum (hrER $\alpha$ ) er að mæla getu geislamerks bindils ([<sup>3</sup>H]17 $\beta$ -estradiól) til að bindast estrógenviðtaka við stighækkandi styrkleika prófunaríðefnis (þ.e. samkeppni um bindingu). Prófunaríðefni sem búa yfir mikilli sækni í estrógenviðtakann (ER) keppa við geislamerka bindilinn við lægri styrk, samanborið við þau íðefni sem eru með minni sækni í viðtakann. Þessi greining samanstendur af tveimur mikilvægum þáttum: mettnarbindingatilraun (e. *saturation binding experiment*) til að lýsa eiginleikum breyta í víxlverkun milli viðtaka og bindils og skrá ER-sértækið og þar á eftir kemur samkeppnisháð bindingatilraun (e. *competitive binding experiment*) sem lýsir eiginleikum samkeppni milli prófunaríðefnis og geislamerks bindils við bindingu við ER.
6. Sýnt hefur verið fram á gildi og áreiðanleika CER1- og FW-bindingagreininganna fyrir ætlaðan tilgang þeirra með fullgildingarrannsóknunum (2. heimild).
7. Skilgreiningar og skammstafanir sem notaðar eru í þessari prófunaraðferð eru settar fram í 1. viðbæti.

#### Gildissvið og takmarkanir í tengslum við viðtakabindingargreiningar

8. Lagt er til að þessar greiningar séu notaðar við skimun og forgangs röðun en þær geta einnig veitt upplýsingar um sameindaræsingu sem hægt er að nota við greiningu á vægi rökstuddra vísbendinga. Þær varða bindingu íðefnis við bindisvæði ER $\alpha$ -bindilsins í prófunarkerfi í glasi. Niðurstöðurnar skal því ekki yfirfæra beint á flókin boð og stýringu óskaddaða innkirtlakerfisins í lífi.
9. Binding náttúrulega bindilsins 17 $\beta$ -estradióls er fyrsta stigið í röð sameindaviðburða sem virkja umritun markgena og ná að lokum hámarki með lífeðlisfræðilegri breytingu (9. heimild). Þar af leiðandi telst binding við bindisvæði ER $\alpha$ -bindilsins vera eitt af lykilgangvirkjum estrógenviðtakabundinnar innkirtlatruflunar þó að innkirtlatruflun geti orsakast vegna annarra gangvirkja, þ.m.t. eru i. víxlverkanir við önnur ER $\alpha$ -svæði en bindingargrúp (e. *binding pocket*) bindilsins, ii. víxlverkanir við aðra viðtaka sem skipta máli fyrir boðmiðlun estrógens, ER $\beta$ -viðtaka og G-próteintengda estrógenviðtaka, aðra viðtaka og ensímkerfi innan innkirtlakerfisins, iii. hormónanýmyndun, iv. efnaskiptavirkjun og/eða óvirkjun hormóna, v. dreifing hormóna í markvefi og vi. úthreinsun hormóna úr líkamanum. Engin greininganna í þessari prófunaraðferð varðar þessa verkunarhætti.

10. Þessi prófunaraðferð varðar getu efna til að bindast viðtaka fyrir  $\alpha$ -estrógen ( $ER\alpha$ ) úr mönnum og gerir ekki greinarmun á  $ER\alpha$ -örvum eða -blokkum. Þessi greining varðar ekki heldur frekari atburði þar fyrir aftan, s.s. genaumritun eða lífeðlisfræðilegar breytingar. Að teknu tilliti til þess að einungis stök efni með einum efnisþætti voru notuð í fullgildingunni hefur ekki verið fjallað um nothæfið fyrir prófunarblöndur. Fræðilega séð teljast greiningarnar samt sem áður nothæfar til prófunar á fjölpáttæfnum og blöndum. Áður en þessi aðferð til prófunar á blöndu, sem er framkvæmd til að fá gögn sem fyrirhugað er að nota í eftirlitsskyni, er notuð skal skoðað hvort, og þá af hverju, hún gæti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi. Ekki er þörf á slíkri skoðun ef prófun á blöndunni er krafa af hálfu eftirlitsyfirvalda.
11. Frumulaus viðtakakerfi eru ekki með eðlislæga efnaskiptagetu og þau voru ekki fullgilt í samsetningu með efnaskiptaensímkerfum. Þó er mögulega hægt að fella ensímvírkni inn í hönnun rannsóknar en slíkt myndi útheimta frekara framtak til fullgildingar.
12. Ekki má prófa íðefni sem geta mengað prótínið (þ.e. viðtakaprótín), s.s. yfirborðsvírt efni eða íðefni sem geta breytt sýrustigi greiningarjafnalausnarinnar, eða þá að einungis má prófa þau í styrk sem er laus við slíkar víxlverkanir. Að öðrum kosti myndi styrkbilið, sem hægt er að prófa í greiningunum fyrir prófunaríðefni, takmarkast af leysni þess í greiningarjafnalausninni.
13. Prófunarniðurstöðurnar fyrir efnin 24, sem voru prófuð í báðum fullgiltu greiningunum sem lýst er í þessari prófunaraðferð, eru gefnar upp í töflu 1 í upplýsingaskyni. Byggt á birtum skýrslum, þ.m.t. um greiningar í glasi á ER-umritunarkjör og/eða greiningunni á legörvun (9.–15. heimild), eru 17 af þessum efnum flokkuð sem efni sem bindast estrógenviðtaka (ER) og 6 sem efni sem bindast ekki. Að því er varðar gögnin sem eru tekin saman í töflu 1 var næstum því 100% samkvæmni milli greininganna tveggja varðandi flokkun allra efnanna upp að  $10^{-4}M$  og hvert efni var rétt flokkað sem efni sem binst eða binst ekki ER. Viðbótarupplýsingar um þennan flokk efna, sem og um viðbótarefni sem voru prófuð í estrógenviðtakabindingagreiningum (ER-bindingagreiningum) í fullgildingarrannsóknunum, koma fram í nothæfisstöðlum fyrir hrER-bindingagreininguna (3. heimild) í 2. viðbæti (töflur 1, 2 og 3).



Tafla 1

Flokkun í efni sem bindast eða bindast ekki við estrógenviðtaka (ER) samkvæmt prófun í FW- og CERI-hrER-bindingagreiningum ásamt samanburði við þá svörun sem búist er við

	Efnaheiti	CAS-númer	Svörun sem búist var við	FW-greining		CERI-greining		MeSH-iðefnaflokkur	Vöruflokkur
				Styrkbil (M)	Flokkun	Styrkbil (M)	Flokkun		
1	17β-estradiól	50-28-2	Binst	1x10 <sup>-11</sup> –1x10 <sup>-6</sup>	Binst	1x10 <sup>-11</sup> –1x10 <sup>-6</sup>	Binst	Steri	Lyf, efni til dýralækninga
2	Noretýnóndrel	68-23-5	Binst	3x10 <sup>-9</sup> –30x10 <sup>-4</sup>	Binst	3x10 <sup>-9</sup> –30x10 <sup>-4</sup>	Binst	Steri	Lyf, efni til dýralækninga
3	Noretíndrón	68-22-4	Binst	3x10 <sup>-9</sup> –30x10 <sup>-4</sup>	Binst	3x10 <sup>-9</sup> –30x10 <sup>-4</sup>	Binst	Steri	Lyf, efni til dýralækninga
4	Dí-n-bútýlþalat	84-74-2	Binst ekki (*)	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-4</sup>	Binst ekki (**) (†)	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-4</sup>	Binst ekki (**) (†)	Vetniskolefni (hringað), estri	Mýkiefni, milliefni
5	DES	56-53-1	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	Vetniskolefni (hringað), fenól	Lyf, efni til dýralækninga
6	17α-etýnýlestradiól	57-63-6	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	Steri	Lyf, efni til dýralækninga
7	Mesó-Hexestról	84-16-2	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	Vetniskolefni (hringað), fenól	Lyf, efni til dýralækninga
8	Genistein	446-72-0	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	Vetniskolefni (hringað), flavonólíð	Náttúruvara
9	Ekvól	531-95-3	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	Plöntuestrógenumbrotsefni	Náttúruvara
10	Bútýlparaben (n-bútýl-4-hýdroxýbensóat)	94-26-8	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	Paraben	Rotvarnarefni

	Efnaheiti	CAS-númer	Svörun sem búist var við	FW-greining		CERI-greining		MeSH-iðefnaflokkur	Vöruflokkur
				Styrkbil (M)	Flokkun	Styrkbil (M)	Flokkun		
11	Nónýlfenól (blanda)	84852-15-3	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	Alkýlfenól	Milliefni
12	o,p'-DDT	789-02-6	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	Lífræn klórsambönd	Skordýraeitur
13	Kortikósterón	50-22-6	Binst ekki (*)	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-4</sup>	Binst ekki	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-4</sup>	Binst ekki	Steri	Náttúruvara
14	Searalenón	17924-92-4	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	Vetniskolefni (hringað), laktón	Náttúruvara
15	Tamoxífen	10540-29-1	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	Vetniskolefni, (hringað)	Lyf, efni til dýralækninga
16	5α-díhýdrótestósterón	521-18-6	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	Steri, ekki fenól	Náttúruvara
17	Bisfenól A	80-05-7	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	Fenól	Milliefni
18	4-n-heptylfenól	1987-50-4	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Tvívrað (a)	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	Alkýlfenól	Millihraði
19	Kepón (klórdekón)	143-50-0	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	Vetniskolefni, (halógenað)	Plágueyðir
20	Bens[a]antrasen	56-55-3	Binst ekki	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst ekki (b)	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst ekki (b)	Arómatísk vetniskolefni	Millihraði
21	Enterólaktón	78473-71-9	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Binst	Plöntuestrógen	Náttúruvara
22	Prógesterón	57-83-0	Binst ekki (*)	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-4</sup>	Binst ekki	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-4</sup>	Binst ekki	Steri	Náttúruvara

	Efnaheiti	CAS-númer	Svörun sem búið var við	FW-greining		CERI-greining		MeSH-iðefnaflokkur	Vöruflokkur
				Styrkbil (M)	Flokkun	Styrkbil (M)	Flokkun		
23	Oktýltríetoxýsílan	2943-75-1	Binst ekki	$1 \times 10^{-10}$ – $1 \times 10^{-3}$	Binst ekki	$1 \times 10^{-10}$ – $1 \times 10^{-3}$	Binst ekki	Sílan	Yfirborðsbreytiefni
24	Atrasín	1912-24-9	Binst ekki (*)	$1 \times 10^{-10}$ – $1 \times 10^{-4}$	Binst ekki	$1 \times 10^{-10}$ – $1 \times 10^{-4}$	Binst ekki	Heturhringliða samband	Illgresiseyðir

(\*) Leysnimörk  $< 1 \times 10^{-4} \text{M}$ .

(\*\*) Notkun og flokkun á dí-n-bútýlþalat (DBP) sem efni sem binst ekki var byggt á prófun allt upp að  $10^{-4} \text{M}$  af því að komið hafði í ljós á nokkrum rannsóknarstofum í forfullgildingarrannsóknunum að efnið var óleysanlegt við  $10^{-3} \text{M}$  (t.d. grugg).

(†) Í fullgildingarrannsókninni var dí-n-bútýlþalat (DBP) prófað sem kóðað prófunarefni í styrk sem nam allt að  $10^{-3} \text{M}$ . Við þessi skilyrði kom í ljós á nokkrum rannsóknarstofum annað hvort minnkun á bindingu geislamerktis bindils við hæsta styrk ( $10^{-3} \text{M}$ ) og/eða tvíræð ferilaðlög. Í þessum keyrslum var dí-n-bútýlþalat (DBP) flokkað sem „tvírætt“ eða „binst“ í 3/5 rannsóknarstofum sem notuðu CERI-greininguna og í 5/6 rannsóknarstofum sem notuðu FW-greininguna (sjá tilvísun (2. heimild), a- og b-lið 3 liðar í B-lið í IV. þætti og A-lið VI. liðar).

(a) Flokkunin var ekki í samræmi við þá flokkun sem búið var við. Flokkun 4-n-heptýlfenóls sem „tvírætt“ eða „binst ekki“ í 3/5 rannsóknarstofum leiddi af sér meðalflokkun sem „tvírætt“. Nánari skoðun leiddi í ljós að þetta stafaði af takmörkunum á leysni iðefnis sem kom í veg fyrir að ferillinn sýndi fulla bindingu.

(b) Í fullgildingarrannsókninni var bens[*a*]antrasen endurflokkað sem efni sem binst ekki (þ.e. neikvætt) á grundvelli birtra skrifa þar sem sýnt er fram á að estrógenlík virkni í *glasi* sem greint var frá vegna þessa efnis byggist fyrst og fremst á efnaskiptavirkjun þess. Ekki er gert ráð fyrir ensímefnaskiptavirkjun efnisins í frumulausum hrER-bindingagreiningum eins og eru notaðar í þessum fullgildingum milli stofa. Þar af leiðandi er rétt flokkun á þessu efni „binst ekki“ þegar það er notað við tilraunaskilyrði í FW- og CERI-greiningum.

**ÞÆTTIR hrER-BINDINGAGREININGAR****Grundvallarþættir greiningar**

14. Þessi prófunaraðferð gildir um greiningar þar sem notaðir eru ER-viðtaki og hæfilega sterkur bindill fyrir viðtakann sem hægt er að nota sem marka/sporefni fyrir greininguna og sem hægt er að ryðja burtu við stighækkandi styrkleika prófunaríðefnis. Bindingagreiningar innihalda eftirfarandi tvo mikilvæga þætti: 1) mettunarbindingu og 2) samkeppnisháða bindingu. Mettunarbindingagreining er notuð til að staðfesta sértæki og virkni viðtökuefnablandna en samkeppnisháð bindingatilaun er notuð til að meta getu prófunaríðefnis til að bindast hrER.

**Samanburðir**

15. Lýsa skal grundvellingum fyrir tillagt samskeiða viðmiðunarestrógen og samanburði. Samskeiða samanburðir (leysir (burðarefni), jákvætt (efni sem binst ER; sterk og veik sækni), neikvætt (efni sem binst ekki)), eins og við á, gefa vísbendingu um að greiningin er virk við prófunarskilyrðin og eru grundvöllur fyrir samanburð á tilraunum; þeir eru yfirleitt hluti af viðmiðunum fyrir ásættanleika fyrir tiltekna tilraun (1. heimild). Í einum bakka, við hverja keyrslu, skulu vera allir styrkleikar í styrkferlum viðmiðunarestrógensins og samanburðanna (þ.e. binst veikt og binst ekki). Allir aðrir bakkar skulu innihalda: 1) háan (geislamerktum bindli u.þ.b. alveg rutt frá) og miðlungsháan (u.þ.b. IC<sub>50</sub>) styrk af E2 og efni sem binst veikt, þrjú sett af hverju; 2) samanburð með leysi og ósértæku bindiefni, þrjú sett af hverju.

**Staðlað verklag við gæðaeftirlit**

16. Staðlað verklag við gæðaeftirlit skal framkvæmt eins og lýst er fyrir hverja greiningu til að tryggja að viðtakar séu virkir, rétta styrkleika íðefna, að vikmarkamörkin haldist stöðug gegnum margar endurtekningar og til að halda getunni til að veita þá ER-bindingasvörun sem búist var við yfir lengri tíma.

**Sýnt fram á hæfni rannsóknarstofu**

17. Áður en óþekkt íðefni eru prófuð með einhverri af greiningunum í þessari prófunaraðferð skal hver rannsóknarstofa sýna fram á hæfni við notkun greiningarinnar með því að framkvæma mettunargreiningar til að staðfesta sértæki og virkni ER-efnablöndunnar og samkeppnisháðar bindingagreiningar með viðmiðunarestrógeninu og samanburðunum (efni sem binst veikt og efni sem binst ekki). Rannsóknarstofan skal koma á fót sögulegum gagnagrunni með niðurstöðum um viðmiðunarestrógenið og samanburðina sem verða til úr 3 til 5 sjálfstæðum tilraunum sem eru gerðar á mismunandi dögum. Þessar tilraunir verða grunnur rannsóknarstofunnar fyrir viðmiðunarestrógenið og rannsóknarsögulega samanburði og verða notaðar sem mat að hluta til á ásættanleika greiningarinnar fyrir keyrslur í framtíðinni.
18. Svörunargeta prófunarkerfisins verður einnig staðfest með því að prófa hæfnisefnin sem eru talin upp í töflu 2. Skráin yfir hæfnisefnin er hlutmengi viðmiðunarefnanna sem eru tilgreind í nothæfisstöðlunum fyrir ER-bindingagreiningarnar (3. heimild). Þessi efni fást á almennum markaði, eru úr þeim flokkum íðefna sem eru almennt tengdir ER-bindingavirkni, sýna viðeigandi mátt fyrir þann styrk sem búist var við fyrir efni sem bindast ER (þ.e. sterk yfir í veik) eða ekki (þ.e. neikvæð). Að því er varðar hvert hæfnisefni skulu styrkleikarnir sem eru prófaðir spanna styrkbilin sem eru gefin upp í töflu 2. Gera skal a.m.k. þrjár tilraunir fyrir hvert efni og niðurstöðurnar skulu vera í samræmi við þá virkni íðefnisins sem búist var við. Hver tilraun skal gerð aðskilið (þ.e. með nýjum þynningum af viðtaka, íðefnum og prófefni) með þremur samhlíða prófunum fyrir hvern styrkleika. Sýnt er fram á hæfni með rétttri flokkun (jákvætt/neikvætt) á hverju hæfnisefni. Hver tæknimaður skal framkvæma hæfnispröfun þegar hann lærir á greiningarnar.

Tafla 2

Skrá yfir samanburði og hæfnisefni fyrir samkeppnisháðar hrER-bindingagreiningar <sup>(1)</sup>

Nr.	Efnaheiti	CAS-númer <sup>(2)</sup>	Svörun sem búist var við <sup>(3)</sup> <sup>(4)</sup>	Styrkbil prófunar (M)	MeSH-iðefnaflokkur <sup>(5)</sup>	Vöruflokkur <sup>(6)</sup>
<b>Samanburðir (viðmiðunarestrógen, efni sem binst veikt, binst ekki)</b>						
1	17β-estradíól	50-28-2	Binst	1x10 <sup>-11</sup> –1x10 <sup>-6</sup>	Steri	Lyf, efni til dýralækninga
2	Noretýnóðrel eða noretíndrón	68-23-5 (eða) 68-22-4	Binst	3x10 <sup>-9</sup> –30x10 <sup>-6</sup>	Steri	Lyf, efni til dýralækninga
3	Oktýltriétoxýsílán	2943-75-1	Binst ekki	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Sílan	Yfirborðsbreytiefni
<b>Hæfnisefni <sup>(6)</sup></b>						
4	Díetýlstílbóestról	56-53-1	Binst	1x10 <sup>-11</sup> –1x10 <sup>-6</sup>	Vetniskolefni (hringað), fenól	Lyf, efni til dýralækninga
5	17α-etýnýlestradíól	57-63-6	Binst	1x10 <sup>-11</sup> –1x10 <sup>-6</sup>	Steri	Lyf, efni til dýralækninga
6	Mesó-Hexestról	84-16-2	Binst	1x10 <sup>-11</sup> –1x10 <sup>-6</sup>	Vetniskolefni (hringað), fenól	Lyf, efni til dýralækninga
7	Tamoxífen	10540-29-1	Binst	1x10 <sup>-11</sup> –1x10 <sup>-6</sup>	Vetniskolefni (hringað)	Lyf, efni til dýralækninga
8	Genistein	446-72-0	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Heturhringliða samband, flavonóíð	Náttúruvara

Nr.	Efnaheiti	CAS-númer <sup>(2)</sup>	Svörun sem búið var við <sup>(3)</sup> <sup>(4)</sup>	Styrkbil prófunar (M)	MeSH-iðefnaflokkur <sup>(5)</sup>	Vöruflokkur <sup>(6)</sup>
9	Bisfenól A	80-05-7	Binst	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Fenól	Milliefni
10	Searalónón	17924-92-4	Binst	1x10 <sup>-11</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Heturhringliða samband, laktón	Náttúruvara
11	Bútýlparaben	94-26-8	Binst	1x10 <sup>-11</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	Karboxýlsýra, fenól	Rotvarnarefni
12	Atrasín	1912-24-9	Binst ekki	1x10 <sup>-11</sup> –1x10 <sup>-6</sup>	Heturhringliða samband	Illgresiseyðir
13	Dí-n-bútýlpalat (DBP) <sup>(7)</sup>	84-74-2	Binst ekki <sup>(8)</sup>	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-4</sup>	Vetniskolefni (hringað), estri	Mýkiefni, milliefni
14	Kortikósterón	50-22-6	Binst ekki	1x10 <sup>-11</sup> –1x10 <sup>-4</sup>	Steri	Náttúruvara

<sup>(1)</sup> Ef hæfnisefni fæst ekki lengur á almennum markaði er hægt að nota efni með sömu flokkun ER-bindinga, sambærilegan mátt og iðefnaflokk.

<sup>(2)</sup> Skammstafanir: CAS-númer = Skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um iðefni.

<sup>(3)</sup> Flokkun sem efni sem binst ER $\alpha$  eða efni sem binst því ekki í fullgildingarrannsókninni fyrir CERI- og FW-hrER-bindingagreiningarnar.

<sup>(4)</sup> ER-bindingavirknin var byggð á bakgrunnsskjölum vegna endurskoðunar samræmingarnefndar stofnana um fullgildingu staðgönguáðferða á ER-bindingagreiningum og TA-greiningum (9. heimild) sem og á gögnum sem byggð eru á athugunum og öðrum upplýsingum úr birtum og endurskoðuðum rannsóknum sem vísað er til ( 10.–15. heimild).

<sup>(5)</sup> Efnin voru flokkuð í einn eða fleiri iðefnaflokka með því að nota alþjóðlega þekkt flokkunarkerfi U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) (aðgengilegt á: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

<sup>(6)</sup> Efnin voru flokkuð í einn eða fleiri vöruflokka með því að nota gagnagrunn U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Database (aðgengilegt á: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>)

<sup>(7)</sup> Hægt er að nota dí-n-bútýlpalat (DBP) til samanburðar sem staðgönguefni sem binst ekki, prófað í hámarksstyrk sem nemur 10<sup>-4</sup> M.

<sup>(8)</sup> Leysnimörk fyrir þetta efni eru 10<sup>-4</sup> M. Notkun og flokkun á dí-n-bútýlpalati (DBP) sem efni sem binst ekki voru byggðar á prófun allt upp að 10<sup>-4</sup> M af því að komið hafði í ljós á nokkrum rannsóknarstofum í forfullgildingarrannsóknunum að efnið var óleysanlegt við 10<sup>-3</sup>M (t.d. grugg).

### Prófun á leysni og ákvörðun á styrkbili prófunaríðefna

19. Framkvæma skal upphafsprófun til að ákvarða leysnimörk fyrir hvert prófunaríðefni og til að finna viðeigandi styrkbil til að nota þegar prófunin er framkvæmd. Í upphafi skal ákvarða leysnimörk fyrir hvert prófunaríðefni í leysinum og staðfesta þau frekar við greiningarskilyrði. Lokastyrkurinn sem er prófaður í greiningunni skal ekki fara yfir 1 mM. Skammtastærðarrannsókn samanstendur af samanburði með leysi ásamt log 8 raðþynningum sem hefjast á leyfilegum hámarksstyrk (t.d. 1 mM eða lægri, byggt á leysnimörkunum) og veita skal því athygli hvort það sést grugg eða botnfall. Styrkleikar í annarri og þriðju tilraun skulu aðlagðir eins og við á til að lýsa betur eiginleikum ferils styrkháðrar svörunar.

### Viðmiðanir fyrir ásættanleika prófunarkeyrslu

20. Samþykki eða höfnun prófunarkeyrslu byggist á matinu á niðurstöðunum sem fást fyrir viðmiðunarestrógen og samanburði sem notaðir eru fyrir hverja tilraun. Í fyrsta lagi skulu allir styrkleikar í styrkferlum viðmiðunarsamanburðarins í hverri tilraun með bakka 1 vera í samræmi við mælingar á frammistöðu með ferilaðlögungarbreytum (t.d. IC<sub>50</sub> og Hill-hallagildi), byggt á niðurstöðunum sem greint er frá varðandi viðkomandi aðferðarlýsingar fyrir CERI- og FW-greiningarnar (2. og 3. viðbætur), og rannsóknarsögulegum samanburðargögnum frá rannsóknarstofunni sem framkvæmdi prófunina. Allur samanburður (viðmiðunarestrógen, efni sem binst veikt og binst ekki) skal vera flokkaður á réttan hátt fyrir hverja tilraun. Í öðru lagi þarf að meta samanburði á öllum síðari bökkum m.t.t. samkvæmni við bakka 1. Nota skal fullnægjandi styrkbil prófunaríðefnisins til að skilgreina á skýran hátt toppinn á ferli samkeppnisháðrar bindingar. Breytileiki í samhliða prófunum á hverjum styrkleika prófunaríðefnisins sem og í sjálfstæðu keyrslunum þremur skal vera hæfilegur og vísindalega forsvaranlegur. Sýna skal fram á getu til að framkvæma greininguna með samræmdum hætti með því að þróa og viðhalda sögulegum gagnagrunni fyrir viðmiðunarestrógen og samanburði. Nota má staðalfrávik eða fráviksstuðla fyrir meðaltal ferlanna fyrir viðmiðunarestrógen og samanburðarefni sem bindast veikt, og eru í samræmi við mæliþætti úr mörgum tilraunum, sem mælikvarða á samanburðarnákvæmni innan rannsóknarstofu. Nota skal sérfræðiálit þegar farið er yfir niðurstöður úr bakkasamanburði úr hverri keyrslu sem og með hverju prófunaríðefni.

Að auki skal uppfylla eftirfarandi meginreglur varðandi viðmiðanir fyrir ásættanleika:

- Gögnin skulu vera nægileg fyrir meginreglur mat á bindingu við ER
- Styrkleikarnir sem eru prófaðir skulu vera innan leysnisviðs prófunaríðefnisins

### Greining gagna

21. Skilgreint verklag fyrir greiningu gagna um mettunarbindingu og samkeppnisháða bindingu skulu vera í samræmi við helstu meginreglur um lýsingu á eiginleikum víxlverkunar milli viðtaka og bindils. Yfirleitt eru gögn um mettunarbindingu greind með því að nota ólínulegt aðhvarfslíkan þar sem tekið er tillit til samanlagðrar bindingar og ósértækrar bindingar. Við ákvörðun á hámarksfjölda bindistaða (B<sub>max</sub>) og klofnunarfasta (K<sub>d</sub>) getur verið nauðsynlegt að leiðrétta fyrir bindlatæmingu (e. *ligand depletion*) (t.d. Swillens, 1995 (19. heimild)). Gögnum úr samkeppnisháðum bindingagreiningum er yfirleitt umbreytt (t.d. hundradshlutfall sértækrar bindingar og styrkur prófunaríðefnis (log M)). Ákvarða skal áætlað log(IC<sub>50</sub>) fyrir hvert prófunaríðefni með því að nota viðeigandi ólínulegan ferilaðlögungarhugbúnað til að aðlaga Hill-jöfnu með fjórum breytum. Eftir upphaflega greiningu skal fá fram ferilaðlögungarbreytur og gera sjónræna skoðun á því hversu vel bindingagögnin falla að fengnum ferli samkeppnisháðrar bindingar. Í sumum tilvikum kann að vera þörf á viðbótargreiningum til að fá bestu ferilaðlögunguna (t.d. topp- og/eða botnþvingun ferilsins, notkun á 10% reglunni, sjá 4. viðbæti og 2. heimild (2. liður A-liðar í III. lið)).
22. Þegar viðmiðanir fyrir ásættanleika (20. liður) eru uppfylltar bendir það til þess að greiningarkerfið starfi á tilhlýðilegan hátt en það tryggir ekki að tiltekið próf gefi nákvæm gögn. Endurtekning réttra niðurstaðna úr fyrsta prófinu er besta vísbindingin um að nákvæm gögn hafi fengist.

**Almennar viðmiðanir um túlkun gagna**

23. Sem stendur er ekki til nein aðferð sem ríkir einhugur um til að túlka gögn um bindingu við ER. Bæði megindleg (t.d. efni sem binst/binst ekki) og/eða eigindleg (t.d. log IC<sub>50</sub>, hlutfallsleg bindingasækni (RBA) o.s.frv.) mót á hrER-bundinni virkni skulu þó byggð á gögnum sem byggð eru á athugunum og traustu vísindalegu mati.

**Prófunarskýrsla**

24. Eftirtaldir upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

*Greining:*

- greining sem er notuð,

*Samanburður/viðmiðunarefni/prófunaríðefni*

- uppruni, lotunúmer, síðasti notkunardagur, ef hann liggur fyrir,
- stöðugleiki prófunaríðefnisins, ef hann er þekktur,
- leysni og stöðugleiki prófunaríðefnisins í leysinum, ef þekkt,
- mæling á sýrustigi, osmólalstyrk og botnfellingu í ræktunarætinu sem prófunaríðefninu var bætt í, eins og við á.

*Efni með einum efnisþætti:*

- útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,
- efnafræðileg sanngreining, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.

*Fjölpáttæfni, UVCB-efni og blöndur:*

- lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.

*Leysir og burðarefni:*

- lýsing á eiginleikum (eðli, birgir og lota),
- rök fyrir vali á leysi eða burðarefni,
- leysni og stöðugleiki prófunaríðefnisins í leysinum/burðarefninu, ef þekkt.

*Viðtakar:*

- uppruni viðtaka (birgir, verðlistanr., lota, tegundir viðtaka, styrkur virks viðtaka sem birgir lætur í té, vottun frá birgi),



- lýsing á eiginleikum viðtaka (þ.m.t. niðurstöður mettnarbindingar):  $K_d$ ,  $B_{max}$ ,
- geymsla viðtaka,
- geislamerktur bindill:
- birgir, verðlistanr., lota, eðlisvirkni.

*Prófunarskilyrði:*

- takmarkanir á leysni við greiningarskilyrði,
- samsetning bindijafnalausnar,
- styrkur viðtaka,
- styrkur sporefnis (þ.e. geislamerkts bindils),
- styrkur prófunaríðefnis,
- hundraðshlutfall burðarefnis í lokagreiningunni,
- viðstöðuhitastig og -lengd sýnisins,
- aðferð við bundinn/óbundinn aðskilnað,
- neikvæð(ir) og jákvæð(ir) samanburðir/viðmiðunarefni,
- viðmiðanir til að meta hvort niðurstöður rannsókna séu jákvæðar, neikvæðar eða óvissar,

*Ásættanleikaathugun:*

- raunveruleg gildi  $IC_{50}$  og Hill-hallatölu fyrir samskeiða jákvæð(a) samanburði/viðmiðunarefni.

*Niðurstöður:*

- óunnin gögn og bundin/óbundin gögn,
- staðfestingarathugun á mengun, ef við á,
- lægsti hrifstyrkur, ef hann er fyrir hendi,
- hlutfallsleg bindisækni og/eða  $IC_{50}$ -gildi, eins og við á,
- tengsl milli styrks og svörunar, ef unnt er,
- tölfræðilegar greiningar, ef til eru, ásamt mælingu á skekkju og öryggi (t.d. staðalskekkja meðaltals, staðalfrávik, fráviksstuðlar eða 95% öryggisbil) og lýsing á því hvernig þessi gildi voru fengin.

*Umfjöllun um niðurstöðurnar:*

— beiting 10% reglunnar.

*Ályktun*

## **HEIMILDIR**

- 1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER $\alpha$ ), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER $\alpha$ ), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 5) Cavaillès V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, *Climacteric*, 5 Suppl 2: bls. 20-6.
- 6) Welboren W.J., et al. (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer.*, 16(4): bls. 1073-89.
- 7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): bls. 63-6.
- 8) Diamanti-Kandarakis et al. (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, *Endo Rev* 30(4):293-342.
- 9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: In Vitro Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.
- 10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of In Vitro Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- 11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of In Vitro Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- 12) Akahori Y. et al. (2008). Relationship Between the Results of In Vitro Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and In Vivo Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 225-231.

- 13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. bls. 1-188.
- 15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, Toxicol. Letters, 146: 111-120.
- 16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. Toxicol. Letters, 180: 213-221.
- 17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. Toxicol. and Applied Pharmacol., 196: 58-67.
- 18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. Chemosphere, 34: 835-848.
- 19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, Mol Pharmacol 47(6):1197-1203.

*I. viðbætur*

## SKILGREININGAR OG SKAMMSTAFANIR

**10% reglan:** Sá möguleiki að undanskilja gagnapunkta úr greiningunni þegar meðaltal samhliða prófana fyrir hundraðshlutfall sértækrar [3H]17β-estradiólbindingar er 10% eða meira yfir því sem kemur fram fyrir meðalgildið við lægri styrk (sjá 4. viðbæti).

**Viðmiðanir fyrir ásættanleika:** Lágmarksstaðlar fyrir nothæfi tilraunasamanburða og viðmiðunarstaðla. Allar viðmiðanir fyrir ásættanleika skulu uppfylltar til að tilraun teljist gild.

**Nákvæmni (samsvörun):** Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktum viðmiðunargildum niðurstöður úr greiningu eru. Þetta er mælikvarði á nothæfi greiningar og einn þáttur gildis. Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli rétttra niðurstaðna úr greiningu (1. heimild).

**CF:** Hugtakarammi Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir prófun og mat á innkirtlatruflandi efnum (e. *The OECD Conceptual Framework for the Testing and Evaluation of Endocrine Disruptors*).

**Íðefni:** Efni eða blanda.

**FS:** Frávíksstuðull.

**E2:** 17β-estradiól.

**IT:** Innkirtlatruflun.

**hERα:** Alfa-estrógenviðtaki í manneskjum.

**ER:** Estrógenviðtaki.

**Estrógenlík virkni:** Geta efnis til að herma eftir 17β-estradióli að því er varðar hæfni þess til að bindast estrógenviðtökum. Hægt er að greina bindingu við hERα með þessari prófunaraðferð.

**IC50:** Hálfur hámarkshrifstyrkur heftandi prófunaríðefnis.

**ICCVAM:** Samræmingarnefnd stofnana um fullgildingu staðgönguaðferða (ICCVAM-nefndin).

**Samanburðarnákvæmni milli stofa:** Mæling á því að hvaða marki mismunandi rannsóknarstofur með réttindi og hæfi, sem nota sömu aðferðarlýsingu og gera prófanir á sömu efnunum, komast að niðurstöðum sem eru eigindlega og meginlega samsvarandi. Samanburðarnákvæmni milli stofa, einnig kölluð fjölsetrasamanburðarnákvæmni, er ákvörðuð meðan á forfullgildingar- og fullgildingarferlinu stendur og gefur til kynna að hvaða marki tekst að flytja greiningu með fullnægjandi hætti á milli rannsóknarstofa (1. heimild).

**Samanburðarnákvæmni innan stofu:** Ákvörðun á því að hvaða marki fólki með réttindi og hæfi og á sömu rannsóknarstofu tekst með fullnægjandi hætti að fá sömu niðurstöður með notkun tilgreindrar aðferðarlýsingar á mismunandi tímum. Einnig kölluð „einseturssamanburðarnákvæmni“ (1. heimild).

**LEC:** Minnsti hrifstyrkur (e. *lowest effective concentration*) er minnsti styrkur prófunaríðefnis sem kallar fram svörun (þ.e. minnsti styrkur prófunaríðefnisins sem veldur tölfræðilegum mun á margfeldisaukningu vakningar miðað við samskeiða burðarefnissamanburðinn).

**Hliðstæð prófun (e. *Me-too test*):** Heiti úr talmáli á greiningu sem er sambærileg fullgiltum og samþykktum viðmiðunaraðferðum að skipulagi og virkni. Notað sem samheiti við „samsvarandi prófunaraðferð“.

**PBTG:** Viðmiðunaregla um prófanir byggð á nothæfi (e. *Performance-Based Test Guideline*).

**Nothæfissaðlar:** Staðlar, byggðir á fullgilttri prófunaraðferð, sem eru grundvöllur fyrir mat á samanburðarhæfi tillagðrar greiningar sem er samsvarandi fullgiltu greiningunni með tilliti til verkunarmáta og virkni. Meðal þeirra eru 1) grundvallarþættir greiningarinnar, 2) lágmarksskrá yfir viðmiðunariðefni sem valin eru úr þeim íðefnum sem voru notuð til að sýna fram á ásættalegt nothæfi fullgiltu prófunaraðferðarinnar og 3) gildin fyrir nákvæmni og áreiðanleika sem eru samsvarandi þeim sem fengust með fullgiltu prófunaraðferðinni og sem eiga að fást með tillögðu greiningunni þegar hún er metin út frá lágmarksskránni yfir viðmiðunariðefni (1. heimild).

**Hæfnisefni:** Hlutmengi viðmiðunarefnanna í nothæfisstöðlunum sem rannsóknarstofur geta notað til að sýna fram á tæknilega færni með staðlaðri greiningu. Valviðmiðanir að því er varðar þessi efni fela að jafnaði í sér að þau séu dæmigerð fyrir svörunarsviðið, séu fánleg á markaði og að með þeim séu tiltæk hágæða tilvísunargögn.

**Hæfni:** Sú geta sem sýnt er fram á til að framkvæma greiningu á tilhlýðilegan hátt fyrir prófun á óþekktum efnum.

**Viðmiðunarestrógen:** 17β-estradíól (E2, CAS-númer 50-28-2).

**Viðmiðunarprófunaraðferðir:** Greiningarnar sem viðmiðunaregla 493 um prófanir byggð á nothæfi byggir á.

**RBA:** Hlutfallsleg bindingasækni (e. *Relative Binding Affinity*). Hlutfallsleg bindingasækni (RBA) efnis er reiknuð út sem hundraðshlutfall  $\log(\text{IC}_{50})$  fyrir efnið í hlutfalli við  $\log(\text{IC}_{50})$  fyrir 17β-estradíól.

**Gildi:** Lýsing á sambandi greiningar og áhrifanna sem miðað er við og hvort sambandið hefur merkingu og er gagnlegt miðað við tiltekinn tilgang. Gildið lýsir því að hvaða marki greiningin nær að mæla rétt eða spá fyrir um líffræðilegu áhrifin sem miðað er við. Gildi felur í sér umfjöllun um nákvæmni (samsvörun) greiningar (1. heimild).

**Áreiðanleiki:** Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma greiningu með samanburðarnákvæmni innan og milli mismunandi rannsóknarstofa yfir lengri tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Hann er metinn með því að reikna út samanburðarnákvæmni innan stofu og milli stofa.

**SD:** Staðalfrávik.

**Prófunariðefni:** Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

**Fullgilt prófunaraðferð:** Greining sem búið er að ljúka fullgildingarrannsóknum fyrir til að ákvarða gildi hennar (þ.m.t. nákvæmni) og áreiðanleika í tilteknum tilgangi. Mikilvægt er að taka mið af því að fullgilt prófunaraðferð er e.t.v. ekki nægilega nothæf, með tilliti til nákvæmni og áreiðanleika, til að teljast ásættaleg fyrir fyrirhugaðan tilgang (1. heimild).

**Fullgilding:** Ferlið sem staðfestir áreiðanleika og gildi tiltekinnar nálgunar, aðferðar, greiningar, verklags eða mats í skilgreindum tilgangi.

## 2. viðbætur.

FREYBERGER-WILSON-GREININGAR Í GLASI Á ESTRÓGENVIÐTAKAMETTUN (ER $\alpha$ ) OG SAMKEPPNISHÁÐRI BINDINGU MEÐ NOTKUN Á ENDURRAÐAÐS ER $\alpha$  Í FULLRI LENGÐ

ATRÍÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI (SJÁ EINNIG „ALMENNUR INNGANGUR“)

1. Í þessari greiningu í glasi á estrógenviðtakamettun og samkeppnisháðri bindingu er notuð full lengd  $\alpha$ -estrógenviðtaka (ER $\alpha$ ) í mönnum (hrER $\alpha$ ) sem er framleiddur í og einangraður úr bakúlóveirusýktum skordýrafrumum. Aðferðarlýsingin, sem Freyberger og Wilson þróuðu, fór í gegnum alþjóðlega fullgildingarrannsókn hjá mörgum rannsóknarstofum (2. heimild) sem sýndi fram á gildi hennar og áreiðanleika í fyrirhuguðum tilgangi greiningarinnar.
2. Þessi greining er kembirannsókn til að greina efni sem geta bundist við hrER $\alpha$  í fullri lengd. Hún er notuð til að ákvarða getu prófunaríðfnis til að keppa við 17 $\beta$ -estradiól um bindingu við hrER $\alpha$ . Meginlegar greiningarniðurstöður geta náð yfir IC<sub>50</sub> (mæling á styrk prófunaríðfnis sem þörf er á til að ryðja helmingnum af [3H]-17 $\beta$ -estradiólinu burtu frá hrER $\alpha$ ) og hlutfallslega bindingasækni prófunaríðfna við hrER $\alpha$  samanborið við 17 $\beta$ -estradiól. Af ástæðum sem varða efnafræðilegar kembirannsóknir geta ásættanlegar eigindlegar niðurstöður úr greiningum náð yfir flokkun á prófunaríðfnum í efni sem bindast hrER $\alpha$ , bindast ekki eða binding er tvíræð, á grundvelli viðmiðana sem lýst er fyrir bindingarferlana.
3. Í greiningunni er notaður geislavirkur bindill sem útheimtir að rannsóknarstofan sé með leyfi fyrir geislavirkum efnum. Allt verklag í tengslum við geislavirkar samsætur og hættuleg íðefni skal fylgja reglugerðum og verklagsreglum eins og lýst er í landslöggjöf.
4. Lesa skal „ALMENNUR INNGANGUR“ og „ÞÆTTIR hrER-BINDINGAGREININGAR“ áður en þessi greining er notuð í eftirlitsskyni. Skilgreiningar og skammstafanir, sem notaðar eru í þessari viðmiðunarreglu um prófanir, koma fram í 1. viðbæti.

MEGINREGLUR GREININGARINNAR (SJÁ EINNIG „ALMENNUR INNGANGUR“)

5. Bindingagreiningin hrER $\alpha$  mælir getu geislamerks bindils ([3H]17 $\beta$ -estradiól) til að bindast estrógenviðtaka (ER) við stighækkandi styrkleika prófunaríðfnis (þ.e. keppinautar um bindingu). Prófunaríðfni sem búa yfir mikilli sækni í estrógenviðtakann (ER) keppa við geislamerкта bindilinn við lægri styrk, samanborið við þau íðefni sem eru með minni sækni í viðtakann.
6. Þessi greining samanstendur af tveimur mikilvægum þáttum: mettnarbindingatilraun til að lýsa eiginleikum mælipátta fyrir víxlverkun milli viðtaka og bindils og þar á eftir kemur samkeppnisháð bindingatilraun sem lýsir eiginleikum samkeppni milli prófunaríðfnis og geislamerks bindils við bindingu við estrógenviðtakann (ER).
7. Tilgangurinn með mettnarbindingatilrauninni er að lýsa einkennum tiltekinnar lotu af viðtökum m.t.t. bindingasækni og fjölda til undirbúnings fyrir samkeppnisháðu bindingatilraunina. Í mettnarbindingatilrauninni eru mæld, við jafnvægisástand, sækni estrógenviðtaka með föstum styrk í náttúrulegan bindil sinn (táknaður með klofnunarfasta (Kd)) og styrkur virkra viðtakasvæða (Bmax).
8. Í samkeppnisháðu bindingatilrauninni er mæld sækni efnis til að keppa við [3H]17 $\beta$ -estradiól um bindingu við estrógenviðtakann (ER). Sæknin er magngreind með styrk prófunaríðfnis sem, við jafnvægi, heftir 50% af sértækri bindingu [3H]17 $\beta$ -estradióls (kallað „heftistyrkur 50%“ eða IC<sub>50</sub>). Þetta er einnig hægt að meta með því að nota hlutfallslega bindingasækni (RBA í hlutfalli við IC<sub>50</sub> fyrir estradiól mælt aðskilið í sömu keyrslu). Í samkeppnisháðu bindingatilrauninni er mæld binding [3H]17 $\beta$ -estradióls við fastan styrk með breiðu sviði (átta tugaprep) prófunaríðfnisstyrkleika. Síðan eru gögnin aðlögðuð, ef unnt er, í samræmi við Hill-jöfnuna (Hill, 1910) sem lýsir því hvernig samkeppnisháður bindill, sem binst við einn stað, ryður geislamerкта bindilinum burtu. Umfang þess að geislamerktu estradióli er rutt í burt, við jafnvægi, er notað til að lýsa einkennum prófunaríðfnisins sem efni sem binst, binst ekki eða gefur tvíræða svörun.

## VERKFERLI

Sýnt fram á ásættanlegt nothæfi hrER $\alpha$ -prótíns

9. Áður en mettnarbindingagreiningar og samkeppnisháðar bindingagreiningar eru framkvæmdar venjubundið skal sýna fram á að nothæfi hverrar nýrrar lotu af hrER $\alpha$  sé með réttum hætti í rannsóknarstofunni þar sem hún verður notuð. Nota skal tveggja þrepa ferli til að sýna fram á nothæfi. Þessi þrep eru eftirfarandi:
- Gera skal [3H]-17 $\beta$ -estradiól-mettunarbindingagreiningu til að sýna fram á sértæki og mettnun hrER $\alpha$ . Ólínuleg aðhvarfsgreining á þessum gögnum (t.d. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) og þar á eftir Scatchard-línurit ætti að sýna hrER $\alpha$ -bindingasækni [3H]-17 $\beta$ -estradióls (Kd) og fjölda viðtaka (Bmax) fyrir hverja lotu af hrER $\alpha$ .
  - Gera skal samkeppnisháða bindingagreiningu með því að nota samanburðarefnin (viðmiðunarestrógen (17 $\beta$ -estradiól)), efni sem binst veikt (t.d. noretýnóðrel eða noretíndrón) og efni sem binst ekki (oktýltríetóoxýsílán (OTES)). Hver rannsóknarstofa skal koma á fót vísindasögulegum gagnagrunni til að skrá samkvæmni IC<sub>50</sub> og annarra gilda sem skipta máli fyrir viðmiðunarestrógenið og efni sem bindast veikt í mismunandi tilraunum og mismunandi lotum hrER $\alpha$ . Mælipættirnir fyrir ferla samkeppnisháðrar bindingar fyrir samanburðarefnin skulu vera innan markanna fyrir 95% öryggisbilið (sjá töflu 1) sem voru þróuð með notkun gagna frá rannsóknarstofum sem tóku þátt í fullgildingarrannsókninni fyrir þessa greiningu (2. heimild).

Tafla 1

## Nothæfisviðmiðanir sem voru þróaðar fyrir viðmiðunarestrógen og efni sem bindast veikt, FW-hrER-bindingagreining

Efni	Mælipáttur	Meðaltal (a)	Staðalfrávik (n)	95% öryggisbil (b)	
				Neðri mörk	Efri mörk
17 $\beta$ -estradiól	Toppur (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Botn (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hill-hallagildi	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	LogIC <sub>50</sub> (M)	-8,92 (c)	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Noretýnóðrel	Toppur (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Botn (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hill-hallagildi	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	LogIC <sub>50</sub> (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretíndrón (c)	Toppur (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Botn (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hill-hallagildi	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	LogIC <sub>50</sub> (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

- a) Meðaltal (n)  $\pm$  staðalfrávik (SD) voru reiknuð út með því að nota áætlaðar ferilaðlögunarbreitur (Hill-jafna með 4 breytum) fyrir samanburðarkeyrslur sem voru gerðar í fjórum rannsóknarstofum meðan fullgildingarrannsóknin stóð yfir (sjá N-viðauka í 2. heimild).
- b) Gefið er 95% öryggisbil sem leiðbeiningar vegna viðmiðana fyrir ásættanleika.
- c) Prófun á noretíndróni var valkvæð sem undirverkefni 4 meðan fullgildingarrannsóknin stóð yfir (sjá 2. heimild, sjá undirverkefni 4). Þess vegna var meðaltalið  $\pm$  SD (n) reiknað út með því að nota áætlaða ferilaðlögungu (Hill-jafna með 4 breytum) fyrir samanburðarkeyrslur sem voru gerðar í tveimur rannsóknarstofum. Styrkbilið fyrir IC<sub>50</sub> verður háð Kd fyrir viðtakaefnablönduna og styrk geislamerka bindilsins sem er notaður innan hverrar rannsóknarstofu. Viðeigandi aðlögungu á styrkbili IC<sub>50</sub>, byggt á þeim skilyrðum sem eru notuð til að framkvæma greininguna, er ásættanleg.

**Sýnt fram á hæfni rannsóknarstofu**

10. Sjá 17. og 18. lið og töflu 2 í „ÞÆTTIR hrER-BINDINGAGREININGAR“ í þessari prófunaraðferð. Hver greining (mettunarbinding og samkeppnisháð binding) skal samstanda af þremur sjálfstæðum keyrslum (þ.e. með nýjum þynningum af viðtaka, íðefnum og prófefnum) á mismunandi dögum og hver keyrsla skal innihalda þrjár samhliða prófanir.

**Ákvörðun á styrk viðtaka (hrER $\alpha$ )**

11. Styrkleiki virks viðtaka er eilítið breytilegur eftir lotu og geymsluskilyrðum. Af þessum sökum skal ákvarða styrkleika virks viðtaka sem er móttekinn frá birgi. Þá fæst viðeigandi styrkleiki virka viðtakans þegar keyrslan er framkvæmd.
12. Nafnstyrkur sem nemur 0,25, 0,5, 0,75 og 1 nM af viðtaka skal látinn standa án (samanlögð binding) og með (ósértæk binding) 1  $\mu$ M af ómerktu estradíóli við skilyrði sem samsvara samkeppnisháðri bindingu (þ.e. 1 nM [3H]-estradíól). Sértek binding, reiknuð út sem mismunurinn á samanlagðri bindingu og ósértækri bindingu, er teiknuð upp á mótí nafnstyrk viðtakans. Styrkur viðtaka, sem gefur sértek bindingagildi sem svara til 20% af viðbættum geislamerktum bindli, tengist samsvarandi nafnstyrk viðtakans og þessi styrkur viðtakans skal notaður í mettunarbindingatilraunum og samkeppnisháðum bindingatilraunum. Lokastyrkur sem nemur 0,5 nM fyrir hrER uppfyllir oft þetta skilyrði.
13. Ef það kemur ítrekað fyrir að ekki er hægt að uppfylla 20% viðmiðunina skal kanna fyrirkomulag tilraunarinnar m.t.t. hugsanlegrar skekkju. Ef 20% viðmiðunin næst ekki getur það bent til þess að mjög lítið sé af virkum viðtaka í raðbrigðalotunni og þá skal íhuga að nota aðra viðtakalotu.

**Mettunargreining**

14. Átta stighækkandi styrkleikar af [3H]17 $\beta$ -estradíóli skulu metnir í þremur settum samkvæmt eftirfarandi þrenns konar skilyrðum (sjá töflu 2):
- Án ómerkts 17 $\beta$ -estradíóls og með estrógenviðtaka (ER). Þetta er ákvörðun á samanlagðri bindingu með því að mæla geislavirkni í holum sem innihalda einungis [3H]17 $\beta$ -estradíól.
  - Með styrkleika af ómerktu 17 $\beta$ -estradíóli sem er 1000-falt yfir styrkleika merkts 17 $\beta$ -estradíóls og með estrógenviðtaka (ER). Tilgangurinn með þessu skilyrði er að metta virku bindistaðina með ómerktu 17 $\beta$ -estradíóli og ákvarða ósértæku bindinguna með því að mæla geislavirknina í holunum. Lítið er svo á að allt heitt (geislavirkt) estradíól sem eftir er, sem getur bundist viðtakanum, sé bundið á ósértækum stað þar eð kalt (ógeislavirkt) estradíól ætti að vera af það miklum styrk að það binst við alla tiltæka sérteka staði á viðtakanum.
  - Án ómerkts 17 $\beta$ -estradíóls og án estrógenviðtaka (ER) (ákvörðun á heildargeislavirkni).

Tilreiðsla á lausnum með [3H]-17 $\beta$ -estradíóli og ómerktu 17 $\beta$ -estradíóli

15. Þynningar 17 $\beta$ -estradíóls skulu tilreiddar með því að bæta greiningarjafnalausn við 12 nM stofnlausn af [3H]-17 $\beta$ -estradíóli til að fá styrk sem er upphaflega á bilinu frá 0,12nM til 12 nM. Með því að bæta 40  $\mu$ l af þessum lausnum við tilsvandi greiningarholur í 96-hola míkrotítunarbakka (endanlegt rúmmál nemur 160  $\mu$ l), næst lokagreiningarstyrkleiki á bilinu frá 0,03 til 3,0 nM. Tilreiðslu greiningarjafnalausnar, [3H]-17 $\beta$ -estradíólstofnlausnar og þynninga og ákvörðun á styrkleikum er lýst ítarlega í FW-aðferðarlýsingunni (2. heimild).
16. Þynningar etanól-17 $\beta$ -estradíóllausna skulu tilreiddar með því að bæta við greiningarjafnalausnum til að fá fram átta stighækkandi styrkleika sem eru upphaflega á bilinu frá 0,06  $\mu$ M til 6  $\mu$ M. Með því að bæta 80  $\mu$ l af þessum lausnum við tilsvandi greiningarholur í 96-hola míkrotítunarbakka (endanlegt rúmmál nemur 160  $\mu$ l), næst lokagreiningarstyrkleiki á bilinu frá 0,03 $\mu$ M til 3 $\mu$ M. Lokastyrkur ómerkts 17 $\beta$ -estradíóls í einstökum, ósértækum bindingagreiningarholum skal vera 1000-falt hærri en styrkur merkts [3H]-17 $\beta$ -estradíóls. Tilreiðslu lausna með ómerktu 17 $\beta$ -estradíóli er lýst ítarlega í FW-aðferðarlýsingunni (2. heimild).



17. Nota skal nafnstyrk viðtaka sem gefur sértæka bindingu sem nemur  $20 \pm 5\%$  (sjá 12.–13. lið). Lausnin með hrER $\alpha$  skal tilreidd rétt fyrir notkun.
18. Tilreiða skal 96-hola míkrotítrunarbakka eins og lýst er í töflu 2 með 3 samhliða prófanir á hvern styrkleika. Dæmi um styrkleika og rúmmálsskiptingu [3H]-17 $\beta$ -estradióls, ómerkt 17 $\beta$ -estradióls, jafnalausnar og viðtaka í bakkanum eru gefin í viðbæti 2.2.

Tafla 2

## Skipulag míkrotítrunarbakka fyrir mettnarbindingagreiningu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [3H] E2 + ER			0,06 nM [3H] E2 + ER			0,08 nM [3H] E2 + ER			0,10 nM [3H] E2 + ER			Samanlögð binding (leysir)
B	0,30 nM [3H] E2 + ER			0,60 nM [3H] E2 + ER			1,0 nM [3H] E2 + ER			3,0 nM [3H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [3H] E2 + ER + 0,03 $\mu$ M E2			0,06 nM [3H] E2 + ER + 0,06 $\mu$ M E2			0,08 nM [3H] E2 + ER + 0,08 $\mu$ M E2			0,10 nM [3H] E2 + ER + 0,10 $\mu$ M E2			Ósértæk binding
E	0,30 nM [3H] E2 + ER + 0,30 $\mu$ M E2			0,60 nM [3H] E2 + ER + 0,60 $\mu$ M E2			1,0 nM [3H] E2 + ER + 1,0 $\mu$ M E2			3,0 nM [3H] E2 + ER + 3,0 $\mu$ M E2			
F													
G													
H													

[3H] E2: [3H]-17 $\beta$ -estradiól  
 ER: estrógenviðtaki  
 E2: ómerkt 17 $\beta$ -estradiól

19. Míkrotítrunarbakkar fyrir greiningar skulu látnir standa við 2–8 °C í 16–20 klst. og settir á snúningsbúnað meðan viðstöðutíminn stendur yfir.

Mæling á [3H]-17 $\beta$ -estradióli sem er bundið við hrER $\alpha$

20. [3H]-17 $\beta$ -estradiól sem er bundið við hrER $\alpha$  skal aðskilið frá óbundnu [3H]-17 $\beta$ -estradióli með því að bæta 80  $\mu$ l af kaldri lausn dextranhúðaðra viðarkola (DCC) í hverja holu, hrista míkrotítrunarbakkana í 10 mínútur og skilja í skilvindu í 10 mínútur við u.þ.b. 2 500 snún./mín. Til að lágmarka klofnun bundins [3H]-17 $\beta$ -estradióls frá hrER $\alpha$  meðan þetta ferli stendur yfir er afar mikilvægt að jafnalausnum og greiningarholum sé haldið við hitastig á bilinu 2 til 8 °C og að hvert þrep sé unnið hratt. Hristari fyrir míkrotítrunarbakka er nauðsynlegur til að vinna bakkana á skilvirkan og skjótan hátt.
21. Því næst skal taka 50  $\mu$ l af floti, sem inniheldur hrER $\alpha$ -bundið [3H]-17 $\beta$ -estradiól, með mikilli gætni til að komast hjá hvers konar mengun í holunum með snertingu við dextranhúðuðu viðarkolin (DCC), og setja það í annan míkrotítrunarbakka.
22. Því næst skal bæta 200  $\mu$ l af sindurvökva, sem getur umbreytt hreyfiorku kjarnalosunar í ljósorku, í hverja holu (A1 til B12 og D1 til E12). Holur G1 til H12 (tilgreint sem dpm (sundrun á mínútu) samtals) sýna raðþynningar af [3H]-17 $\beta$ -estradióli (40  $\mu$ l) sem á að setja beint í sindurvökva í holunum í mælingarbakkanum, eins og tilgreint er í töflu 3, þ.e. þessar holur innihalda aðeins 200  $\mu$ l af sindurvökva og viðeigandi þynningu [3H]-17 $\beta$ -estradióls. Þessar mælingar sýna hversu miklu magni af [3H]-17 $\beta$ -estradióli í dpm (sundrun á mínútu) var bætt í hvert par af holum fyrir samanlagða bindingu og ósértæka bindingu.

Tafla 3

## Skipulag míkrotítrunarbakka fyrir mettnarbindingagreiningu, mæling á geislavirkni

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [3H] E2 + ER			0,06 nM [3H] E2 + ER			0,08 nM [3H] E2 + ER			0,10 nM [3H] E2 + ER			Samanlögð binding (leysir)
B	0,30 nM [3H] E2 + ER			0,60 nM [3H] E2 + ER			1,0 nM [3H] E2 + ER			3,0 nM [3H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [3H] E2 + ER + 0,03 µM E2			0,06 nM [3H] E2 + ER + 0,06 µM E2			0,08 nM [3H] E2 + ER + 0,08 µM E2			0,10 nM [3H] E2 + ER + 0,10 µM E2			Ósértæk binding
E	0,30 nM [3H] E2 + ER + 0,30 µM E2			0,60 nM [3H] E2 + ER + 0,60 µM E2			1,0 nM [3H] E2 + ER + 1,0 µM E2			3,0 nM [3H] E2 + ER + 3,0 µM E2			
F													
G	0,03 nM [3H] E2(dpm samtals)			0,06 nM [3H] E2			0,08 nM [3H] E2			0,10 nM [3H] E2			Samtals dpm (*)
H	0,30 nM [3H] E2			0,60 nM [3H] E2			1,0 nM [3H] E2			3,0 nM [3H] E2			

[3H] E2: [3H]-17β-estradiól

ER: estrógenviðtaki

E2: ómerkt 17β-estradiól

dpm: sundrun á mínútu

(\*) Heitum (geislavirkum) raðþynningum af [3H]-merktu estradíóli er bætt hér beint í 200 µl af sindurvökva í holum G1–H12.

23. Mæling skal hefjast eftir a.m.k. 2 klst. bið og talningartíminn á hverja holu skal vera 40 mínútur. Nota skal sindurteljara fyrir míkrotítrunarbakka til að ákvarða dpm/holu með leiðréttingu fyrir snöggkælingu. Að öðrum kosti má mæla sýnin í hefðbundnum teljara ef sindurteljari fyrir míkrotítrunarbakka er ekki tiltækur. Við þessi skilyrði má íhuga að stytta talningartímann.

**Samkeppnisháð bindingagreining**

24. Í samkeppnisháðri bindingagreiningu er binding eins styrkleika af [3H]-17β-estradíóli mæld við stighækkandi styrkleika prófunaríðefnis. Nota skal þrjár samskeiða samhliða prófanir fyrir hvern styrk í hverri keyrslu. Þar að auki skal keyra þrjár ósamskeiða keyrslur fyrir hvert íðefni sem er prófað. Setja skal greininguna upp í einn eða fleiri 96-hola míkrotítrunarbakka.

*Samanburðir*

25. Í hverri tilraun skal vera samskeiða samanburður með leysi og samanburður (þ.e. viðmiðunarestrógen, efni sem binst veikt og efni sem binst ekki) þegar greiningin er gerð. Í einum bakka, við hverja keyrslu, skulu vera allir styrkleikar í styrkferlum viðmiðunarestrógensins og samanburðanna (þ.e. binst veikt og binst ekki). Allir aðrir bakkar skulu innihalda: i. háan (hámark þess að efninu er rutt frá) og miðlungsháan (u.þ.b. IC<sub>50</sub>) styrkleika af E2 og efni sem binst veikt, þrjú sett af hvoru um sig; ii. samanburð með leysi og ósértækri bindingu, a.m.k. þrjú sett af hvoru um sig. Verklagi varðandi tilreiðslu greiningarjafnalausna, samanburða, [3H]-17β-estradíóls, hrERα og prófunaríðefnalausna er lýst í 2. heimild (K-viðauki, sjá FW-aðferðarlýsinguna fyrir greininguna).

*Samanburður með leysi:*

26. Samanburður með leysi sýnir að leysirinn hefur ekki víxlverkun á prófunarkerfið og mælir einnig samanlagða bindingu (TB). Etanól er ákjósanlegur leysir. Að öðrum kosti má nota dímetýlsúlfoxíð (DMSO) ef hæsti styrkur prófunaríðefnisins er ekki leysanlegur í etanóli. Styrkur etanóls eða dímetýlsúlfoxíðs, ef það er notað, í lokagreiningarholunum er 1,5% og má ekki fara yfir 2%.

*Samanburður með jafnalausn:*

27. Samanburður með jafnalausn (BC) skal hvorki innihalda leysi né prófunaríðefni en alla aðra þætti greiningarinnar. Niðurstöðurnar fyrir samanburðinn með jafnalausn eru bornar saman við samanburðinn með leysi til að sannreyna að leysirinn, sem er notaður, hafi ekki áhrif á greiningarkerfið.

*Efni sem binst sterkt (viðmiðunarestrógen)*

28. Innræni bindillinn er 17β-estradiól (CAS-númer 50-28-2) og binst með mikilli sækni við α-undirgerð estrógenviðtakans (ER). Staðalferill, þar sem ómerkt 17β-estradiól er notað, skal útbúinn fyrir hverja samkeppnisháða hrERα-bindingagreiningu til að unnt sé að meta breytileikann þegar greiningin er gerð yfir lengri tíma á sömu rannsóknarstofunni. Átta lausnir af ómerktu 17β-estradióli skulu tilreiddar í etanóli og styrkleikinn í greiningarholunum skal vera á bilinu frá 100 nM–10 pM (-7[logM] til -11[logM]) með eftirfarandi bili: (-7[logM], -8[logM], -8.5[logM], -9[logM], -9.5[logM], -10[logM], -11[logM]). Hæsti styrkur ómerkts 17β-estradióls (1 μM) gegnir einnig hlutverki mælikvarða á ósértæka bindingu. Þessi styrkur er merktur með merkingunni „NSB“ í töflu 4 þó að hann sé einnig hluti af staðalferlinum.

*Efni sem binst veikt*

29. Efni sem binst veikt (noretýnóðrel (CAS-númer 68-23-5) eða noretíndrón CAS-númer 68-22-4) skal haft með til að sýna fram á næmi hvernar tilraunar og til að gera það kleift að meta breytileikann þegar greiningin er gerð yfir lengri tíma. Átta lausnir af efni sem binst veikt skulu tilreiddar í etanóli og styrkleikinn í greiningarholunum skal vera á bilinu frá 3 nM til 30 μM (-8.5[logM] til -4.5[logM]) með eftirfarandi bili: -4.5[logM], -5[logM], -5.5[logM], -6[logM], -6.5[logM], -7[logM], -7.5[logM], -8.5[logM].

*Efni sem binst ekki*

30. Nota skal oktyltriétóoxýsílán (OTES, CAS-númer 2 943-75-1) sem neikvæðan samanburð (efni sem binst ekki). Það veitir tryggingu fyrir því að greiningin, eins og hún er keyrð, greini hvenær prófunaríðefnin bindast ekki við hrERα. Átta lausnir af efni sem binst ekki skulu tilreiddar í etanóli og styrkleikinn í greiningarholunum skal vera á bilinu frá 0,1nM til 1 000 μM (-10[logM] til -3[logM]) í stigmagnaðri lograaukningu. Hægt er að nota dí-n-bútýlþalat (DBP) til samanburðar sem staðgönguefni sem binst ekki. Sýnt hefur verið fram á að hámarksleysni þess er -4[logM].

*Styrkur hrERα*

31. Nota skal það magn viðtaka sem gefur 20±5% sértæka bindingu 1 nM geislamerkts bindils (sjá 12.–13. lið í 2. viðbæti). Lausnin með hrERα skal tilreidd rétt fyrir notkun.

*[3H]-17β-estradiól*

32. Styrkur [3H]-17β-estradióls í greiningarholunum skal vera 1,0 nM.

*Prófunaríðefni*

33. Fyrir það fyrsta er nauðsynlegt að framkvæma leysniþrófun til að ákvarða leysnimörk fyrir hvert prófunaríðefni og til að finna viðeigandi styrkbil til að nota þegar aðferðarlýsing prófunar er framkvæmd. Í upphafi skal ákvarða leysnimörk fyrir hvert prófunaríðefni í leysinum og staðfesta þau frekar við greiningarskilyrði. Lokastyrkurinn sem er prófaður í greiningunni skal ekki fara yfir 1 mM. Skammtastærðarrannsókn samanstendur af samanburði með leysi ásamt log 8 raðþynningum sem hefjast á leyfilegum hámarksstyrk (t.d. 1 mM eða lægri, byggt á leysnimörkunum) og veita skal því athygli hvort það sést grugg eða botnfall (sjá einnig 35. lið). Prófunaríðefnið skal prófað með því að nota 8 styrkleikaferla með lograðri dreifingu eins og skilgreint er í skammtastærðaprófuninni á undan. Styrkleikar í annarri og þriðju tilraun skulu aðlagðir eins og við á til að lýsa betur eiginleikum ferils styrkháðrar svörunar.

34. Þynningar prófunaríðefnisins skulu tilreiddar í viðeigandi leysi (sjá 26. lið í 2. viðbæti). Ef hæsti styrkur prófunaríðefnisins er ekki leysanlegur annaðhvort í etanóli eða í dímetýlsúlfoxíði og að bæta meiri leysi við myndi valda því að styrkur leysisins í endanlega tilraunaglasinu yrði hærri en leyfilegt gildi, er heimilt að minnka hæsta styrkinn niður í næsthæsta styrkinn. Í því tilviki má bæta viðbótarstyrk við lægsta gildi styrkleikaraðanna. Aðrir styrkleikar í röðunum skulu haldast óbreyttir.

35. Fylgjast skal vel með prófunaríðefnalausnum þegar þeim er bætt í greiningarholur þar sem prófunaríðefnið getur botnfallið þegar því er bætt í greiningarholu. Gögn fyrir allar holur sem innihalda botnfall skulu undanskilin ferilaðlöguminni og ástæðurnar fyrir útilokun gagnanna tilgreindar.
36. Ef upplýsingar liggja þegar fyrir úr öðrum heimildum sem gefa  $\log(IC_{50})$  fyrir prófunaríðefni er e.t.v. rétt að ákvarða rúmfræðilegt bil milli þynninganna (þ.e. 0,5 lograeiningar í kringum  $\log(IC_{50})$  sem búist er við). Endanleg niðurstaða ætti að endurspeglar næga dreifingu styrkleikanna sitt hvoru megin við  $\log(IC_{50})$ , þ.m.t. „toppur“ og „botn“, þannig að hægt sé að lýsa eiginleikum bindingarferilsins á fullnægjandi hátt.

#### Skipulagning greiningarbakka

37. Þegar merktir míkrotítunarbakkar eru tilreiddir skal hafa í huga viðstöðu í sex settum, með kóða fyrir samanburð með leysi, hæsta styrk viðmiðunarestrógens, sem gegnir einnig hlutverki mælikvarða á ósértæka bindingu (NSB), og samanburð með jafnalausn, og hafa í huga viðstöðu í þremur settum, með kóða fyrir hvern og einn af átta styrkleikum samanburðarefnisins sem binst ekki (oktyltríetoxýsílán), lægri styrkleikana 7 fyrir viðmiðunarestrógenið, skammtastærðarstyrkleikana 8 af efninu sem binst veikt og styrkleikana 8 af hverju prófunaríðefni (TC). Skýringarmynd af sýniskipulagi fyrir bakka með alla styrkleika í styrkferlunum fyrir viðmiðunarestrógen og samanburð er hér á eftir í töflu 4. Notaðir eru viðbótarmíkrotítunarbakkar fyrir prófunaríðefnin og skulu innihalda bakkasamanburð, þ.e. 1) háan (hámark þess að efninu er rutt frá) og miðlungsháan (u.þ.b.  $IC_{50}$ ) styrkleika af E2 og efni sem binst veikt, þrjú sett af hvoru um sig; 2) samanburð með leysi og ósértækri bindingu, sex sett af hvoru um sig (tafla 5). Dæmi um vinnublað vegna skipulags fyrir míkrotítunarbakka fyrir samkeppnisháða greiningu, þar sem notuð eru þrjú óþekkt prófunaríðefni, er að finna í viðbæti 2.3. Styrkleikarnir sem eru tilgreindir í töflum 4 og 5 eru lokastyrkleikarnir í greiningunni. Hámarksstyrkur fyrir E2 skal vera  $1 \times 10^{-7}$  M og fyrir efni sem binst veikt skal nota hæsta styrk sem er notaður fyrir efni sem binst veikt á bakka 1. Rannsóknarstofan verður að ákvarða  $IC_{50}$ -styrkinn, byggt á rannsóknarsögulegum gagnagrunni hennar um samanburði. Gert er ráð fyrir að þetta gildi verði svipað því gildi sem kom fram í fullgildingarrannsóknunum (sjá töflu 1).

Tafla 4

#### Skipulag míkrotítunarbakka fyrir samkeppnisháða bindingagreiningu, allir styrkleikar fyrir styrkferla viðmiðunarestrógens og samanburða (bakki 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (einungis leysir)			TB (einungis leysir)			NSB			NSB		
B	E2 ( $1 \times 10^{-7}$ )			E2 ( $1 \times 10^{-8}$ )			E2 ( $1 \times 10^{-8,5}$ )			E2 ( $1 \times 10^{-9}$ )		
C	E2 ( $1 \times 10^{-9,5}$ )			E2 ( $1 \times 10^{-10}$ )			E2 ( $1 \times 10^{-11}$ )			Blanksýni (*)		
D	NE ( $1 \times 10^{-4,5}$ )			NE ( $1 \times 10^{-5}$ )			NE ( $1 \times 10^{-5,5}$ )			NE ( $1 \times 10^{-6}$ )		
E	NE ( $1 \times 10^{-6,5}$ )			NE ( $1 \times 10^{-7}$ )			NE ( $1 \times 10^{-7,5}$ )			NE ( $1 \times 10^{-8,5}$ )		
F	OTES ( $1 \times 10^{-3}$ )			OTES ( $1 \times 10^{-4}$ )			OTES ( $1 \times 10^{-5}$ )			OTES ( $1 \times 10^{-6}$ )		
G	OTES ( $1 \times 10^{-7}$ )			OTES ( $1 \times 10^{-8}$ )			OTES ( $1 \times 10^{-9}$ )			OTES ( $1 \times 10^{-10}$ )		
H	Blanksýni (fyrir heitt) (**)			Blanksýni (fyrir heitt) (**)			Samanburður með jafnalausn			Samanburður með jafnalausn		

Í þessu dæmi er noretýnóðrel (NE) efnið sem binst veikt

(\*) raunverulegt blanksýni, hola ekki notuð

(\*\*) blanksýni ekki notað meðan viðstaða stendur yfir en notað til að staðfesta samanlagða viðbætta geislavirkni.

Tafla 5

**Skipulag míkrotítunarbakka fyrir samkeppnisháða bindingagreiningu, allir styrkleikar fyrir styrkferla prófunaríðefna og bakkasamanburða**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (einungis leysir)			TB (einungis leysir)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10-3)			TC1 (1×10-4)			TC1 (1×10-5)			TC1 (1×10-6)		
C	TC1 (1×10-7)			TC1 (1×10-8)			TC1 (1×10-9)			TC1 (1×10-10)		
D	TC2 (1×10-3)			TC2 (1×10-4)			TC2 (1×10-5)			TC2 (1×10-6)		
E	TC2 (1×10-7)			TC2 (1×10-8)			TC2 (1×10-9)			TC2 (1×10-10)		
F	TC3 (1×10-3)			TC3 (1×10-4)			TC3 (1×10-5)			TC3 (1×10-6)		
G	TC3 (1×10-7)			TC3 (1×10-8)			TC3 (1×10-9)			TC3 (1×10-10)		
H	NE (IC50)			NE (1×10-4,5)			E2 (IC50)			E2 (1×10-7)		

Í þessu dæmi er noretýnódrel (NE) efnið sem binst veikt

Lokið við samkeppnisháða bindingagreiningu

38. Eins og sýnt er í töflu 6 skal bæta í holurnar 80 µl af samanburði með leysi, samanburði með jafnalausn, viðmiðun-arestrógeni, efni sem binst veikt, efni sem binst ekki og prófunaríðefnum, sem eru tilreidd í greiningarjafnalausn. Síðan skal bæta 40 µl af 4 nM [3H]-17β-estradióli í hverja holu. Eftir léttan snúning í 10 til 15 mínútur við 2–8 °C skal bæta við 40 µl af hrERα-lausn. Míkrotítunarbakkar fyrir greiningar skulu látnir standa við 2–8 °C í 16–20 klst. og settir á snúningsbúnað meðan viðstöðutíminn stendur yfir.

Tafla 6

**Magn greiningarþátta fyrir samkeppnisháða hrER-bindingagreiningu, míkrotítunarbakkar**

Rúmmál (µl)	Innihaldsefni
80	Ómerkt 17β-estradiól, noretýnódrel, oktyltriétóoxýsílán (OTES), prófunaríðefni, leysir eða jafnalausn
40	4 nM [3H]-17β-estradióllausn
40	hrERα-lausn, styrkur eins og hann er ákvarðaður
<b>160</b>	<b>Heildarmagn í hverri greiningarholu</b>

39. Mælingin á [3H]-17β-estradióli sem er bundið við hrERα, eftir aðskilnað[3H]-17β-estradióls sem er bundið við hrERα frá óbundnu [3H]-17β-estradióli með því að bæta 80 µl af kaldri lausn dextranhúðaðra viðarkola (DCC) í hverja holu, skal síðan framkvæmd eins og lýst er í 20.–23. lið fyrir metunarbiningagreininguna.
40. Holur H1-6 (auðkenndar sem blanksýni (heit) í töflu 4) sýna dpm (sundrun á mínútu) fyrir [3H]-merkt estradiól í 40 µl. Deiliskammturinn 40 µl skal síðan settur beint í sindurvökvann í holum H1-H6.

**Viðmiðanir fyrir ásættanleika**

## Mettunarbiningagreining

41. Ferill sértækrar bindingar ætti að ná jafnvægi í takt við notkun á stighækkandi styrkleika [3H]-17 $\beta$ -estradíóls sem bendir til mettnar hrER $\alpha$  með bindli.
42. Sértæk binding við 1 nM af [3H]-17 $\beta$ -estradíóli ætti að vera innan viðunandi bilsins 15–25% af meðaltali mældrar samanlagðrar geislavirkni sem bætt er við í öllum keyrslum. Tilfallandi lítills háttar frávik utan þessa bils eru viðunandi en ef keyrslur eru stöðugt utan þessa bils eða ef tiltekin keyrsla er marktækt utan við þetta bil skal aðlaga styrk prótínsins og endurtaka mettnargreininguna.
43. Gögnin ættu að gefa af sér línulegt Scatchard-línurit.
44. Ósértæk binding skal ekki vera óhófleg. Gildi fyrir ósértæka bindingu skal alla jafna vera <35% af samanlagðri bindingu. Þó getur hlutfallið af og til farið yfir þessi mörk við mælingu á mjög lágu dpm (sundrun á mínútu) fyrir lægsta prófaða styrk geislamerks 17 $\beta$ -estradíóls.

## Samkeppnisháð bindingagreining

45. Stighækkandi styrkleikar ómerkts 17 $\beta$ -estradíóls skulu ryðja [3H]-17 $\beta$ -estradíólinu burtu frá viðtakanum á þann hátt að það samræmist samkeppnisháðri bindingu við einn stað.
46. IC<sub>50</sub>-gildið fyrir viðmiðunarestrógenið (þ.e. 17 $\beta$ -estradíól) skal vera u.þ.b. jafnt og mólstyrkur [3H]-17 $\beta$ -estradíóls að viðbættu K<sub>d</sub> sem er ákvarðað út frá mettnarbiningagreiningunni.
47. Samanlögð sértæk binding ætti ófrávikjanlega að vera innan viðunandi bilsins 20  $\pm$  5% þegar meðaltal mælds styrks samanlagðrar geislavirkni, sem var bætt við hverja holu, var 1 nM í öllum keyrslum. Tilfallandi lítills háttar frávik utan þessa bils eru viðunandi en ef keyrslur eru stöðugt utan þessa bils eða ef tiltekin keyrsla er marktækt utan við þetta bil skal aðlaga styrk prótínsins.
48. Leysirinn skal ekki breyta næmi eða samanburðarnákvæmni greiningarinnar. Niðurstöðurnar fyrir samanburðinn með leysi (TB-holur) eru bornar saman við samanburðinn með jafnalausn til að sannreyna að leysirinn, sem er notaður, hafi ekki áhrif á greiningarkerfið. Niðurstöður heildarbindingar (TB) og samanburðar með jafnalausn ættu að vera sambærilegar ef leysirinn hefur engin áhrif á greininguna.
49. Efnid sem binst ekki skal ekki ryðja meira en 25% af [3H]-17 $\beta$ -estradíólinu burtu frá hrER $\alpha$  þegar það er prófað upp að 10<sup>-3</sup> M (oktyltriétóxyfílan (OTES)) eða 10<sup>-4</sup> M (dí-n-bútýlpalat (DBP)).
50. Nothæfisviðmiðanir voru þróaðar fyrir viðmiðunarestrógen og tvö efni sem bindast veikt (t.d. noretýnódrel, noretíndrón) með notkun gagna úr fullgildingarrannsókninni á FW-hrER-bindingagreiningunni (N-viðauki í 2. heimild). Gefið er 95% öryggisbil fyrir meðaltalið (n)  $\pm$  SD fyrir allar samanburðarkeyrslur í öllum rannsóknarstofum sem taka þátt í fullgildingarrannsókninni. Reiknuð voru út 95% öryggisbil fyrir ferilaðlögunarbreyturnar (þ.e. toppur, botn, Hill-hallagildi, logIC<sub>50</sub>) fyrir viðmiðunarestrógenið og efnin sem bindast veikt og fyrir log<sub>10</sub>RBA (hlutfallsleg bindisækni) efnanna sem bindast veikt í hlutfalli við viðmiðunarestrógenið og er gefið upp sem nothæfisviðmiðun fyrir jákvæðu samanburðina. Í töflu 1 eru gefin upp þau bil sem búist er við fyrir ferilaðlögunarbreyturnar sem hægt er að nota sem nothæfisviðmiðanir. Í reynd getur styrkbil IC<sub>50</sub> verið eilítið breytilegt eftir K<sub>d</sub>-gildi viðtökuefnablöndunnar og styrk bindilsins.

51. Engar nothæfisviðmiðanir voru þróaðar fyrir ferilaðlgunarbreitur fyrir prófunaríðefnin vegna þeirra margvíslegu mögulegu prófunaríðefna sem til eru og breytileika í mögulegri sækni og útkomu (t.d. fullur ferill, hlutferrill (e. *partial curve*), engin ferilaðlgögn). Þó skal nota sérfræðiálit þegar farið er yfir niðurstöður úr hverri keyrslu fyrir prófunaríðefni. Nota skal fullnægjandi styrkbil prófunaríðefnisins til að skilgreina á skýran hátt toppinn (t.d. 90–100% binding) á ferli samkeppnisháðrar bindingar. Breytileiki í samhlíða prófunum á hverjum styrkleika prófunaríðefnisins sem og í ósamskeiða keyrslunum þremur skal vera hæfilegur og vísindalega forsvaranlegur. Samanburðir úr hverri keyrslu fyrir prófunaríðefni skulu nálgast þær mælingar á frammistöðu sem greint er frá fyrir þessa FW-greiningu og vera í samræmi við rannsóknarsöguleg samanburðargögn frá hverri rannsóknarstofu fyrir sig.

## GREINING GAGNA

### Mettunarbindingagreining

52. Bæði samanlögð binding og ósértæk binding eru mældar. Sértek binding stighækkandi styrkleika af [3H]-17β-estradióli við jafnvægisáðstæður er reiknuð út frá þessum gildum með því að draga ósértæka bindingu frá samanlagðri bindingu. Línurit yfir sértæka bindingu á móti styrk [3H]-17β-estradióls ætti að ná jafnvægi fyrir hámark sértækrar bindingar sem bendir til mettnar hrERα með [3H]-17β-estradiólinu. Að auki ætti greining á gögnunum að færa sönnur á bindingu [3H]-17β-estradióls við einn bindistað með mikla sækni. Ósértæk binding, samanlögð binding og sértæk binding skal sýnd með ferli fyrir mettnarbindingu. Við frekari greiningu á þessum gögnum skal nota ólínulega aðhvarfsgreiningu (t.d. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) og sýna endanleg gögn sem Scatchard-línurit.
53. Við greiningu gagna skal ákvarða Bmax og Kd eingöngu út frá gögnum um samanlagða bindingu, á þeim forsendum að ósértæk binding sé línuleg, nema færð séu rök fyrir því að nota aðra aðferð. Að auki skal nota harðgert aðhvarf (e. *robust regression*) til að ákvarða bestu mátgæði nema færð séu rök fyrir öðru. Tilgreina skal valda aðferð við harðgert aðhvarf. Alltaf skal leiðrétt fyrir bindlatæmingu (t.d. með aðferð Swillens 1995) við að ákvarða Bmax og Kd út frá gögnum um mettnarbindingu.

### Samkeppnisháð bindingagreining

54. Ferill samkeppnisháðrar bindingar er teiknaður upp sem sértæk [3H]-17β-estradiólbinding á móti styrk (log10-einingar) keppinautarins. Styrkur prófunaríðefnis sem heftir 50% af hámarki sértækrar [3H]-17β-estradiólbindingar er IC<sub>50</sub>-gildið.
55. Ákvarða skal áætluð log(IC<sub>50</sub>)-gildi fyrir jákvæða samanburði (t.d. viðmiðunarestrógen og efni sem bindast veikt) með því að nota viðeigandi ólínulegan ferilaðlgunarhugbúnað til að aðlaga Hill-jöfnu með fjórum breytum (t.d. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Alla jafna skal skilja topp, botn, hallatölu og log(IC<sub>50</sub>) eftir óþvinguð þegar þessir ferlar eru aðlagðir. Nota skal harðgert aðhvarf til að ákvarða bestu mátgæði nema færð séu rök fyrir öðru. Ekki skal leiðrétt fyrir bindlatæmingu. Eftir upphaflega greiningu skal yfirfara hvern bindingarferil til að tryggja að hann falli á viðeigandi hátt að líkaninu. Hlutfallsleg bindingasækni (RBA) fyrir efnið sem binst veikt skal reiknuð út sem hundradshlutfall af log(IC<sub>50</sub>) fyrir efnið sem binst veikt í hlutfalli við log(IC<sub>50</sub>) fyrir 17β-estradiólið. Niðurstöður úr jákvæðum samanburðum og samanburði með efni sem binst ekki skulu metnar með því að nota mælikvarðana á nothæfi greiningarinnar í 45.–50. lið í þessum 2. viðbæti.
56. Gögn fyrir öll prófunaríðefni skulu greind með því að nota þrepskipta nálgun til að tryggja að gögnin séu greind með viðeigandi hætti og að hver ferill samkeppnisháðrar bindingar sé flokkaður á tilhlýðilegan hátt. Mælt er með því að hver keyrsla fyrir prófunaríðefni fari fyrst í gegnum staðlaða greiningu gagna sem er nákvæmlega eins og sú sem er notuð fyrir viðmiðunarestrógen og samanburðarefni sem bindast veikt (sjá 55. lið hér að framan). Þegar því er lokið skal gera tæknilega endurskoðun á ferilaðlgunarbreytunum og einnig gera sjónræna skoðun á því hversu vel gögnin falla að fengnum ferli samkeppnisháðrar bindingar fyrir hverja keyrslu. Meðan þessi tæknilega endurskoðun stendur yfir eru athaganir á styrkháðri lækun á hundradshlutfalli sértækt bundins [3H]-17β-estradióls, lítill breytileiki milli tæknilegra samhlíða prófana fyrir hvern íðefnastyrkleika og samkvæmni í aðlgunarbreytum milli keyrslanna þriggja góð vísbinding um að greiningin og gagnagreiningin hafi verið framkvæmd með viðeigandi hætti.

### Túlkun gagna

57. Litið er svo á að prófunaríðefni bindist hrER $\alpha$  ef hægt er að aðlaga bindingarferilinn og neðsti punkturinn á svörunarferlinum innan gagnasviðsins er minni en 50% (mynd 1), að því tilskildu að allar viðmiðanirnar fyrir ásættanleika séu uppfylltar.
58. Að því tilskildu að allar viðmiðanirnar fyrir ásættanleika séu uppfylltar er litið svo á að prófunaríðefni sé bindist ekki hrER $\alpha$  ef:
- hægt er að aðlaga bindingaferil og neðsti punkturinn á aðlagaða svörunarferlinum innan gagnasviðsins er ofan við 75% eða
  - ekki er hægt að aðlaga bindingaferil og lægsta óaðlagaða meðaltal hundradshlutfallsbindingar í styrkleikahópunum í gögnunum er ofan við 75%.
59. Prófunaríðefni teljast tvíræð ef ekkert af ofangreindum skilyrðum er uppfyllt (t.d. neðsti punktur á aðlagaða svörunarferlinum er á bilinu 76–51%).

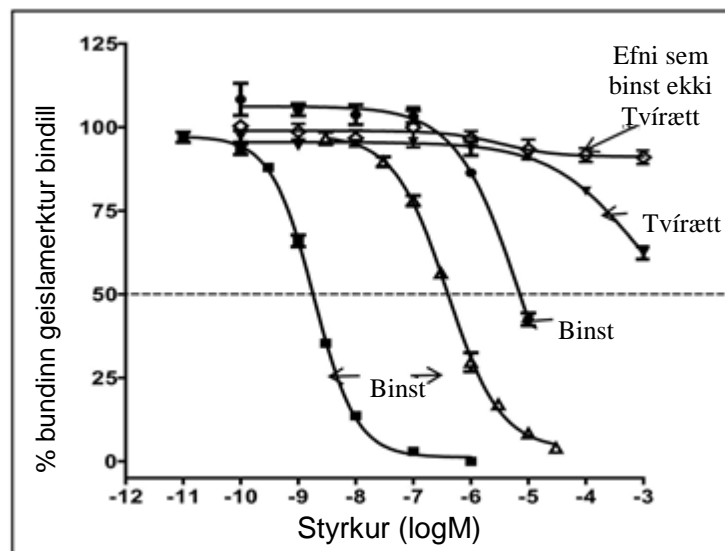
Tafla 7

### Viðmiðanir fyrir flokkun á grundvelli ferils samkeppnisháðrar bindingar fyrir prófunaríðefni

Flokkun	Viðmiðanir
Binst <sup>a</sup>	Hægt er að aðlaga bindingaferil. Neðsti punkturinn á svörunarferlinum innan gagnasviðsins er minni en 50%.
Binst ekki <sup>b</sup>	Ef hægt er að aðlaga bindingaferil, er neðsti punkturinn á aðlagaða svörunarferlinum innan gagnasviðsins ofan við 75%. Ef ekki er hægt að aðlaga bindingaferil, er lægsta óaðlagaða meðaltal hundradshlutfallsbindinga í styrkleikahópunum í gögnunum ofan við 75%.
Tvírætt <sup>c</sup>	Sérhver prófanleg keyrsla sem sýnir hvorki efni sem binst eða binst ekki (t.d. neðsti punkturinn á aðlagaða svörunarferlinum er á bilinu 76–51%).

Mynd 1

### Dæmi um flokkun prófunaríðefnis með því að nota feril samkeppnisháðrar bindingar





60. Margar keyrslur fyrir prófunaríðefni, sem eru framkvæmdar innan rannsóknarstofu, eru settar saman með því að úthluta hverri keyrslu tölugildi og reikna út meðaltalið fyrir allar keyrslurnar eins og sýnt er í töflu 8. Niðurstöður úr samsettum keyrslum innan hvernar rannsóknarstofu eru bornar saman við þá flokkun sem búist var við fyrir hvert prófunaríðefni.

Tafla 8

## Aðferð til að flokka prófunaríðefni með því að nota margar keyrslur innan rannsóknarstofu

Gildi úthlutað á hverja keyrslu:	
Flokkun	Tölugildi
Binst	2
Tvírætt	1
Binst ekki	0
Til að flokka meðaltal tölugilda í öllum keyrslum:	
Flokkun	Tölugildi
Binst	Meðaltal $\geq 1,5$
Tvírætt	$0,5 \leq \text{meðaltal} < 1,5$
Binst ekki	Meðaltal $< 0,5$

## PRÓFUNARSKÝRSLA

61. Sjá 24. lið í „**ÞÆTTIR hrER-BINDINGAGREININGAR**“ í þessari prófunaraðferð.

*Viðbætur 2.1*

## SKRÁ YFIR HUGTÖK

**[3H]E2:** 17 $\beta$ -estradiól, geislamerkt með trítúmi

**DCC:** Dextranhúðuð viðarkol

**E2:** Ómerkt 17 $\beta$ -estradiól (óhvarfgjarn)

**Greiningarjafnalausn:** 10 mM Tris, 10 mg nautgripasermisalbúmín/ml, 2 mM DTT, 10% glýseról, 0,2 mM levpeptín, pH-gildi 7.5

**hrER $\alpha$ :** Endurraðaður  $\alpha$ -estrógenviðtaki úr mönnum

**Samhliða prófun:** Ein af mörgum holum, sem innihalda sama innihald í sömu styrkleikum, sem greining er gerð á samhliða greiningu innan einnar keyrslu. Í þessari aðferðarlýsingu er hver styrkleiki prófunaríðefnis prófaður í þremur settum; þ.e. gerð er greining á þremur samhliða prófunum samhliða með hverjum styrkleika prófunaríðefnis.

**Keyrsla:** Heilt sett af greiningarholum í míkrotítunarbökkum, sem er keyrt samskeiða, sem veitir allar þær upplýsingar sem eru nauðsynlegar til að lýsa einkennum bindingar prófunaríðefnis við hrER $\alpha$  (þ.e.a.s. heildarmagn [3H]-17 $\beta$ -estradióls sem er bætt í greiningarholuna, hámarksbinding [3H]-17 $\beta$ -estradióls við hrER $\alpha$ , ósértæk binding og samanlögð binding við mismunandi styrkleika prófunaríðefnisins). Keyrsla getur verið með allt niður í eina greiningarholu (þ.e. samhliða prófun) á hvern styrkleika en sökum þess að þessi aðferðarlýsing útheimtir greiningu í þremur settum samanstendur ein keyrsla af þremur greiningarholum á hvern styrkleika. Þar að auki útheimtir þessi aðferðarlýsing þrjár sjálfstæðar (þ.e. ósamskeiða) keyrslur á hvert íðefni.

## Viðbætur 2.2

DÆMIGERÐ [<sup>3</sup>H]-17β-ESTRADIÓLMETTUNARGREINING MEÐ SAMHLIÐA PRÓFUN Í ÞREMUR HOLUM

Dæmigerð [3h]-17β-estradiólmettunargreining með samhlíða prófun í þremur holum											
Staðsetning	Samhlíða prófun	Kóði fyrir tegund holu	Heitt (geislavirkt) E2 Upphafsstyrkur (nM)	Heitt (geislavirkt) E2 Rúmmál (µl)	Heitt (geislavirkt) E2 Lokastyrkur (nM)	Kalt (ógeislavirkt) E2 Upphafsstyrkur (µM)	Kalt (ógeislavirkt) E2 Rúmmál (µl)	Kalt (ógeislavirkt) E2 Lokastyrkur (µM)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Rúmmál viðtaka (µl)	Heildarmagn í holum
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160

## Dæmigerð [3h]-17β-estradiólmettunargreining með samhlíða prófun í þremur holum

Staðsetning	Samhlíða prófun	Kóði fyrir tegund holu	Heitt (geislavirkt) E2 Upphafsstyrkur (nM)	Heitt (geislavirkt) E2 Rúmmál (µl)	Heitt (geislavirkt) E2 Lokastyrkur (nM)	Kalt (ógeislavirkt) E2 Upphafsstyrkur (µM)	Kalt (ógeislavirkt) E2 Rúmmál (µl)	Kalt (ógeislavirkt) E2 Lokastyrkur (µM)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Rúmmál viðtaka (µl)	Heildarmagn í holum
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160

## Dæmigerð [3h]-17β-estradiólmettunargreining með samhlíða prófun í þremur holum

Staðsetning	Samhlíða prófun	Kóði fyrir tegund holu	Heitt (geislavirkt) E2 Upphafstýrkur (nM)	Heitt (geislavirkt) E2 Rúmmál (µl)	Heitt (geislavirkt) E2 Lokastýrkur (nM)	Kalt (ógeislavirkt) E2 Upphafstýrkur (µM)	Kalt (ógeislavirkt) E2 Rúmmál (µl)	Kalt (ógeislavirkt) E2 Lokastýrkur (µM)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Rúmmál viðtaka (µl)	Heildarmagn í holum
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Heitt	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Heitt	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Heitt	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Heitt	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Heitt	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Heitt	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Heitt	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Heitt	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Heitt	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Heitt	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Heitt	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Heitt	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Heitt	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Heitt	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Heitt	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Heitt	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40

## Dæmigerð [3h]-17β-estradiólmettunargreining með samhlíða prófun í þremur holum

Staðsetning	Samhlíða prófun	Kóði fyrir tegund holu	Heitt (geislavirkt) E2 Upphafsstyrkur (nM)	Heitt (geislavirkt) E2 Rúmmál (µl)	Heitt (geislavirkt) E2 Lokastyrkur (nM)	Kalt (ógeislavirkt) E2 Upphafsstyrkur (µM)	Kalt (ógeislavirkt) E2 Rúmmál (µl)	Kalt (ógeislavirkt) E2 Lokastyrkur (µM)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Rúmmál viðtaka (µl)	Heildarmagn í holum
H5	2	Heitt	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Heitt	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Heitt	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Heitt	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Heitt	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Heitt	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Heitt	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Heitt	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Athygli er vakin á því að „heitar“ (geislavirkar) holur eru tómar meðan viðstaðan stendur yfir. Rúmmálinu 40 µl er einungis bætt við vegna sindurtalningar.

## Viðbætur 2.3

## SKIPULAG Á GREININGARHOLUM FYRIR SAMKEPPNISHÁÐA BINDINGAGREININGU

Bakki	Staðsetning	Samhlíða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	A1	1	samanlögð binding	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
S	A2	2	samanlögð binding	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
S	A3	3	samanlögð binding	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
S	A4	1	samanlögð binding	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
S	A5	2	samanlögð binding	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
S	A6	3	samanlögð binding	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
S	A7	1	kalt E2 (hátt)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	kalt E2 (hátt)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	kalt E2 (hátt)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	kalt E2 (hátt)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	kalt E2 (hátt)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	kalt E2 (hátt)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	kalt E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	kalt E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	kalt E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	kalt E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B5	2	kalt E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	kalt E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	kalt E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	kalt E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	kalt E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09

Bakki	Staðsetning	Samhlíða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynnngarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	B10	1	kalt E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	kalt E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	kalt E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	kalt E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	kalt E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	kalt E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	kalt E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	kalt E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	kalt E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	kalt E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	kalt E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C9	3	kalt E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	blanksýni	blanksýni	B1	—	—	160	—	—	160	—
S	C11	2	blanksýni	blanksýni	B2	—	—	160	—	—	160	—
S	C12	3	blanksýni	blanksýni	B3	—	—	160	—	—	160	—
S	D1	1	noretýnóðrel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	noretýnóðrel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	noretýnóðrel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	noretýnóðrel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	noretýnóðrel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	noretýnóðrel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05



Bakki	Staðsetning	Samhlíða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynnngarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	D7	1	noretýnóðrel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	noretýnóðrel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	noretýnóðrel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	noretýnóðrel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	noretýnóðrel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	noretýnóðrel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	E1	1	noretýnóðrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	noretýnóðrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	noretýnóðrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	noretýnóðrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	noretýnóðrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	noretýnóðrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	noretýnóðrel	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E8	2	noretýnóðrel	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	noretýnóðrel	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	noretýnóðrel	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09

Bakki	Staðsetning	Samhlíða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	E11	2	noretýnóðrel	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	noretýnóðrel	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G6	3	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09

Bakki	Staðsetning	Samhlíða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynnngarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	G8	2	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	H1	1	heitt	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H2	1	heitt	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H3	1	heitt	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H4	1	heitt	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H5	1	heitt	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H6	1	heitt	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H7	1	samanburður með jafnalausn	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H8	1	samanburður með jafnalausn	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H9	1	samanburður með jafnalausn	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H10	1	samanburður með jafnalausn	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H11	1	samanburður með jafnalausn	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H12	1	samanburður með jafnalausn	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—

Athygli er vakin á því að „heitar“ (geislavirkar) holur eru tómar meðan viðstaðan stendur yfir. Rúmmálinu 40 µl er einungis bætt við vegna sindurtalningar.

## Skipulag á greiningarholum fyrir samkeppnisháða bindingagreiningu

Bakkí	Staðsetning	Samhlíða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µL)	Rúmmál jafnalausnar (µL)	Sporefni (heitt (geislavírt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
P1	A1	1	samanlögð binding	TB	TBB1 B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	samanlögð binding	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	samanlögð binding	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	samanlögð binding	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	samanlögð binding	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	samanlögð binding	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	kalt E2 (hátt)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	kalt E2 (hátt)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	kalt E2 (hátt)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	kalt E2 (hátt)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	kalt E2 (hátt)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A12	3	kalt E2 (hátt)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	Prófunariðefni 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	Prófunariðefni 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	Prófunariðefni 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	Prófunariðefni 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	Prófunariðefni 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	Prófunariðefni 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	Prófunariðefni 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	Prófunariðefni 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	Prófunariðefni 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	Prófunariðefni 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	Prófunariðefni 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	Prófunariðefni 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

---

 Skipulag á greiningarholum fyrir samkeppnisháða bindingagreiningu
 

---

Bakkí	Staðsetning	Samhlíða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µL)	Rúmmál jafnalausnar (µL)	Sporefni (heitt (geislavírt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
P1	C1	1	Prófunariðefni 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	Prófunariðefni 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	Prófunariðefni 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	Prófunariðefni 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	Prófunariðefni 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	Prófunariðefni 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	Prófunariðefni 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	Prófunariðefni 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	Prófunariðefni 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	Prófunariðefni 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	Prófunariðefni 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	Prófunariðefni 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	Prófunariðefni 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	Prófunariðefni 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	Prófunariðefni 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	Prófunariðefni 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	Prófunariðefni 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	Prófunariðefni 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	Prófunariðefni 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	Prófunariðefni 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	Prófunariðefni 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	Prófunariðefni 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	Prófunariðefni 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	Prófunariðefni 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

## Skýpulag á greiningarholum fyrir samkeppnisháða bindingagreiningu

Bakkí	Staðsetning	Samhlíða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µL)	Rúmmál jafnalausnar (µL)	Sporefni (heitt (geislavírt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
P1	E1	1	Prófunariðefni 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	Prófunariðefni 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	Prófunariðefni 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E4	1	Prófunariðefni 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	Prófunariðefni 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	Prófunariðefni 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	Prófunariðefni 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	Prófunariðefni 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	Prófunariðefni 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	Prófunariðefni 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	Prófunariðefni 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	Prófunariðefni 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	Prófunariðefni 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	Prófunariðefni 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	Prófunariðefni 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	Prófunariðefni 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	Prófunariðefni 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	Prófunariðefni 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	Prófunariðefni 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	Prófunariðefni 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	Prófunariðefni 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	Prófunariðefni 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	Prófunariðefni 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	Prófunariðefni 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

## Skipulag á greiningarholum fyrir samkeppnisháða bindingagreiningu

Bakkí	Staðsetning	Samhlíða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µL)	Rúmmál jafnalausnar (µL)	Sporefni (heitt (geislavírt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
P1	G1	1	Prófunariðefni 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	Prófunariðefni 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	Prófunariðefni 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	Prófunariðefni 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	Prófunariðefni 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	Prófunariðefni 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	Prófunariðefni 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	Prófunariðefni 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	Prófunariðefni 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	Prófunariðefni 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	Prófunariðefni 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	Prófunariðefni 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	noretýnóðrel	NE		IC <sub>50</sub>	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretýnóðrel	NE		IC <sub>50</sub>	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretýnóðrel	NE		IC <sub>50</sub>	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretýnóðrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretýnóðrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretýnóðrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	kalt E2 S			IC <sub>50</sub>	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	kalt E2 S			IC <sub>50</sub>	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	kalt E2 S			IC <sub>50</sub>	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	kalt E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	kalt E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	kalt E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	

## 3. viðbætur

GREINING CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE (CERI) Í GLASI Á BINDINGU VIÐ ESTRÓGENVIÐTAKA MEÐ NOTKUN ENDURRAÐADS BINDILBINDISVÆDISPRÓTÍNS ER $\alpha$  ÚR MÖNNUM

ATRÍÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI (SJÁ EINNIG „ALMENNUR INNGANGUR“)

1. Í þessari greiningu í glasi á estrógenviðtaka- (ER $\alpha$ ) metnun og samkeppnisháðri bindingu er notað bindisvæði bindils ER $\alpha$  úr mönnum (hrER $\alpha$ ). Chemicals Evaluation Research Institute (CERI), Japan, framleiddi þessa prótínsmíð sem er samrunaprótín glútaþíón-S-transferasa (GST) og er tjáð í E. coli. CERI-aðferðarlýsingin fór í gegnum alþjóðlega fullgildingarrannsókn hjá mörgum rannsóknarstofum (2. heimild) sem sýndi fram á gildi hennar og áreiðanleika í fyrirhuguðum tilgangi greiningarinnar.
2. Þessi greining er kembirannsókn til að greina efni sem geta bundist við hrER $\alpha$ . Hún er notuð til að ákvarða getu prófunaríðefnis til að keppa við 17 $\beta$ -estradíól um bindingu við hrER $\alpha$ -bindisvæði bindils. Meginlegar greiningarniðurstöður geta náð yfir IC<sub>50</sub> (mæling á styrk prófunaríðefnis sem þörf er á til að ryðja helmingnum af [3H]-17 $\beta$ -estradíólinu burtu frá hrER $\alpha$ ) og hlutfallslega bindingasækni prófunaríðefna við hrER $\alpha$  samanborið við 17 $\beta$ -estradíól. Af ástæðum sem varða efnafræðilegar kembirannsóknir geta ásætlanlegar eiginlegar niðurstöður úr greiningum náð yfir flokkun á prófunaríðefnum í efni sem bindast hrER $\alpha$ , bindast ekki eða binding er tvíræð, á grundvelli viðmiðana sem lýst er fyrir bindingarferlana.
3. Í greiningunni er notaður geislavirkur bindill sem útheimtir að rannsóknarstofan sé með leyfi fyrir geislavirkum efnunum. Allt verklag í tengslum við geislavirkar samsætur og hættuleg íðefni skal fylgja reglugerðum og verklagsreglum eins og lýst er í landslöggjöf.
4. Lesa skal „ALMENNUR INNGANGUR“ og „ÞÆTTIR hrER-BINDINGAGREININGAR“ áður en þessi greining er notuð í eftirlitsskyni. Skilgreiningar og skammstafanir, sem notaðar eru í þessari viðmiðunarreglu um prófanir, koma fram í 1. viðbæti.

MEGINREGLUR GREININGARINNAR (SJÁ EINNIG „ALMENNUR INNGANGUR“)

5. Bindingagreiningin hrER $\alpha$  mælir getu geislamerks bindils ([3H]17 $\beta$ -estradíól) til að bindast estrógenviðtaka (ER) við stighækkandi styrkleika prófunaríðefnis (þ.e. keppinautar um bindingu). Prófunaríðefni sem búa yfir mikilli sækni í estrógenviðtakann (ER) keppa við geislamerкта bindilinn við lægri styrk, samanborið við þau íðefni sem eru með minni sækni í viðtakann.
6. Þessi greining samanstendur af tveimur mikilvægum þáttum: mettnarbindingatilraun til að lýsa eiginleikum mælipátta fyrir víxlverkun milli viðtaka og bindils og þar á eftir kemur samkeppnisháð bindingatilraun sem lýsir eiginleikum samkeppni milli prófunaríðefnis og geislamerks bindils við bindingu við estrógenviðtakann (ER).
7. Tilgangurinn með mettnarbindingatilrauninni er að lýsa einkennum tiltekinnar lotu af viðtökum m.t.t. bindingasækni og fjölda til undirbúnings fyrir samkeppnisháðu bindingatilraunina. Í mettnarbindingatilrauninni eru mæld, við jafnvægisáðstæður, sækni estrógenviðtaka með föstum styrk í náttúrulegan bindil sinn (táknaður með klofnunarfasta (Kd)) og styrkur virkra viðtakasvæða (Bmax).
8. Í samkeppnisháðu bindingatilrauninni er mæld sækni efnis til að keppa við [3H]17 $\beta$ -estradíól um bindingu við estrógenviðtakann (ER). Sæknin er magngreind með styrk prófunaríðefnis sem, í jafnvægi, heftir 50% af sértækri bindingu [3H]17 $\beta$ -estradíóls (kallað „heftistyrkur 50%“ eða IC<sub>50</sub>). Þetta er einnig hægt að meta með því að nota hlutfallslega bindingasækni (RBA í hlutfalli við IC<sub>50</sub> fyrir estradíól mælt aðskilið í sömu keyrslu). Í samkeppnisháðu bindingatilrauninni er mæld binding [3H]17 $\beta$ -estradíóls við fastan styrk með breiðu sviði (átta tugaprep) prófunaríðefnisstyrkleika. Síðan eru gögnin aðlögðuð, ef unnt er, í samræmi við Hill-jöfnuna (Hill, 1910) sem lýsir því hvernig samkeppnisháður bindill, sem binst við einn stað, ryður geislamerкта bindilinum burtu. Umfang þess að geislamerktu estradíóli er rutt í burt, við jafnvægi, er notað til að lýsa einkennum prófunaríðefnisins sem efni sem binst, binst ekki eða gefur tvíræða svörun.



## VERKFERLI

**Sýnt fram á ásættalegt nothæfi hrER $\alpha$ -prótíns**

9. Áður en mettnarbindingagreiningar og samkeppnisháðar bindingagreiningar eru framkvæmdar venjubundið skal sýna fram á að nothæfi hverrar nýrrar lotu af hrER $\alpha$  sé með réttum hætti í rannsóknarstofunni þar sem hún verður notuð. Nota skal tveggja þrepa ferli til að sýna fram á nothæfi. Þessi þrep eru eftirfarandi:
- Gera skal [3H]-17 $\beta$ -estradiól-mettunarbindingagreiningu til að sýna fram á sértæki og mettnun hrER $\alpha$ . Ólínuleg aðhvarfsgreining á þessum gögnum (t.d. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) og þar á eftir Scatchard-línurit ætti að sýna hrER $\alpha$ -bindingasækni [3H]-17 $\beta$ -estradióls (Kd) og fjölda viðtaka (Bmax) fyrir tiltekna lotu af hrER $\alpha$ .
  - Gera skal samkeppnisháða bindingagreiningu með því að nota samanburðarefnin (viðmiðunarestrógen (17 $\beta$ -estradiól)), efni sem binst veikt (t.d. noretýnóðrel eða noretíndrón) og efni sem binst ekki (oktýltriétóoxýsílán (OTES)). Hver rannsóknarstofa skal koma á fót sögulegum gagnagrunni til að skrá samkvæmni IC<sub>50</sub> og gildi sem skipta máli fyrir viðmiðunarestrógenið og efni sem binst veikt í mismunandi tilraunum og mismunandi lotum hrER $\alpha$ . Þar að auki skulu mælipættirnir fyrir ferla samkeppnisháðu bindingarinnar fyrir samanburðarefnin vera innan markanna fyrir 95% öryggisbilið (sjá töflu 1) sem voru þróuð með notkun gagna frá rannsóknarstofum sem tóku þátt í fullgildingarrannsókninni fyrir þessa greiningu (2. heimild).

Tafla 1

**Nothæfisviðmiðanir sem voru þróaðar fyrir viðmiðunarestrógen og efni sem bindast veikt, CER1-hrER-bindingagreining**

Efni	Mælipáttur	Meðaltal <sup>(a)</sup>	Staðalfrávik <sup>(a)</sup>	95% öryggisbil <sup>(b)</sup>	
				Neðri mörk	Efri mörk
<b>17<math>\beta</math>-estradiól</b>	Toppur	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Botn	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Hill-hallagildi	-1,22	0,20 (70)	-1,27	-1,17
	LogIC <sub>50</sub>	-8,93	0,23 (70)	-8,98	-8,87
<b>Noretýnóðrel</b>	Toppur	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Botn	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hill-hallagildi	-1,04	0,21 (68)	-1,09	-0,99
	LogIC <sub>50</sub>	-6,19	0,40 (68)	-6,29	-6,10
<b>Noretíndrón <sup>(c)</sup></b>	Toppur	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Botn	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hill-hallagildi	-1,18	0,32 (23)	-1,31	-1,04
	LogIC <sub>50</sub>	-6,01	0,54 (23)	-6,25	-5,78

<sup>(a)</sup> Meðaltal  $\pm$  staðalfrávik (SD) með sýnastærð (n) voru reiknuð út með því að nota áætlaða ferilaðlögun (Hill-jafna með 4 breytum) fyrir samanburðarkeyrslur sem voru gerðar í fjórum rannsóknarstofum meðan fullgildingarrannsóknin stóð yfir (sjá N-viðauka í 2. heimild).

<sup>(b)</sup> Gefið er 95% öryggisbil sem leiðbeiningar vegna viðmiðana fyrir ásættaðleika.

<sup>(c)</sup> Prófun á noretíndróni var valkvæð sem undirverkefni 4 meðan fullgildingarrannsóknin stóð yfir (sjá 2. heimild, sjá undirverkefni 4). Þess vegna var meðaltalið  $\pm$  SD (n) reiknað út með því að nota áætlaða ferilaðlögun (Hill-jafna með 4 breytum) fyrir samanburðarkeyrslur sem voru gerðar í tveimur rannsóknarstofum. Styrkbilið fyrir IC<sub>50</sub> verður háð Kd fyrir viðtakaefnablönduna og styrk geislamerka bindilsins sem er notaður innan hverrar rannsóknarstofu. Viðeigandi aðlögun á styrkbili IC<sub>50</sub>, byggt á þeim skilyrðum sem eru notuð til að framkvæma greininguna, er ásættaleg.

**Sýnt fram á hæfni rannsóknarstofu**

10. Sjá 17. og 18. lið og töflu 2 í „**ÞÆTTIR hrER-BINDINGAGREININGAR**“ í þessari prófunaraðferð. Hver greining (mettunarbinding og samkeppnisháð binding) skal samstanda af þremur sjálfstæðum keyrslum (þ.e. með nýjum þynningum af viðtaka, íðefnum og prófefnum) á mismunandi dögum og hver keyrsla skal innihalda þrjár samhliða prófanir.

**Ákvörðun á styrk viðtaka (hrER $\alpha$ )**

11. Styrkleiki virks viðtaka er eilítið breytilegur eftir lotu og geymsluskilyrðum. Af þessum sökum skal ákvarða styrkleika virks viðtaka sem er móttækinn frá birgi. Þá fæst viðeigandi styrkleiki virka viðtakans þegar keyrslan er framkvæmd.
12. Nafnstyrkur sem nemur 0,1, 0,2, 0,4 og 0,6 nM af viðtaka skal látinn standa án (samanlögð binding) og með (ósértæk binding) 1  $\mu$ M af ómerktu estradíóli við skilyrði sem samsvara samkeppnisháðri bindingu (þ.e. 0,5 nM [3H]-estradíól). Sértek binding, reiknuð út sem mismunurinn á samanlagðri bindingu og ósértækri bindingu, er teiknuð upp á móti nafnstyrk viðtakans. Styrkur viðtaka sem gefur sértek bindingagildi, sem svara til 40% af viðbættum geislamerktum bindli, tengist samsvarandi styrk viðtakans og þessi styrkur viðtakans skal notaður í mettunarbindingatilraunum og samkeppnisháðum bindingatilraunum. Lokastyrkur sem nemur 0,2 nM fyrir hrER uppfyllir oft þetta skilyrði.
13. Ef það kemur ítrekað fyrir að ekki er hægt að uppfylla 40% viðmiðunina skal kanna fyrirkomulag tilraunarinnar m.t.t. hugsanlegrar skekkju. Ef 40% viðmiðunin næst ekki getur það bent til þess að mjög lítið sé af virkum viðtaka í raðbrigðalotunni og þá skal íhuga að nota aðra viðtakalotu.

**Mettunargreining**

14. Átta stighækkandi styrkleikar af [3H]17 $\beta$ -estradíóli skulu metnir í þremur settum samkvæmt eftirfarandi þrenns konar skilyrðum (sjá töflu 2):
  - a. Án ómerks 17 $\beta$ -estradíóls og með estrógenviðtaka (ER). Þetta er ákvörðun á samanlagðri bindingu með því að mæla geislavirkni í holum sem innihalda einungis [3H]17 $\beta$ -estradíól.
  - b. Með styrkleika af ómerktu 17 $\beta$ -estradíóli sem er 2000-falt yfir styrkleika merks 17 $\beta$ -estradíóls og með estrógenviðtaka (ER). Tilgangurinn með þessu skilyrði er að metta virku bindistaðina með ómerktu 17 $\beta$ -estradíóli og ákvarða ósértæku bindinguna með því að mæla geislavirknina í holunum. Lítið er svo á að allt heitt (geislavirkt) estradíól sem eftir er, sem getur bundist viðtakanum, sé bundið á ósértækum stað þar eð kalt (ógeislavirkt) estradíól ætti að vera af það miklum styrk að það binst við alla tiltæka sérteka staði á viðtakanum.
  - c. Án ómerks 17 $\beta$ -estradíóls og án estrógenviðtaka (ER) (ákvörðun á heildargeislavirkni).

**Tilreiðsla á [3H]-17 $\beta$ -estradíóli, ómerktum 17 $\beta$ -estradíóllausnum og hrER $\alpha$** 

15. Tilreiða skal 40 nM lausn af [3H]-17 $\beta$ -estradíóli úr 1  $\mu$ M stofnlausn af [3H]-17 $\beta$ -estradíóli í dímetýlsúlfoxíði með því að bæta við dímetýlsúlfoxíði (til að tilreiða 200 nM) og greiningarjafnalausn við stofuhita (til að tilreiða 40 nM). Með því að nota þessa 40 nM-lausn eru tilreiddar raðþynningar af [3H]-17 $\beta$ -estradíóli, á bilinu frá 0,313 nM til 40 nM, með greiningarjafnalausn við stofuhita (eins og sýnt er í 12. röð í töflu 2). Lokastyrkur greiningarinnar, á bilinu frá 0,313 til 4,0 nM, fæst með því að bæta 10  $\mu$ l af þessum lausnum í viðeigandi greiningarholur í 96-hola míkrotítunarbakka (sjá töflur 2 og 3). Tilreiðslu greiningarjafnalausnar, útreikningi á upphaflegri [3H]-17 $\beta$ -estradíólstofnlausn, byggt á eðlisvirkni hennar, tilreiðslu þynninga og ákvörðun á styrkleikum er lýst ítarlega í CERi-aðferðarlýsingunni (2. heimild).

16. Þynningar af ómerktum 17 $\beta$ -estradióllausnum skulu tilreiddar úr 1 nM 17 $\beta$ -estradiólstofnlausn með því að bæta við greiningarjafnalausnum til að fá fram átta stighækkandi styrkleika sem eru upphaflega á bilinu frá 0,625  $\mu$ M til 80  $\mu$ M. Lokastyrkur greiningarinnar, á bilinu frá 0,0625 til 8  $\mu$ M, fæst með því að bæta 10  $\mu$ l af þessum lausnum í viðeigandi greiningarholur í 96-hola míkrotítunarbakka sem eru ætlaðar til að mæla ósértæka bindingu (sjá töflur 2 og 3). Tilreiðslu lausna með ómerktu 17 $\beta$ -estradióli er lýst ítarlega í CERI-aðferðarlýsingunni (2. heimild).
17. Nota skal styrk viðtaka sem gefur sértæka bindingu sem nemur 40 $\pm$ 10% (sjá 12.–13. lið). Tilreiða skal hrER $\alpha$ -lausnina með ískaldri greiningarjafnalausn rétt fyrir notkun, þ.e. eftir að búið er að tilreiða allar holur fyrir samanlagða bindingu, ósértæka bindingu og fyrir heitan (geislavirkan) bindil einan og sér.
18. Tilreiða skal 96-hola míkrotítunarbakka eins og lýst er í töflu 2 með 3 samhliða prófanir á hvern styrkleika [3H]-17 $\beta$ -estradióls. Rúmmálsskipting [3H]-17 $\beta$ -estradióls, ómerkts 17 $\beta$ -estradióls, jafnalausnar og viðtaka er gefin í 3. viðbæti.

Tafla 2

## Skipulag míkrotítunarbakka fyrir mettnarbindingagreiningu

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	Til að mæla TB			Til að mæla NSB			Til að ákvarða heitan (geislavirkan) bindil einan og sér				Ómerktar E2-þynningar fyrir bakkadálka 4–6	[3H]E2-þynningar fyrir bakkadálka 1–9
A	0,0313 nM [3H] E2+ ER			0,0313 nM [3H] E2+ 0,0625 $\mu$ M E2+ ER			0,0313 nM				0,625 $\mu$ M	0,313 nM
B	0,0625 nM [3H] E2+ ER			0,0625 nM [3H] E2+ 0,125 $\mu$ M E2+ ER			0,0625 nM				1,25 $\mu$ M	0,625 nM
C	0,125 nM [3H] E2+ ER			0,125 nM [3H] E2+ 0,25 $\mu$ M E2+ ER			0,125 nM				2,5 $\mu$ M	1,25 nM
D	0,250 nM [3H] E2+ ER			0,250 nM [3H] E2+ 0,5 $\mu$ M E2+ ER			0,250 nM				5 $\mu$ M	2,5 nM
E	0,50 nM [ H] E2+ ER			0,50 nM [3H] E2+ 1 $\mu$ M E2+ ER			0,50 nM				10 $\mu$ M	5 nM
F	1,00 nM [3H] E2+ ER			1,00 nM [3H] E2+ 2 $\mu$ M E2+ ER			1,00 nM				20 $\mu$ M	10 nM
G	2,00 nM [3H] E2+ ER			2,00 nM [3H] E2+ 4 $\mu$ M E2+ ER			2,00 nM				40 $\mu$ M	20 nM
H	4,00 nM [3H] E2+ ER			4,00 nM [3H] E2+ 8 $\mu$ M E2+ ER			4,00 nM				80 $\mu$ M	40 nM

TB - samanlögð binding

NSB - ósértæk binding

[3H] E2 - [3H]17 $\beta$ -estradiólE2 - ómerkt 17 $\beta$ -estradiól

(\*) Uppgefnir styrkleikar hér eru lokastyrkleikar í hverri holu.

(\*\*) Hægt er að tilreiða þynningar ómerkts E2 og [3H]E2 í öðrum bakka.

Tafla 3

## Magn prófefnis fyrir metnun í mÍkrótítrunarbakka

Röð númer	1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Tilreiðsluprep	TB-holur			NSB-holur			Heitur (geislavirkur) bindill einn og sér		
Magn þátta fyrir ofangreindar hvarfhólar og ísetningarröð	Jafnalausn		60 µl	50 µl		90 µl			
	ómerkt E2 úr 11. röð í töflu 2		—	10 µl		—			
	[3H]E2 úr 12. röð í töflu 2		10 µl	10 µl		10 µl			
	hrERα		30 µl	30 µl		—			
Heildarrúmmál hvarfblöndu	100 µl			100 µl			100 µl		
Viðstaða	<b>SVÖRUN EFTIR 2 KLST. VIÐSTÖÐU</b>						Mæling á geislavirkni rétt eftir tilreiðslu. Engin viðstaða		
Meðhöndlun með 0,4% dextranhúðuðum viðarkolum (DCC)	Já			Já			Nei		
Magn dextranhúðaðra viðarkola (DCC)	100 µl			100 µl			—		
Síun	Já			Já			Nei		
<b>MÆLING Á DPM</b>									
Magnákvörðun rúmmáls sem bætt er við sindur-blönduna	100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(\*) Ef sindurtalning í vökva (LSC) fyrir örbakka er notuð til að mæla dpm (sundrun á mínútu) er ekki viðeigandi að tilreiða heitan (geislavirkan) bindil einan og sér í sama greiningarbakka og fyrir TB- og NSB-holur. Tilreiða skal heita (geislavirka) bindilinn einan og sér á öðrum bakka.

(\*\*) Ef dextranhúðuðu viðarkolin (DCC) eru aðskilin með skiljun skal mæla 50 µl af floti með sindurtalningu í vökva (LSC) til að komast hjá því að dextranhúðuðu viðarkolin (DCC) mengist.

19. MÍkrótítrunarbakkar fyrir greiningar til að ákvarða samanlagða bindingu og ósértæka bindingu skulu látnir standa við stofuhita (22–28 °C) í tvær klst.

*Mæling á [3H]-17β-estradíóli sem er bundið við hrERα*

20. Eftir tveggja klst. viðstöðutíma skal [3H]-17β-estradíól, sem er bundið við hrERα, aðskilið frá óbundnu [3H]-17β-estradíóli með því að bæta 100µl af ískaldri 0,4% lausn dextranhúðaðra viðarkola (DCC) í holurnar. Síðan skal setja bakkana á ís í 10 mínútur og síá hvarfblönduna og lausn dextranhúðuðu viðarkolanna (DCC) með því að flytja þær yfir í mÍkrótítrunarbakkasú til að fjarlægja dextranhúðuðu viðarkolin (DCC). Síðan skal bæta 100 µl af síuvökvanum við sindurvökvanum í mælingaglösom fyrir sindurtalningu í vökva (LSC) til að ákvarða sundrun á mínútu (dpm) í hverju mælingaglassi með sindurtalningu í vökvanum.

21. Ef mÍkrótítrunarbakkasía er ekki tiltæk er að öðrum kosti hægt að fjarlægja dextranhúðuðu viðarkolin (DCC) með skiljun. Síðan skal taka 50 µl af floti sem inniheldur hrERα-bundið [3H]-17β-estradíól, með mikilli gætni til að komast hjá hvers konar mengun í holunum með snertingu við dextranhúðuðu viðarkolin (DCC), og nota það til sindurtalningar.

22. Heitur (geislavirkur) bindill einn og sér er notaður til að ákvarða sundrun [3H]-17 $\beta$ -estradióls, sem er bætt í greiningarholurnar, á mínútu (dpm). Geislavirknin skal magngreind rétt eftir tilreiðslu. Þessar holur skulu ekki látnar standa og skulu ekki meðhöndlaðar með lausn dextranhúðaðra viðarkola (DCC) heldur skal setja innihald þeirra beint í sindurvökvann. Þessar mælingar sýna hversu miklu magni af [3H]-17 $\beta$ -estradióli í dpm (sundrun á mínútu) var bætt í hvert par af holum fyrir samanlagða bindingu og ósértæka bindingu.

#### Samkeppnisháð bindingagreining

23. Í samkeppnisháðri bindingagreiningu er binding eins styrkleika af [3H]-17 $\beta$ -estradióli mæld við stighækkandi styrkleika prófunaríðefnis. Nota skal þrjár samskeiða samhliða prófanir fyrir hvern styrk í hverri keyrslu. Þar að auki skal keyra þrjár ósamskeiða keyrslur fyrir hvert íðefni sem er prófað. Setja skal greininguna upp í einn eða fleiri 96-hola míkrotítunarbakka.

#### Samanburðir

24. Í hverri tilraun skal vera samskeiða samanburður með leysi og samanburðir (þ.e. viðmiðunarestrógen, efni sem binst veikt og efni sem binst ekki) þegar greiningin er gerð. Í einum bakka, við hverja keyrslu, skulu vera allir styrkleikar í styrkferlum viðmiðunarestrógensins og samanburðanna (þ.e. binst veikt og binst ekki). Allir aðrir bakkar skulu innihalda: i. háan (hámark þess að efninu er rutt frá, þ.e. u.þ.b. öllum geislamerktum bindli rutt frá) og miðlungsháan (u.þ.b. IC<sub>50</sub>) styrkleika af E2 og efni sem binst veikt, þrjú sett af hvoru um sig; samanburð með leysi og ósértækri bindingu, þrjú sett af hvoru um sig. Verklagi við tilreiðslu greiningarjafnalausna, [3H]-17 $\beta$ -estradióls, hrER $\alpha$  og prófunaríðefnalausna er lýst ítarlega í CERI-aðferðarlýsingunni (2. heimild).

#### Samanburður með leysi:

25. Samanburður með leysi sýnir að leysirinn hefur ekki víxlverkun á prófunarkerfið og mælir einnig heildarbindingu (TB). Dímetýlsúlfoxíð er ákjósanlegur leysir. Að öðrum kosti má nota etanól ef hæsti styrkur prófunaríðefnisins er ekki leysanlegur í dímetýlsúlfoxíði. Styrkur dímetýlsúlfoxíðs í lokagreiningarholunum skal vera 2,05% og kann að aukast upp í 2,5% ef skortur er á leysni prófunaríðefnisins. Ekki skal nota dímetýlsúlfoxíð í styrk sem er yfir 2,5% þar sem hærri styrkur leysis truflar greininguna. Að því er varðar prófunaríðefni sem eru ekki leysanleg í dímetýlsúlfoxíði en eru leysanleg í etanóli má að hámarki nota 2% etanól í greiningunni án truflunar.

#### Samanburður með jafnalausn:

26. Samanburður með jafnalausn (BC) skal hvorki innihalda leysi né prófunaríðefni en alla aðra þætti greiningarinnar. Niðurstöðurnar fyrir samanburðinn með jafnalausn eru bornar saman við samanburðinn með leysi til að sannreyna að leysirinn, sem er notaður, hafi ekki áhrif á greiningarkerfið.

#### Efni sem binst sterkt (viðmiðunarestrógen)

27. Innræni bindillinn er 17 $\beta$ -estradiól (CAS-númer 50-28-2) og binst með mikilli sækni við  $\alpha$ -undirgerð estrógenviðtakans (ER). Staðalferill, þar sem ómerkt 17 $\beta$ -estradiól er notað, skal útbúinn fyrir hverja samkeppnisháða hrER $\alpha$ -bindingagreiningu til að unnt sé að meta breytileikann þegar greiningin er gerð yfir lengri tíma á sömu rannsóknarstofunni. Tilreiða skal átta lausnir af ómerktu 17 $\beta$ -estradióli í dímetýlsúlfoxíði og greiningarjafnalausn með lokastyrk í greiningarholunum, sem á að nota fyrir staðalferilinn, með eftirfarandi bili: 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-8,5</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-9,5</sup>, 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-11</sup> M. Hæsti styrkur ómerkts 17 $\beta$ -estradióls (1  $\mu$ M) skal einnig gegna hlutverki mælikvarða á ósértæka bindingu. Þessi styrkur er merktur með merkingunni „NSB“ í töflu 4 þó að hann sé einnig hluti af staðalferlinum.

#### Efni sem binst veikt

28. Efni sem binst veikt (noretýnódrel (CAS-númer 68-23-5) eða, að öðrum kosti, noretíndrón (CAS-númer 68-22-4)) skal haft með til að sýna fram á næmi hverrar tilraunar og til að gera það kleift að meta breytileikann þegar greiningin er gerð yfir lengri tíma. Tilreiða skal átta lausnir af efninu sem binst veikt í dímetýlsúlfoxíði og greiningarjafnalausn með lokastyrk í greiningarholunum sem hér segir: 10<sup>-4,5</sup>, 10<sup>-5,5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-6,5</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-7,5</sup>, 10<sup>-8</sup> og 10<sup>-9</sup> M.

*Efni sem binst ekki*

29. Nota skal oktyltríetóoxýsflan (OTES, CAS-númer 2 2943-75-1) sem neikvæðan samanburð (efni sem binst ekki). Það veitir tryggingu fyrir því að greiningin, eins og hún er keyrð, greini prófunaríðefni sem bindast ekki við hrER $\alpha$ . Tilreiða skal átta lausnir af efni sem binst ekki í dímetýlsúlfoxíði og greiningarjafnalausn með lokastyrk í greiningarholunum sem hér segir:  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  M. Hægt er að nota dí-n-bútýlþalat (DBP, CAS-númer 84-72-2) sem staðgönguefni sem binst ekki en það er einungis prófanlegt upp að  $10^{-4}$ M. Sýnt hefur verið fram á að hámarksleysni dí-n-bútýlþalats (DBP) í greiningunni er  $10^{-4}$ M.

*Styrkur hrER $\alpha$* 

30. Nota skal það magn viðtaka sem gefur  $40\pm 10\%$  sértæka bindingu (sjá 12.–13. lið í 3. viðbæti). Tilreiða skal hrER $\alpha$ -lausnina með því að þynna virkt hrER $\alpha$  í ískaldri greiningarjafnalausn rétt fyrir notkun.

*[ $^3$ H]-17 $\beta$ -estradiól*

31. Lokastyrkur [ $^3$ H]-17 $\beta$ -estradióls í greiningarholunum skal vera 0,5 nM.

*Prófunaríðefni*

32. Fyrir það fyrsta er nauðsynlegt að framkvæma leysniþrófun til að ákvarða leysnimörk fyrir hvert prófunaríðefni og til að finna viðeigandi styrkbil til að nota þegar aðferðarlýsing prófunar er framkvæmd. Í upphafi skal ákvarða leysnimörk fyrir hvert prófunaríðefni í leysinum og síðan staðfesta þau frekar við greiningarskilyrði. Lokastyrkur sem er prófaður í greiningunni skal ekki fara yfir 1 mM. Skammtastærðarrannsókn felur í sér samanburð með leysi ásamt a.m.k. log 8 raðþynningum sem hefjast á leyfilegum hámarksstyrk (t.d. 1 mM eða lægri, byggt á leysnimörkunum) og veita skal því athygli hvort það sést grugg eða botnfall (sjá einnig 35. lið í 3. viðbæti). Þegar styrkbilið fyrir prófunina hefur verið ákvarðað skal prófa prófunaríðefni með því að nota 8 lograða styrkleika með hæfilegu bili eins og skilgreint er í undanfarandi skammtastærðarrannsókn. Styrkleikar sem eru prófaðir í annari og þriðju tilraun skulu aðlagðir enn frekar, eins og við á, til að lýsa betur eiginleikum ferils styrkháðrar svörunar, ef nauðsyn krefur.
33. Þynningar prófunaríðefnisins skulu tilreiddar í viðeigandi leysi (sjá 25. lið í 3. viðbæti). Ef hæsti styrkur prófunaríðefnisins er ekki leysanlegur annaðhvort í dímetýlsúlfoxíði eða í etanóli og að bæta meiri leysi við myndi valda því að styrkur leysisins í endanlega tilraunaglasinu yrði hærri en leyfilegt gildi, er heimilt að minnka hæsta styrkinn niður í næsthæsta styrkinn. Í því tilviki má bæta viðbótarstyrk við lægsta gildi styrkleikaraðanna. Aðrir styrkleikar í röðunum skulu haldast óbreyttir.
34. Fylgjast skal vel með prófunaríðefnalausnum þegar þeim er bætt í greiningarholur þar sem prófunaríðefnið getur botnfallið þegar því er bætt í greiningarholu. Gögn fyrir allar holur sem innihalda botnfall skulu undanskilin ferilaðlöguninni og ástæðurnar fyrir útilökun gagnanna tilgreindar.
35. Ef upplýsingar liggja þegar fyrir úr öðrum heimildum sem gefa log(IC<sub>50</sub>) fyrir prófunaríðefni er e.t.v. rétt að ákvarða rúmfræðilegt bil milli þynninganna í kringum log(IC<sub>50</sub>) sem búist er við (þ.e. 0,5 lograeiningar). Endanlegar niðurstöður ættu að sýna næga dreifingu styrkleikanna sitt hvoru megin við log(IC<sub>50</sub>), þ.m.t. „toppur“ og „botn“, þannig að hægt sé að lýsa eiginleikum bindingarferilsins á fullnægjandi hátt.

## Skipulagning greiningarbakka

36. Tilreiða skal merktá míkrotítunarbakka með notkun viðstöðu í sex settum fyrir samanburð með leysi, hæsta styrk viðmiðunarestrógens (E2), sem gegnir einnig hlutverki mælikvarða á ósértæka bindingu (NSB), samanburð með jafnalausn og viðstöðu í þremur settum fyrir hvern og einn af átta styrkleikum samanburðarefnisins sem binst ekki (oktýltríetoxýsílán), lægri styrkleikana 7 fyrir viðmiðunarestrógenið (E2), styrkleikana 8 af efninu sem binst veikt (noretýnóðrel eða noretýndrón) og styrkleikana 8 af hverju prófunaríðefni (TC). Skýringarmynd af sýnskípulagi fyrir bakka með alla styrkleika í styrkferlunum fyrir viðmiðunarestrógen og samanburð er hér á eftir í töflu 4. Notaðir eru viðbótarmíkrotítunarbakkar fyrir prófunaríðefni og skulu innihalda bakkasamanburð, þ.e. i. háan (hámark þess að efninu er rutt frá) og miðlungsháan (u.p.b. IC<sub>50</sub>) styrkleika af E2 og efni sem binst veikt, þrjú sett; ii. samanburð með leysi (sem heildarbinding og ósértæk binding, sex sett af hvoru um sig (tafla 5). Dæmi um vinnublað vegna skipulags fyrir míkrotítunarbakka fyrir samkeppnisháða greiningu, þar sem notuð eru þrjú óþekkt prófunaríðefni, er að finna í viðbæti 3.3. Styrkleikar sem eru tilgreindir á vinnublaðinu sem og í töflum 4 og 5 eiga við um lokastyrk sem er notaður í hverri greiningarholu. Hámarksstyrkur fyrir E2 skal vera  $1 \times 10^{-7}$  M og fyrir efni sem binst veikt skal nota hæsta styrk sem er notaður fyrir efni sem binst veikt á bakka 1. Rannsóknarstofan verður að ákvarða IC<sub>50</sub>-styrkinn, byggt á rannsóknarsögulegum gagnagrunni hennar um samanburði. Búist er við að þetta gildi verði svipað því gildi sem kom fram í fullgildingarrannsóknunum (sjá töflu 1).

Tafla 4

**Skipulag míkrotítunarbakka fyrir samkeppnisháða bindingagreiningu, <sup>(1)</sup>, <sup>(2)</sup> allir styrkleikar fyrir styrkferla viðmiðunarestrógens og samanburða (bakki 1)**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Samanburður með jafnalausn og jákvæður samanburður (E2)			Veikur jákvæður samanburður (noretýnóðrel)			Neikvæður samanburður (oktýltríetoxýsílán)			TB og NSB		
A	Blanksýni (*)			$1 \times 10^{-9}$ M			$1 \times 10^{-10}$ M			TB (samanburður með leysi) (2,05% dímetýlsúlfoxíð)		
B	E2 ( $1 \times 10^{-11}$ M)			$1 \times 10^{-8}$ M			$1 \times 10^{-9}$ M					
C	E2 ( $1 \times 10^{-10}$ M)			$1 \times 10^{-7.5}$ M			$1 \times 10^{-8}$ M			NSB ( $10^{-6}$ M E2)		
D	E2 ( $1 \times 10^{-9.5}$ M)			$1 \times 10^{-7}$ M			$1 \times 10^{-7}$ M					
E	E2 ( $1 \times 10^{-9}$ M)			$1 \times 10^{-6.5}$ M			$1 \times 10^{-6}$ M			Samanburður með jafnalausn		
F	E2 ( $1 \times 10^{-8.5}$ M)			$1 \times 10^{-6}$ M			$1 \times 10^{-5}$ M					
G	E2 ( $1 \times 10^{-8}$ M)			$1 \times 10^{-5.5}$ M			$1 \times 10^{-4}$ M			Blanksýni (fyrir heitt) (**)		
H	E2 ( $1 \times 10^{-7}$ M)			$1 \times 10^{-4.5}$ M			$1 \times 10^{-3}$ M					

<sup>(1)</sup> Dæmi um uppsetningu fyrir staðlaðan míkrotítunarbakka sem á að nota í hverri tilraun.

<sup>(2)</sup> Athygli er vakin á því að þessi míkrotítunarbakki er útbúinn með því að nota þýnningar sem eru gerðar í þýnningarbakkanum sem lýst er fyrir staðlana í fyrri liðum. Í þessu dæmi er noretýnóðrel (NE) efnið sem binst veikt

(\*) raunverulegt blanksýni, hola ekki notuð

(\*\*) blanksýni ekki notað meðan viðstaða stendur yfir en notað til að staðfesta samanlagða viðbætta geislavirkni.

Tafla 5

**Skipulag mÍkrótítrunarbakka fyrir samkeppnisháða bindingagreiningu, viðbótarbakkar fyrir prófunaríðefni (TC) og bakkasamanburð**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Prófunaríðefni-1 (TC-1)			Prófunaríðefni-2 (TC-2)			Prófunaríðefni-3 (TC-3)			Samanburðir		
A	TC-1 ( $1 \times 10^{-10}$ M)			TC-2 ( $1 \times 10^{-10}$ M)			TC-3 ( $1 \times 10^{-10}$ M)			E2 ( $1 \times 10^{-7}$ M)		
B	TC-1 ( $1 \times 10^{-9}$ M)			TC-2 ( $1 \times 10^{-9}$ M)			TC-3 ( $1 \times 10^{-9}$ M)			E2 (IC <sub>50</sub> )		
C	TC-1 ( $1 \times 10^{-8}$ M)			TC-2 ( $1 \times 10^{-8}$ M)			TC-3 ( $1 \times 10^{-8}$ M)			NE ( $1 \times 10^{-4.5}$ M)		
D	TC-1 ( $1 \times 10^{-7}$ M)			TC-2 ( $1 \times 10^{-7}$ M)			TC-3 ( $1 \times 10^{-7}$ M)			NE (IC <sub>50</sub> )		
E	TC-1 ( $1 \times 10^{-6}$ M)			TC-2 ( $1 \times 10^{-6}$ M)			TC-3 ( $1 \times 10^{-6}$ M)			NSB ( $10^{-6}$ M E2)		
F	TC-1 ( $1 \times 10^{-5}$ M)			TC-2 ( $1 \times 10^{-5}$ M)			TC-3 ( $1 \times 10^{-5}$ M)					
G	TC-1 ( $1 \times 10^{-4}$ M)			TC-2 ( $1 \times 10^{-4}$ M)			TC-3 ( $1 \times 10^{-4}$ M)			TB (samanburður með leysi)		
H	TC-1 ( $1 \times 10^{-3}$ M)			TC-2 ( $1 \times 10^{-3}$ M)			TC-3 ( $1 \times 10^{-3}$ M)					

Í þessu dæmi er noretýnóðrel (NE) efnið sem binst veikt

*Lokið við samkeppnisháða bindingagreiningu*

37. Setja skal 50 µl af greiningarjafnalausn í hverja holu, þó ekki í holur fyrir samanlagða bindingu og blanksýni (fyrir heitar (geislavirkar)) eins og sýnt er í töflu 6, og blanda hana með 10 µl af samanburði með leysi, viðmiðunarestrógeni, efni sem binst veikt, efni sem binst ekki eða prófunaríðefnum, eftir því sem við á, og 10 µl af 5 nM [3H]-17β-estradióllausn. Síðan er 30µl af ískaldri viðtakalausn bætt í hvern bakka og blandað varlega saman. Síðasta prófefnið sem skal bæta við er hrERα-lausnin. MÍkrótítrunarbakkar fyrir greiningar skulu látnir standa við stofuhita (22–28 °C) í tvær klst.

Tafla 6

**Magn greiningarþátta fyrir samkeppnisháða hrER-bindingagreiningu, mÍkrótítrunarbakkar**

Tilreiðsluþrep	Annað en TB-holur	TB-holur	Blanksýni (fyrir heitar (geislavirkar))	
Magn þátta fyrir ofangreindar hvarfhólur og ísetningarröð	Greiningarjafnalausn við stofuhita	50 µl	60 µl	90 µl
	Ómerkt E2, efni sem binst veikt, efni sem binst ekki, leysir og prófunaríðefni (*)	10 µl	—	—
	[3H]-17β-estradiól til að gefa lokastyrk sem nemur 0,5 nM (þ.e. 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	Ákvarðaður hrERα-styrkur (sjá 12.–13. lið)	30 µl	30 µl	—
Heildarmagn í hverri greiningarholu	100 µl	100 µl	100 µl	

(\*) tilreitt með réttum hætti til að fá lokastyrk innan ásættanlegs leysisstyrks



38. Mælingin á [3H]-17 $\beta$ -estradíóli sem er bundið við hrER $\alpha$ , eftir aðskilnað[3H]-17 $\beta$ -estradíóls sem er bundið við hrER $\alpha$  frá óbundnu [3H]-17 $\beta$ -estradíóli með því að bæta 100  $\mu$ l af kaldri lausn dextranhúðaðra viðarkola (DCC) í hverja holu, skal síðan framkvæmd eins og lýst er í 21.–23. lið 3. viðauka fyrir mettnarbindingagreininguna.
39. Holur G10-12 og H10-12 (auðkenndar sem blanksýni (heit) í töflu 4) sýna dpm (sundrun á mínútu) fyrir [3H]-merkt estradíól í 10  $\mu$ l. Deiliskammturinn 10  $\mu$ l skal síðan settur beint í sindurvökvann.

### **Viðmiðanir fyrir ásættanleika**

#### *Mettunarbindingagreining*

40. Ferill sértækrar bindingar ætti að ná jafnvægi í takt við notkun á stighækkandi styrkleika [3H]-17 $\beta$ -estradíóls sem bendir til mettnar hrER $\alpha$  með bindli.
41. Sértæk binding við 0,5 nM af [3H]-17 $\beta$ -estradíóli ætti að vera innan viðunandi bilsins 30–50% af meðaltali mældrar samanlagðrar geislavirkni sem bætt er við í öllum keyrslum. Tilfallandi lítills háttar frávik utan þessa bils eru viðunandi en ef keyrslur eru stöðugt utan þessa bils eða ef tiltekin keyrsla er marktækt utan við þetta bil skal aðlaga styrk prótínsins og endurtaka mettnargreininguna.
42. Gögnin ættu að gefa af sér línulegt Scatchard-línurit.
43. Ósértæk binding skal ekki vera óhófleg. Gildi fyrir ósértæka bindingu skal alla jafna vera <35% af samanlagðri bindingu. Þó getur hlutfallið af og til farið yfir þessi mörk við mælingu á mjög lágu dpm (sundrun á mínútu) fyrir lægsta prófaða styrk geislamerks 17 $\beta$ -estradíóls.

#### *Samkeppnisháð bindingagreining*

44. Stighækkandi styrkleikar ómerkts 17 $\beta$ -estradíóls skulu ryðja [3H]-17 $\beta$ -estradíólinu burtu frá viðtakanum á þann hátt að það samræmist samkeppnisháðri bindingu við einn stað.
45. IC<sub>50</sub>-gildið fyrir viðmiðunarestrógenið (þ.e. 17 $\beta$ -estradíól) skal vera u.þ.b. jafnt og mólstyrkur [3H]-17 $\beta$ -estradíóls að viðbættu Kd sem er ákvarðað út frá mettnarbindingagreiningunni.
46. Samanlögð sértæk binding ætti ófrávikjanlega að vera innan viðunandi bilsins  $40 \pm 10$  % þegar meðaltal mælds styrks samanlagðrar geislavirkni, sem var bætt við hverja holu, var 0,5 nM í öllum keyrslum. Tilfallandi lítills háttar frávik utan þessa bils eru viðunandi en ef keyrslur eru stöðugt utan þessa bils eða ef tiltekin keyrsla er marktækt utan við þetta bil skal aðlaga styrk prótínsins.
47. Leysirinn skal ekki breyta næmi eða samanburðarnákvæmni greiningarinnar. Niðurstöðurnar fyrir samanburðinn með leysi (TB-holur) eru bornar saman við samanburðinn með jafnalausn til að sannreyna að leysirinn, sem er notaður, hafi ekki áhrif á greiningarkerfið. Niðurstöður heildarbindingar (TB) og samanburðar með jafnalausn ættu að vera sambærilegar ef leysirinn hefur engin áhrif á greininguna.
48. Efnið sem binst ekki skal ekki ryðja meira en 25% af [3H]-17 $\beta$ -estradíólinu burtu frá hrER $\alpha$  þegar það er prófað upp að  $10^{-3}$  M (oktyltriétooxýsýlan (OTES)) eða  $10^{-4}$  M (dí-n-bútýl)palat (DBP)).

49. Nothæfisviðmiðanir voru þróaðar fyrir viðmiðunarestrógen og tvö efni sem bindast veikt (t.d. noretýnódrel, noretýndrón) með notkun gagna úr fullgildingarrannsókninni á CER1-hrER-bindingagreiningunni (N-viðauki í 2. heimild). Gefið er 95% öryggisbil fyrir meðaltalið  $\pm$  SD (n) fyrir allar samanburðarkeyrslur í öllum fjórum rannsóknarstofum sem tóku þátt í fullgildingarrannsókninni. Reiknað var út 95% öryggisbil fyrir ferilaðlögungarbreyturnar (þ.e. toppur, botn, Hill-hallagildi og  $\log IC_{50}$ ) fyrir viðmiðunarestrógenið og efnið sem bindast veikt og  $\log_{10}RBA$  (hlutfallsleg bindisækni) af efnunum sem bindast veikt í hlutfalli við viðmiðunarestrógenið. Í töflu 1 eru gefin upp þau bil sem búið er við fyrir ferilaðlögungarbreyturnar sem hægt er að nota sem nothæfisviðmiðanir. Í reynd getur styrkbil  $IC_{50}$  verið eilítið breytilegt eftir Kd-gildi viðtökuefnablöndunnar, sem er leitt út í tilraunum, og styrk bindilsins sem er notaður í greiningunni.
50. Engar nothæfisviðmiðanir voru þróaðar fyrir ferilaðlögungarbreytur fyrir prófunariðefnið vegna þeirra margvíslegu mögulegu prófunariðefna sem til eru og breytileika í mögulegri sækni og útkomu (t.d. fullur ferill, hlutferrill, engin ferilaðlögung). Þó skal nota sérfræðiálit þegar farið er yfir niðurstöður úr hverri keyrslu fyrir prófunariðefni. Nota skal fullnægjandi styrkbil prófunariðefnisins til að skilgreina á skýran hátt toppinn (t.d. 90–100% binding) á ferli samkeppnisháðrar bindingar. Breytileiki í samhlíða prófunum á hverjum styrkleika prófunariðefnisins sem og í ósamskeiða keyrslunum þremur skal vera hæfilegur og vísindalega forsvaranlegur. Samanburðir úr hverri keyrslu fyrir prófunariðefni skulu nálgast þær mælingar á frammistöðu sem greint er frá fyrir þessa CER1-greiningu og vera í samræmi við rannsóknarsöguleg samanburðargögn frá hverri rannsóknarstofu fyrir sig.

#### GREINING GAGNA

#### Mettunarbindingagreining

51. Bæði samanlögð binding og ósértæk binding eru mældar. Sértek binding stighækkandi styrkleika af [3H]-17 $\beta$ -estradióli við jafnvægisáðstæður er reiknuð út frá þessum gildum með því að draga ósértæka bindingu frá samanlagðri bindingu. Línurit yfir sértæka bindingu á móti styrk [3H]-17 $\beta$ -estradióls ætti að ná jafnvægi fyrir hámark sértækrar bindingar sem bendir til mettnar hrER $\alpha$  með [3H]-17 $\beta$ -estradiólinu. Að auki ætti greining á gögnunum að færa sönnur á bindingu [3H]-17 $\beta$ -estradióls við einn bindistað með mikla sækni. Ósértæk binding, samanlögð binding og sértæk binding skal sýnd með ferli fyrir mettnarbindingu. Við frekari greiningu á þessum gögnum skal nota ólínulega aðhvarfsgreiningu (t.d. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) og sýna endanleg gögn sem Scatchard-línurit.
52. Við greiningu gagna skal ákvarða Bmax og Kd eingöngu út frá gögnum um samanlagða bindingu, á þeim forsendum að ósértæk binding sé línuleg, nema færð séu rök fyrir því að nota aðra aðferð. Að auki skal nota harðgert aðhvarf til að ákvarða bestu mátgæði nema færð séu rök fyrir öðru. Tilgreina skal valda aðferð við harðgert aðhvarf. Alltaf skal leiðrétta fyrir bindlatæmingu (t.d. með aðferð Swillens 1995) við að ákvarða Bmax og Kd út frá gögnum um mettnarbindingu.

#### Samkeppnisháð bindingagreining

53. Ferill samkeppnisháðrar bindingar er teiknaður upp sem sértæk [3H]-17 $\beta$ -estradiólbinding á móti styrk ( $\log_{10}$ -einingar) keppnautarins. Styrkur prófunariðefnis sem heftir 50% af hámarki sértækrar [3H]-17 $\beta$ -estradiólbindingar er  $IC_{50}$ -gildið.
54. Ákvarða skal áætluð  $\log(IC_{50})$ -gildi fyrir jákvæða samanburði (t.d. viðmiðunarestrógen og efni sem binst veikt) með því að nota viðeigandi ólínulegan ferilaðlögungarhugbúnað til að aðlaga Hill-jöfnu með fjórum breytum (t.d. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Alla jafna skal skilja topp, botn, hallatölu og  $\log(IC_{50})$  eftir óþvinguð þegar þessir ferlar eru aðlagðir. Nota skal harðgert aðhvarf til að ákvarða bestu mátgæði nema færð séu rök fyrir öðru. Ekki skal leiðrétta fyrir bindlatæmingu. Eftir upphaflega greiningu skal yfirfara hvern bindingaferil til að tryggja að hann falli á viðeigandi hátt að líkaninu. Hlutfallsleg bindingasækni (RBA) fyrir efnið sem binst veikt skal reiknuð út sem hundradshlutfall af  $\log(IC_{50})$  fyrir efnið sem binst veikt í hlutfalli við  $\log(IC_{50})$  fyrir 17 $\beta$ -estradiólið. Niðurstöður úr jákvæðum samanburðum og samanburði með efni sem binst ekki skulu metnar með því að nota mælikvarðana á nothæfi greiningarinnar í 44.-49. lið í þessum 3. viðbæti.

55. Gögn fyrir öll prófunaríðefni skulu greind með því að nota þrepskipta nálgun til að tryggja að gögnin séu greind með viðeigandi hætti og að hver ferill samkeppnisháðrar bindingar sé flokkaður á tilhlýðilegan hátt. Mælt er með því að hver keyrsla fyrir prófunaríðefni fari fyrst í gegnum staðlaða gagnagreiningu sem er nákvæmlega eins og sú sem er notuð fyrir viðmiðunarestrógen og samanburðarefni sem bindast veikt (sjá 54. lið í þessum 3. viðbæti). Þegar því er lokið skal gera tæknilega endurskoðun á ferilaðlögunarbreytunum og einnig gera sjónræna skoðun á því hversu vel gögnin falla að fengnum ferli samkeppnisháðrar bindingar fyrir hverja keyrslu. Meðan þessi tæknilega endurskoðun stendur yfir eru athuganir á styrkháðri lækkun á hundradshlutfalli sértækt bundins [3H]-17β-estradióls, lítill breytileiki milli tæknilegra samhliða prófana fyrir hvern styrkleika prófunaríðefna og samkvæmni í aðlögunarbreytum milli keyrslanna þriggja góð vísbinding um að greiningin og gagnagreiningin hafi verið framkvæmd með viðeigandi hætti.

### Túlkun gagna

56. Litið er svo á að prófunaríðefni bindist hrERα ef hægt er að aðlaga bindingarferilinn og neðsti punkturinn á svörunarferlinum innan gagnasviðsins er minni en 50% (mynd 1), að því tilskildu að allar viðmiðanirnar fyrir ásættanleika séu uppfylltar.
57. Að því tilskildu að allar viðmiðanirnar fyrir ásættanleika séu uppfylltar er litið svo á að prófunaríðefni bindist ekki hrERα ef:
- hægt er að aðlaga bindingaferil og neðsti punkturinn á aðlagða svörunarferlinum innan gagnasviðsins er ofan við 75% eða
  - ekki er hægt að aðlaga bindingaferil og lægsta óaðlagða meðaltal hundradshlutfallsbindingar í styrkleikahópunum í gögnunum er ofan við 75%.
58. Prófunaríðefni teljast tvíræð ef ekkert af ofangreindum skilyrðum er uppfyllt (t.d. neðsti punktur á aðlagða svörunarferlinum er á bilinu 76–51%).

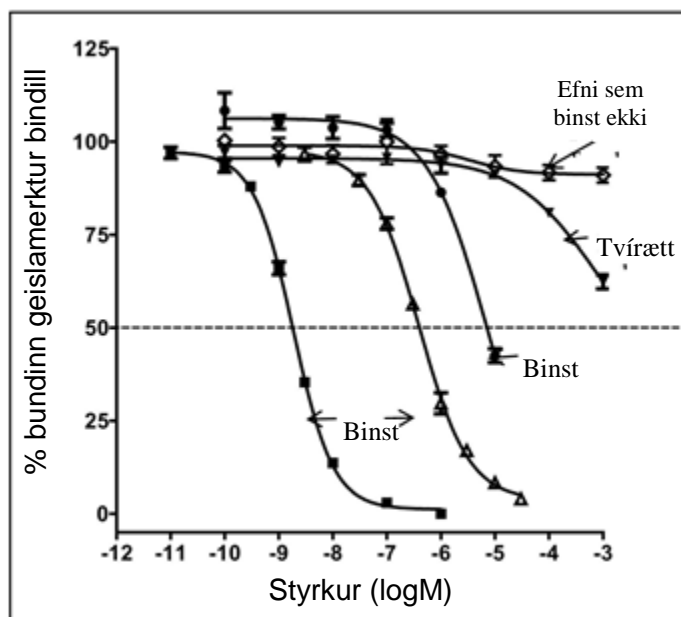
### Tafla 7

#### Viðmiðanir fyrir flokkun á grundvelli ferils samkeppnisháðrar bindingar fyrir prófunaríðefni

Flokkun	Viðmiðanir
Binst <sup>a</sup>	Hægt er að aðlaga bindingaferil. Neðsti punkturinn á svörunarferlinum innan gagnasviðsins er minni en 50%.
Binst ekki <sup>b</sup>	Ef hægt er að aðlaga bindingaferil, er neðsti punkturinn á aðlagða svörunarferlinum innan gagnasviðsins ofan við 75%. Ef ekki er hægt að aðlaga bindingaferil, er lægsta óaðlagða meðaltal hundradshlutfallsbindinga í styrkleikahópunum í gögnunum ofan við 75%.
Tvírætt <sup>c</sup>	Sérhver prófanleg keyrsla sem sýnir hvorki efni sem binst eða binst ekki (t.d. neðsti punkturinn á aðlagða svörunarferlinum er á bilinu 76–51%).

Mynd 1

Dæmi um flokkun prófunariðefnis með því að nota feril samkeppnisháðrar bindingar



59. Margar keyrslur fyrir prófunariðefni, sem eru framkvæmdar innan rannsóknarstofu, eru settar saman með því að úthluta hverri keyrslu tölugildi og reikna út meðaltalið fyrir allar keyrslurnar eins og sýnt er í töflu 8. Niðurstöður úr samsettum keyrslum innan hvorrar rannsóknarstofu eru bornar saman við þá flokkun sem búist var við fyrir hvert prófunariðefni.

Tafla 8

Aðferð til að flokka prófunariðefni með því að nota margar keyrslur innan rannsóknarstofu

Gildi úthlutað á hverja keyrslu:	
Flokkun	Tölugildi
Binst	2
Tvírætt	1
Binst ekki	0
Til að flokka meðaltal tölugilda í öllum keyrslum:	
Flokkun	Tölugildi
Binst	Meðaltal $\geq 1,5$
Tvírætt	$0,5 \leq$ meðaltal $< 1,5$
Binst ekki	Meðaltal $< 0,5$

PRÓFUNARSKÝRSLA

60. Sjá 24. lið í „ÞÆTTIR hrER-BINDINGAGREININGAR“ í þessari prófunaraðferð.

*Viðbætur 3.1*

## SKRÁ YFIR HUGTÖK

**[3H]E2:** 17 $\beta$ -estradiól, geislamerkt með trítúmi

**DCC:** Dextranhúðuð viðarkol

**E2:** Ómerkt 17 $\beta$ -estradiól (óhvarfgjarn)

**Greiningarjafnalausn:** 10 mM Tris-HCl, pH-gildi 7,4, inniheldur 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 10% glýseról, 0,2 mM levpeptín, 1 mM díþíóþreitól og 10 mg/ml nautgripasermisalbúmín

**hrER $\alpha$ :** Endurraðaður  $\alpha$ -estrógenviðtaki úr mönnum (bindisvæði bindils)

**Samhliða prófun:** Ein af mörgum holum, sem innihalda sama innihald í sömu styrkleikum, sem greining er gerð á samhliða greiningu innan einnar keyrslu. Í þessari aðferðarlýsingu er hver styrkleiki prófunaríðefnis prófaður í þremur settum; þ.e. gerð er greining á þremur samhliða prófunum samhliða með hverjum styrkleika prófunaríðefnis.

**Keyrsla:** Heilt sett af greiningarholum í míkrotítunarbökkum, sem er keyrt samskeiða, sem veitir allar þær upplýsingar sem eru nauðsynlegar til að lýsa einkennum bindingar prófunaríðefnis við hrER $\alpha$  (þ.e.a.s. heildarmagn [3H]-17 $\beta$ -estradióls sem er bætt í greiningarholuna, hámarksbinding [3H]-17 $\beta$ -estradióls við hrER $\alpha$ , ósértæk binding og samanlögð binding við mismunandi styrkleika prófunaríðefnisins). Keyrsla getur verið með allt niður í eina greiningarholu (þ.e. samhliða prófun) á hvern styrkleika en sökum þess að þessi aðferðarlýsing útheimtir greiningu í þremur settum samanstendur ein keyrsla af þremur greiningarholum á hvern styrkleika. Þar að auki útheimtir þessi aðferðarlýsing þrjár sjálfstæðar (þ.e. ósamskeiða) keyrslur á hvert íðefni.

## Viðbætur 3.2

## SKIPULAG Á GREININGARHOLUM FYRIR SAMKEPPNISHÁÐA BINDINGAGREININGU

Bakki	Staðsetning	Samhlíða prófurn	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	A1	1	Blanksýni	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Blanksýni	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Blanksýni	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	kalt E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	kalt E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	kalt E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	kalt E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	kalt E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	kalt E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	kalt E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	kalt E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10

Bakki	Staðsetning	Samhliða próftun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	D3	3	kalt E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	E1	1	kalt E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	kalt E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	kalt E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	kalt E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F2	2	kalt E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F3	3	kalt E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	G1	1	kalt E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G2	2	kalt E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	kalt E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	kalt E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	kalt E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	kalt E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07

Bakki	Staðsetning	Samhliða próftun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavírt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	A4	1	noretýnóðrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	noretýnóðrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	noretýnóðrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	noretýnóðrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	noretýnóðrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	noretýnóðrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	noretýnóðrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C5	2	noretýnóðrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C6	3	noretýnóðrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	D4	1	noretýnóðrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	noretýnóðrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	noretýnóðrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	noretýnóðrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07



Bakki	Staðsetning	Samhliða próftun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavírt) EZ) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynnngarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	E5	2	noretýnóðrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E6	3	noretýnóðrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	F4	1	noretýnóðrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	noretýnóðrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	noretýnóðrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	noretýnóðrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G5	2	noretýnóðrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G6	3	noretýnóðrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	H4	1	noretýnóðrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H5	2	noretýnóðrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H6	3	noretýnóðrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

Bakki	Staðsetning	Samhliða próftun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavírt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynnningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Bakki	Staðsetning	Samhliða próftun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavírt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8D BP7	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES88	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	A10	1	samanlögð binding	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
S	A11	2	samanlögð binding	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	samanlögð binding	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	samanlögð binding	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	-

Bakki	Staðsetning	Samhliða prófurn	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynnningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	B11	5	samanlögð binding	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	samanlögð binding	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	kalt E2 (hátt)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	kalt E2 (hátt)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	kalt E2 (hátt)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	kalt E2 (hátt)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D11	5	kalt E2 (hátt)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D12	6	kalt E2 (hátt)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	Samanburður með jafnalausn	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	Samanburður með jafnalausn	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	Samanburður með jafnalausn	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	Samanburður með jafnalausn	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	Samanburður með jafnalausn	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	Samanburður með jafnalausn	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	Blanksýni (fyrir heitar (geislavirkar))	Heitt	H1	—	90	—	10	—	100	—

Bakki	Staðsetning	Samhliða próftun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	G11 (*)	2	Blanksýni (fyrir heitar (geislavirkar))	Heitt	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	Blanksýni (fyrir heitar (geislavirkar))	Heitt	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	Blanksýni (fyrir heitar (geislavirkar))	Heitt	H4	—	90	—	10	—	100	—
S	H11 (*)	5	Blanksýni (fyrir heitar (geislavirkar))	Heitt	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	Blanksýni (fyrir heitar (geislavirkar))	Heitt	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	Óþekkt 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	Óþekkt 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	Óþekkt 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	Óþekkt 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	Óþekkt 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	Óþekkt 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	Óþekkt 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	Óþekkt 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	Óþekkt 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08

Bakki	Staðsetning	Samhliða próftun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavírt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
P1	D1	1	Óþekkt 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	Óþekkt 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	Óþekkt 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	Óþekkt 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	Óþekkt 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	Óþekkt 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	Óþekkt 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	Óþekkt 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	Óþekkt 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	Óþekkt 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	Óþekkt 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	Óþekkt 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	Óþekkt 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	Óþekkt 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

Bakki	Staðsetning	Samhliða próftun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavírt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynnningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
P1	H3	3	Óþekkt 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	Óþekkt 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	Óþekkt 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	Óþekkt 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	Óþekkt 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	Óþekkt 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	Óþekkt 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	Óþekkt 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	Óþekkt 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	Óþekkt 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	Óþekkt 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	Óþekkt 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	Óþekkt 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	Óþekkt 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Bakki	Staðsetning	Samhliða próftun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavírt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
P1	E5	2	Óþekkt 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	Óþekkt 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	Óþekkt 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	Óþekkt 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	Óþekkt 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	Óþekkt 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	Óþekkt 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	Óþekkt 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	Óþekkt 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	Óþekkt 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	Óþekkt 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A7	1	Óþekkt 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	Óþekkt 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A9	3	Óþekkt 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10



Bakki	Staðsetning	Samhliða próftun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavírt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
P1	B7	1	Óþekkt 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	Óþekkt 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	Óþekkt 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	Óþekkt 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	Óþekkt 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	Óþekkt 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	Óþekkt 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	Óþekkt 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	Óþekkt 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	Óþekkt 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	Óþekkt 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	Óþekkt 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	Óþekkt 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	Óþekkt 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05

Bakki	Staðsetning	Samhliða próftun	Tegund holtu	Kóði holtu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavírt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynnngarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
P1	F9	3	Óþekkt 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	Óþekkt 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	Óþekkt 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	Óþekkt 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	Óþekkt 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	Óþekkt 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	Óþekkt 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	Samanburður E2 (hám.)	S	E2max1	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	Samanburður E2 (hám.)	S	E2max2	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	Samanburður E2 (hám.)	S	E2max3	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	Samanburður E2 (IC <sub>50</sub> )	S	E2IC501	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B11	2	Samanburður E2 (IC <sub>50</sub> )	S	E2IC502	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	Samanburður E2 (IC <sub>50</sub> )	S	E2IC503	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50

Bakki	Staðsetning	Samhliða próftun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavírt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
P1	C10	1	Samanburður NE (hám.)	S	Nemax1	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	Samanburður NE (hám.)	S	Nemax2	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	Samanburður NE (hám.)	S	Nemax3	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	Samanburður NE (IC <sub>50</sub> )	S	NEIC501	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	Samanburður NE (IC <sub>50</sub> )	S	NEIC502	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	Samanburður NE (IC <sub>50</sub> )	S	NEIC503	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	kalt E2 (hátt)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	kalt E2 (hátt)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	kalt E2 (hátt)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	kalt E2 (hátt)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	kalt E2 (hátt)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	kalt E2 (hátt)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Bakki	Staðsetning	Samhlíða próftun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) EZ) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynnningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
P1	G10	1	samanlögð binding	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	samanlögð binding	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	samanlögð binding	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
P1	H10	4	samanlögð binding	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	samanlögð binding	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	samanlögð binding	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—

(\*) Athygli er vakin á því að „heitar“ (geislavirkar) holur eru tómar meðan viðstaðan stendur yfir. Rúmmálinu 10 µl er einungis bætt við vegna sindurtalningar.

## 4. viðbætur

ATRÍÐI SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA VIÐ GREININGU GAGNA ÚR SAMKEPPNISHÁÐRI HRER-BINDINGAGREININGU

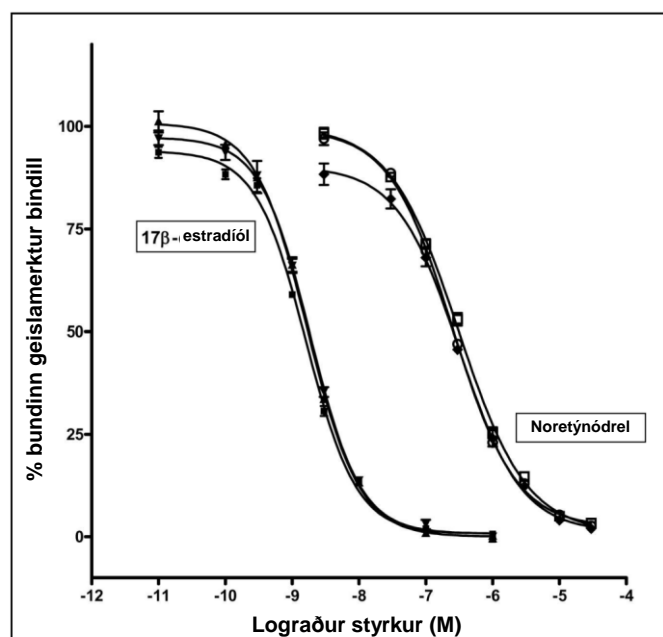
1. Í samkeppnisháðri hrER $\alpha$ -bindingagreiningu er binding eins styrkleika af [3H]-17 $\beta$ -estradióli mæld við stighækkandi styrkleika prófunaríðefnis. Ferill samkeppnisháðrar bindingar er teiknaður upp sem sértæk [3H]-17 $\beta$ -estradiólbinding á mótí styrk (log<sub>10</sub>-einingar) keppinautarins. Styrkur prófunaríðefnis sem heftir 50% af hámarki sértækrar [3H]-17 $\beta$ -estradiólbindingar er IC<sub>50</sub>.

Greiningu gagna um viðmiðunarestrógen og efni sem bindast veikt (1)

2. Gögnum úr samanburðarkeyrslunum er umbreytt (þ.e. hundraðshlutfall [3H]-17 $\beta$ -estradiólsértækrar bindingar og logaður styrkur samanburðaríðefnisins) fyrir frekari greiningar. Ákvarða skal áætluð log(IC<sub>50</sub>)-gildi fyrir jákvæða samanburði (t.d. viðmiðunarestrógen og efni sem binst veikt) með því að nota viðeigandi ólínulegan ferilaðlögunarhugbúnað til að aðlaga Hill-jöfnu með fjórum breytum (t.d. BioSoft; GraphPad Prism) (2. heimild). Alla jafna er hægt að skilja topp, botn, hallatölu og log(IC<sub>50</sub>) eftir óþvinguð þegar þessir ferlar eru aðlagðir. Nota skal harðgert aðhvarf til að ákvarða bestu mátgæði nema færð séu rök fyrir öðru. Tilgreina skal valda aðferð við harðgert aðhvarf. Ekki var þörf á leiðréttingu fyrir bindlatæmingu fyrir FW- eða CERI-hrER-greiningarnar en ef þörf krefur má íhuga það. Eftir upphaflega greiningu skal yfirfara hvern bindingaferil til að tryggja að hann falli á viðeigandi hátt að líkaninu. Hægt er að reikna út hlutfallslega bindingasækni (RBA) fyrir efnið sem binst veikt sem hundraðshlutfall af log(IC<sub>50</sub>) fyrir efnið sem binst veikt í hlutfalli við log(IC<sub>50</sub>) fyrir 17 $\beta$ -estradiólið. Niðurstöður úr jákvæðum samanburðum og samanburði með efni sem binst ekki skulu metnar með því að nota mælikvarðana á nothæfi greiningarinnar og viðmiðanirnar fyrir ásætlanleika sem lýst er í þessari prófunaraðferð (20. liður), 2. viðbæti (FW-greining, 41.–51. liður) og 2. viðbæti (CERI-greining, 41.–51. liður). Dæmi um 3 keyrslur fyrir viðmiðunarestrógen og efni sem binst veikt eru sýnd á mynd 1.

Mynd 1

Dæmi um ferla samkeppnisháðrar bindingar fyrir viðmiðunarestrógenið og samanburðarefni sem binst veikt

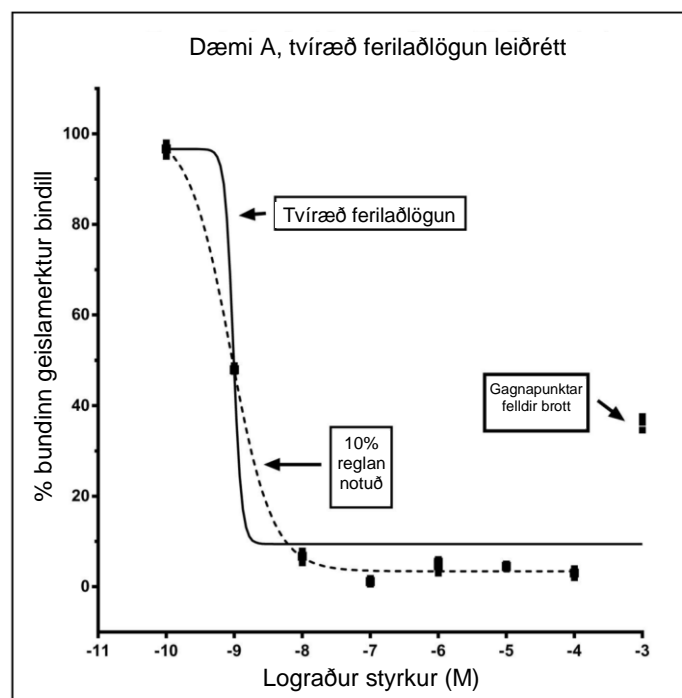


## Greining gagna um prófunaríðefni

- Gögn fyrir öll prófunaríðefni skulu greind með því að nota þrepskipta nálgun til að tryggja að gögnin séu greind með viðeigandi hætti og að hver ferill samkeppnisháðrar bindingar sé flokkaður á tilhlýðilegan hátt. Hver keyrsla fyrir prófunaríðefni skal fyrst fara í gegnum staðlaða gagnagreiningu sem er nákvæmlega eins og sú sem er notuð fyrir viðmiðunarestrógen og samanburðarefni sem bindast veikt. Þegar því er lokið skal gera tæknilega endurskoðun á ferilaðlögunarbreytunum og einnig gera sjónræna skoðun á því hversu vel gögnin falla að fengnum ferli samkeppnisháðrar bindingar fyrir hverja keyrslu. Meðan þessi tæknilega endurskoðun stendur yfir eru athuganir á styrkháðri lækkun á hundradshlutfalli sértækt bundins [3H]-17β-estradióls, lítill breytileiki milli tæknilegra samhliða prófana fyrir hvern íðefnastyrkleika og samkvæmni í aðlögunarbreytum milli keyrslanna þriggja góð vísing um að greiningin og gagnagreiningin hafi verið framkvæmd með viðeigandi hætti. Nota skal sérfræðiálit þegar farið er yfir niðurstöður úr hverri keyrslu fyrir prófunaríðefni og gögnin sem eru notuð til að flokka hvert prófunaríðefni sem efni sem binst eða binst ekki skulu vera vísindalega forvaranleg.
- Af og til geta komið fram gögn sem þarf að gefa meiri gaum til að greina og túlka gögnin um hrER-bindingu á viðeigandi hátt. Fyrri rannsóknir hafa leitt í ljós tilvik þar sem greining og túlkun gagna um samkeppnisháða viðtakabindingu geta orðið flóknari vegna hækkunar á hundradshlutfalli sértækrar bindingar þegar íðefni eru prófuð við hæsta styrk (mynd 2). Þetta er vel þekkt atriði sem komið hefur upp við notkun á aðferðarlýsingum fyrir nokkrar samkeppnishæfar greiningar á bindingu við viðtaka (3. heimild). Í þessum tilvikum kemur styrkháð svörun fram við lægri styrkleika en þegar styrkur prófunaríðefnisins nálgast leysnimörkin dregur ekki lengur úr því að [3H]17β-estradiólinu sé rutt frá. Í þessum tilvikum benda gögn um meiri styrk til þess að líffræðilegum mörkum greiningarinnar hafi verið náð. Þetta fyrirbæri er t.d. oft tengt óleysanleika íðefnis og botnfalli við háan styrk eða getur einnig endurspeglad að farið hafi verið yfir getu dextranhúðuðu viðarkolanna til að fanga óbundna geislamerktu bindilinn í aðskilnaðarferlinu við hæstu íðefnastyrkleikana. Ef slíkir gagnapunktur eru skildir eftir þegar gögn samkeppnisháðrar bindingar eru aðlöguð að sigmoid-ferli getur það stundum leitt til þess að ER-bindingarmáttur prófunaríðefnis sé ranglega flokkaður (mynd 2). Til að komast hjá þessu innihalda aðferðarlýsingar fyrir FW- og CER1-hrER-bindingagreiningarnar möguleikann á því að undanskilja gagnapunkta úr greiningunum ef meðaltal samhliða prófana fyrir hundradshlutfall sértækrar [3H]17β-estradiólbindingar er 10% eða meira yfir meðaltalinu sem kom fram við lægri styrk (þ.e. þetta er yfirleitt kallað 10% reglan). Þessa reglu er einungis hægt að nota einu sinni fyrir tiltekinn feril og það verða að standa eftir gögn fyrir a.m.k. 6 styrkleika þannig að hægt sé að flokka ferilinn með réttum hætti.

## Mynd 2

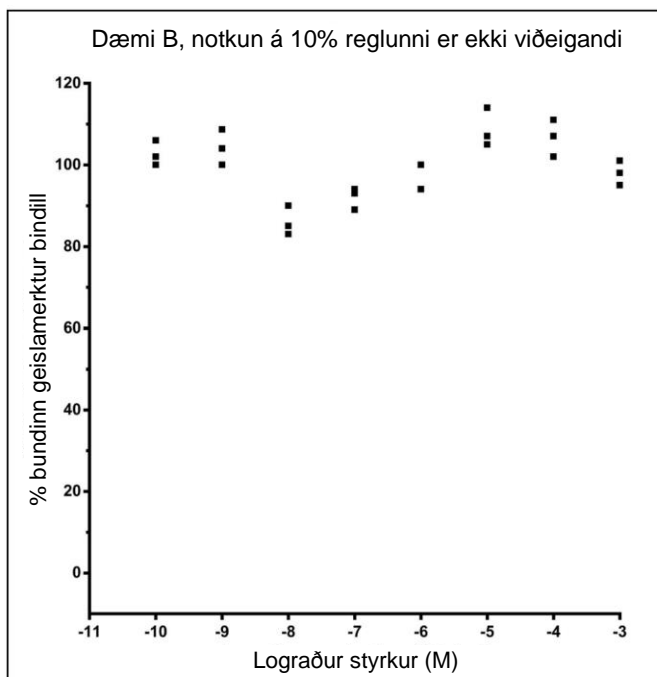
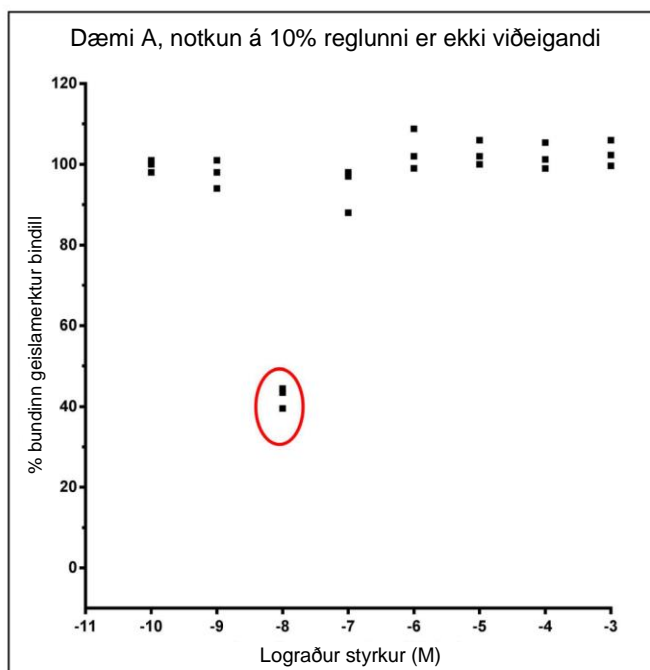
## Dæmi um ferla samkeppnisháðrar bindingar með og án notkunar á 10% reglunni



5. Viðeigandi notkun á 10% reglunni til að leiðrétta þessa ferla skal gaumgæfð vandlega og einungis notuð í tilvikum þar sem sterkar vísbendingar eru um efni sem binst hrER. Meðan tilraunir vegna fullgildingarrannsóknar á FW-hrER-bindingagreiningunni stóðu yfir kom í ljós að 10% reglan hafði stundum ótilætlaðar og ófyrirséðar afleiðingar. Íðefni sem höfðu enga víxlverkun á viðtakann (þ.e. eiginleg efni sem bindast ekki) sýndu oft breytileika ef binding geislamerkts bindils var 100% sem var meiri en 10% í öllum styrkbilum sem voru prófuð. Ef svo vildi til að lægsta gildið væri við lágan styrk væri mögulega hægt að fella gögn um alla hærri styrkleika brott úr greiningunni með því að nota 10% regluna, jafnvel þó að þessir styrkleikar gætu komið að gagni við að ákvarða hvort íðefnið sé efni sem binst ekki. Í mynd 3 eru dæmi um tilvik þar sem notkun á 10% reglunni er ekki viðeigandi.

Mynd 3

**Dæmi, gögn um samkeppnisbindingu þar sem notkun á 10% reglunni er ekki viðeigandi.**



## Tilvísanir

- 1) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER $\alpha$ ), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 2) Motulsky H. and Christopoulos A. (2003). The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, bls. 187-191. [www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf](http://www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf)
- 3) Laws SC, Yavanhaxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors. *Toxicological Sci.* 94(1):46-56.“

**B.71 GREININGAR Í GLASI Á HÚÐNÆMINGU ÞAR SEM FENGIST ER VIÐ LYKILATBURÐINN VIRKJUN ANGAFRUMA Í FERLI NEIKVÆÐRA AFLEIÐINGA (AOP) M.T.T. HÚÐNÆMINGARIN VITRO SKIN SENSITISATION ASSAYS ADDRESSING THE KEY EVENT ON ACTIVATION OF DENDRITIC CELLS ON THE ADVERSE OUTCOME PATHWAY (AOP) FOR SKIN SENSITISATION**

## ALMENNUR INNGANGUR

**Prófunaraðferð sem byggir á lykilatburðinum virkjun angafruma**

1. Með húðnæmi er átt við efni sem leiðir til ofnæmissvörunar í kjölfar snertingar við húð, eins og skilgreint er í hnattsamræmdu kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK-SÞ) (1. heimild) og reglugerð Evrópusambandsins (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og þökkun efna og blandna (reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og þökkun)<sup>(1)</sup>. Almenn samkomulag er um helstu líffræðilegu atburði sem liggja að baki húðnæmingu. Núverandi þekking á efnafræðilegu og líffræðilegu gangvirki sem tengist húðnæmingu hefur verið tekin saman sem ferli neikvæðra afleiðinga samkvæmt áætlun Efnahags- og framfarastofnunarinnar um ferli neikvæðra afleiðinga (AOP programme) (2. heimild) og hefst á sameindaræsingunni, um milliátburðina, að neikvæðu áhrifunum, þ.e.a.s. húðbólgu vegna snertiofnæmis. Í þessu tilviki er sameindaræsingin (þ.e. fyrsti lykilatburðurinn) samgild tenging rafsækinnna efna við kjarnasækna miðju húðprótína. Annar lykilatburðurinn í þessu ferli neikvæðra afleiðinga fer fram í hrynisfrumum og nær yfir bólguviðbrögð sem og breytingar á genatjáningu sem tengist tilteknum boðleiðum frumna (e. *cell signalling pathway*), t.d. ferli sem eru háð svörunarseti andoxunarefna/rafsækinnna efna (ARE)) (e. *antioxidant/electrophile response element (ARE)-dependent pathways*). Þriðji lykilatburðurinn er virkjun angafruma, yfirleitt metin með tjáningu sértækra frumuyfirborðsmarka, flakkboða og frumuboða. Fjórði lykilatburðurinn er virkjun og fjölgun T-frumna sem er metin óbeint í eitlagreiningu á músnum (3. heimild).
2. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 442E um prófanir (2017). Þar er lýst greiningum *í glasi* þar sem fengist er við gangvirkin sem lýst er samkvæmt lykilatburðinum um virkjun angafruma í ferli neikvæðra afleiðinga m.t.t. húðnæmingar (2. heimild). Prófunaraðferðin inniheldur prófanir sem á að nota til stuðnings við að skilja á milli húðnæma og efna sem eru ekki næmandi í samræmi við hnattsamræmt kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK-SÞ) og reglugerð (EB) nr. 1272/2008.

Prófanirnar sem lýst er í þessari prófunaraðferð eru:

- Virkjunarprófun með frumulínu úr mönnum (h-CLAT-prófun)
- Virkjunarprófun með U937-frumulínu (U-SENS<sup>TM</sup>-prófun)
- Vísigenspróf hvítfrumuboða-8 (IL-8 Luc-próf)

3. Prófanirnar sem þessi prófunaraðferð nær yfir og samsvarandi OECD-viðmiðunarregla um prófanir geta verið ólíkar með tilliti til verklagsins sem er notað til að afla gagnanna og aflestrarins sem er mældur en hægt er að nota þær án greinarmunar til að uppfylla kröfur landa um prófunarniðurstöður er varða lykilatburðinn um virkjun angafruma í ferli neikvæðra afleiðinga m.t.t. húðnæmingar og njóta um leið góðs af gagnkvæmri samþykkt gagna samkvæmt Efnahags- og framfarastofnuninni.

<sup>(1)</sup> Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1272/2008 frá 16. desember 2008 um flokkun, merkingu og þökkun efna og blandna, um breytingu og niðurfellingu á tilskípunum 67/548/EBE og 1999/45/EB og um breytingu á reglugerð (EB) nr. 1907/2006 (Stjtið. EB L 353, 31.12.2008, bls. 1).



**Bakgrunnur og meginreglur prófananna sem falla undir prófunaraðferðina sem byggir á lykilotburðinum**

4. Mat á húðnæmingu hefur oftast falið í sér notkun tilraunadýra. Með sígildum aðferðum þar sem naggrísir eru notaðir, prófun Magnusson og Klígman „Guinea Pig Maximisation Test (GPMT)“ (hámörkunarprófun á naggrísum) og „Buehler-prófun“ (prófunaraðferð B.6 (4. heimild)), eru bæði örvunar- og framköllunarstig húðnæmingar metin. Músaprófanir, eitlagreining (LLNA) (prófunaraðferð B.42 (3. heimild)) og ógeislavirku, breyttu aðferðirnar tvær, LLNA: DA (prófunaraðferð B.50 (5. heimild)) og LLNA: BrdU-ELISA (prófunaraðferð B.51 (6. heimild)), meta allar eingöngu viðbrögð við örvun og hafa einnig hlotið viðurkenningu því þær eru fremri prófunum á naggrísum með tilliti til velferðar dýra ásamt því að vera hlutlæg mæling á örvunarstigi húðnæmingar.
5. Nýlega voru prófunaraðferðir sem byggja á gangvirkjum í prófunum *í efni* og *í glasi* þar sem fengist er við fyrsta lykilotburðinn (prófunaraðferð B.59; bein prófun á hvarfgirni við peptíð (7. heimild)) og annan lykilotburðinn (prófunaraðferð B.60; prófunaraðferð með ARE-Nrf2-lúsíferasa (8. heimild)) innan ferlis neikvæðra afleiðinga sem valda húðnæmingu samþykktar til að stuðla að því að meta hugsanlega hættu af húðnæmingarmætti íðefna.
6. Í prófunum, sem er lýst í þessari prófunaraðferð, er magngreind annaðhvort breytingin á tjáningu frumuyfirborðsmarka sem tengist ferli við virkjun einkjörnunga og angafruma eftir váhrif frá næmandi efnum (t.d. CD54, CD86) eða breytingar á tjáningu IL-8, frumuboða sem tengist virkjun angafruma. Skýrt hefur verið frá því að húðnæmar örvi tjáningu frumuhimnumarka (e. *cell membrane marker*), s.s. CD40, CD54, CD80, CD83 og CD86, auk þess að örva bólgumyndandi frumuboða, s.s. IL-1β og TNF-α, og nokkra flakkuboða, þ.m.t. IL-8 (CXCL8) og CCL3 (9.–12. heimild) sem tengjast virkjun angafruma (2. heimild).
7. Þar eð virkjun angafruma er einungis einn lykilotburður innan ferlis neikvæðra afleiðinga sem valda húðnæmingu (2. og 13. heimild) eru þó upplýsingar, sem er verða til með prófunum sem mæla einungis marka angafrumuvirkjunar, e.t.v. ekki nægilegar til að komast að niðurstöðu um hvort húðnæmingarmáttur íðefna er fyrir hendi eða ekki. Þess vegna er fyrirhugað að gögn, sem er aflað með prófunum sem er lýst í þessari prófunaraðferð, séu til stuðnings við að skilja á milli húðnæma (þ.e. í 1. undirflokk HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) og efna sem eru ekki næmandi þegar þau eru notuð innan samþættra aðferða við prófun og mat (IATA) ásamt öðrum viðbótarupplýsingum sem skipta máli, t.d. fengnar úr greiningum *í glasi* þar sem fengist er við aðra lykilotburði innan ferlis neikvæðra afleiðinga sem valda húðnæmingu sem og aðferðum án prófana, þ.m.t. ályktunum út frá byggingarlega hliðstæðum efnum um efnafræðilega hliðstæð efni. Dæmi um notkun á gögnum sem er aflað með þessum prófunum innan skilgreindra aðferða, þ.e. aðferða sem er staðlaðar bæði með tilliti til upplýsingaveita sem eru notaðar og aðferða sem er beitt á gögnin til að leiða út spár, hafa verið birt (13. heimild) og hægt er að nota þau sem gagnlega þætti innan samþættra aðferða við prófun og mat.
8. Ekki er hægt að nota prófanirnar, sem er lýst í þessari prófunaraðferð, einar og sér, hvorki fyrir yfirvöld, sem nota þessa tvo valkvæðu undirflokka, til að undirflokka húðnæma í undirundirflokk 1A og 1B, eins og skilgreint er í HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008, né til að spá fyrir um mátt vegna ákvarðana um öryggismat. Þó má nota jákvæðar niðurstöður, sem eru fengnar með þessum aðferðum, einar og sér til að flokka íðefni í 1. undirflokk HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008, háð reglurammanum.
9. Heitið „prófunariðefni“ er notað í þessari prófunaraðferð til að vísa til þess sem verið er að prófa <sup>(1)</sup> og tengist ekki nothæfi prófana til að prófa efni með einum efnisþætti, fjölþáttaefni og/eða blöndur. Sem stendur eru takmarkaðar upplýsingar fyrirleggjandi um nothæfi prófananna á fjölþáttaefni/blöndur (14. og 15. heimild). Tæknilega séð teljast prófanirnar samt sem áður nothæfar til prófunar á fjölþáttaefnum og blöndum. Áður en þessi aðferð til prófunar á blöndu, sem er framkvæmd til að fá gögn sem fyrirhugað er að nota í eftirlitsskyni, er notuð skal þó skoðað hvort, og þá af hverju, hún gæti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi <sup>(2)</sup>. Ekki er þörf á slíkri skoðun ef prófun á blöndunni er krafa af hálfu eftirlitsyfirvalda. Við prófanir á fjölþáttaefnum eða blöndum skal enn fremur einnig kanna hugsanlegar truflanir frumueitrandi efnisþátta á mældu svörum.

(1) Á sameiginlegum fundi Efnahags- og framfarastofnunarinnar í júní 2013 var einhugur um að beita ætti samræmdari notkun á hugtakinu „prófunariðefni“, þegar unnt er, í nýjum og uppfærðum OECD-viðmiðunarreglum um prófanir til að lýsa því sem er prófað.

(2) Þessi málsliður var lagður til og samþykktur á WNT-fundi í apríl 2014.

**HEIMILDIR**

- 1) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Aðgengilegt á: [https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev06/06files\\_e.html](https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html)
- 2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Aðgengilegt á: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- 3) Kafli B.42 í þessum viðauka: Eitlagreining
- 4) Kafli B.6 í þessum viðauka: Húðnæming.
- 5) Kafli B.50 í þessum viðauka: Húðnæming: DA-eitlagreining.
- 6) Kafli B.51 í þessum viðauka: Húðnæming: BrdU-ELISA-eitlagreining.
- 7) Kafli B.59 í þessum viðauka: Húðnæming í efni: Bein prófun á hvarfgirmi við peptíð (DPRA).
- 8) Kafli B.60 í þessum viðauka: Húðnæming í glasi: Prófunaraðferð með ARE-Nrf2-lúsífferasa.
- 9) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-96.
- 10) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 180:1841-7.
- 11) Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27:3031-8.

- 12) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl<sub>2</sub> and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390-8.
- 13) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Aðgengilegt á: <https://community.oecd.org/community/iatass>.
- 14) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- 15) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

## 1. viðbætur

## HÚÐNÆMING Í GLASI: VIRKJUNARPRÓFUN MEÐ FRUMULÍNU ÚR MÖNNUM (H-CLAT-PRÓFUN)

## ATRIDI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

1. Í h-CLAT-prófun eru magngreindar breytingar á tjáningu frumuyfirborðsmarkna sem tengjast ferlinu við virkjun einkjörnunga og angafruma (þ.e. CD86 og CD54) í frumulínu einkjörnungahvítblæðis úr mönnum, THP-1, eftir váhrif frá næmandi efnunum (1.–2. heimild). Mæld gildi tjáningar frumuyfirborðsmarkanna CD86 og CD54 eru síðan til stuðnings við að skilja á milli húðnæma og efna sem eru ekki næmandi.
2. Tilvísunarrannsóknarstofa Evrópusambandsins fyrir annars konar aðferðir en prófanir á dýrum (EURL ECVAM) lagði mat á h-CLAT-prófunina með samræmdri fullgildingarrannsókn og síðan fór fram óháð jafningjaryni af hálfu vísindalegrar ráðgjafarnefndar tilvísunarrannsóknarstofu Evrópusambandsins fyrir annars konar aðferðir en prófanir á dýrum (ESAC). Að teknu tilliti til allra fyrirliggjandi sannana og innleggs frá eftirlitsaðilum og hagsmunaaðilum mælti tilvísunarrannsóknarstofa Evrópusambandsins fyrir annars konar aðferðir en prófanir á dýrum (3. heimild) með því að h-CLAT-prófunin yrði notuð sem hluti af samþættri aðferð við prófun og mat til stuðnings við að skilja á milli næmandi efna og efna sem eru ekki næmandi til hætuflokkunar og merkinga. Dæmi um notkun á gögnum úr h-CLAT-prófun í samsetningu með öðrum upplýsingum eru tilgreind í heimildum (4.–11. heimild).
3. Í ljós kom að h-CLAT-prófunin reyndist yfirferanleg til rannsóknarstofa sem hafa reynslu af frumuræktunartækni og frumflæðissjargreiningum. Búast má við að samanburðarnákvæmni spáa sem fást með prófuninni sé við 80% markað innan og milli rannsóknarstofa (3. og 12. heimild). Niðurstöður sem urðu til í fullgildingarrannsókninni (13. heimild) og aðrar birtar rannsóknir (14. heimild) benda í heildina til þess að nákvæmni til að skilja á milli húðnæma (þ.e. 1. undirflokkur HSK-SP/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) og efna sem eru ekki næmandi sé 85% (N=142) með 93% næmi (94/101) og 66% sértæki (27/41) þegar hún er borin saman við niðurstöður úr eitlagreiningu (byggt á endurgreiningu tilvísunarrannsóknarstofu Evrópusambandsins fyrir annars konar aðferðir en prófanir á dýrum (EURL ECVAM) (12. heimild) að teknu tilliti til allra fyrirliggjandi gagna en ekki að teknu tilliti til neikvæðra niðurstaðna fyrir íðefni með Log  $K_{ow}$  sem er hærra en 3,5 eins og lýst er í 4. lið). Falsneikvæðar spár með h-CLAT-prófuninni eru líklegri til að varða íðefni sem sýna vægan húðnæmingarmátt eða húðnæmingarmátt í meðallagi (þ.e. undirundirflokkur 1B í HSK-SP/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) en íðefni sem sýna mikinn húðnæmingarmátt (þ.e. undirundirflokkur 1A í HSK-SP/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) (4., 13. og 15. heimild). Þegar þessar upplýsingar eru teknar saman benda þær til þess að aðferðin h-CLAT-prófun sé gagnleg til að stuðla að því að greina hættu á húðnæmingu. Þó eru gildin fyrir nákvæmni, sem hér eru gefin fyrir h-CLAT-prófunina sem sjálfstæða prófun, einungis leiðbeinandi þar eð líta skal á prófunina í samsetningu með öðrum upplýsingum með skírskotun til samþættra aðferða við prófun og mat og í samræmi við ákvæði 7. og 8. liðar í almenna innganginum. Þegar aðferðir, án tilrauna á dýrum, vegna húðnæmingar eru metnar ætti enn fremur að hafa í huga að eitlagreining, sem og aðrar prófanir á dýrum, endurspeglar e.t.v. ekki að fullu aðstæður hjá mönnum.
4. Á grundvelli gagna sem nú liggja fyrir reyndist aðferðin h-CLAT-prófun nothæf til að prófa íðefni sem búa yfir ýmsum lífrænum virkum hópum, hvarfgöngum, húðnæmingarmætti (sem hefur verið ákvarðaður með rannsóknunum í lífi) og eðlisefnafræðilegum eiginleikum (3. heimild og 14.–15. heimild). Aðferðin h-CLAT-prófun hentar fyrir prófunaríðefni sem eru leysanleg eða sem mynda stöðuga dreiflausn (þ.e. með svifögnum eða í sviflausn þar sem prófunaríðefnið sest ekki eða skilur sig frá leysinum/burðarefninu í mismunandi fasa) í viðeigandi leysi/burðarefni (sjá 14. lið). Prófunaríðefni með Log  $K_{ow}$  sem er hærra en 3,5 hafa tilhneigingu til að framkalla falsneikvæðar niðurstöður (14. heimild). Þess vegna skal ekki taka tillit til neikvæðra niðurstaðna fyrir prófunaríðefni með Log  $K_{ow}$  sem er hærra en 3,5. Þó er enn hægt að nota jákvæðar niðurstöður sem fást með prófunaríðefnum með Log  $K_{ow}$  sem er hærra en 3,5 til að styðja greiningu prófunaríðefnisins sem húðnæmis. Vegna takmarkaðrar efnaskiptagetu frumulínunnar sem er notuð (16. heimild) og vegna tilraunaskilyrðanna geta lífrænt umbreyttir meðvakar (þ.e. efni sem þurfa ensímvrirkjun, t.d. fyrir milligöngu P450-ensíma), og ólífrænt umbreyttir meðvakar (þ.e. efni sem virkjast með oxun), einkum með hægum oxunarhraða, enn fremur gefið neikvæðar niðurstöður í h-CLAT-prófun (15. heimild). Hægt er að meta flúrskinsprófunaríðefni með h-CLAT-prófuninni (17. heimild) en engu að síður munu sterk flúrskinsprófunaríðefni, sem senda út á sömu bylgjulengd og ísóþíósýanat í flúrskinslausn (FITC) eða própídíumjodíð, trufla frumflæðissjargreininguna og af þeim sökum er ekki hægt að meta það rétt með því að nota tilsvareandi mótefni ísóþíósýanats í flúrskinslausn eða própídíumjodíð. Í slíku tilviki er hægt að nota önnur flúrskinsmerkt mótefni eða aðra frumueiturhrifamarkna, eftir því sem við á, svo fremi að hægt sé að sýna fram á að þeir gefi svipaðar niðurstöður og FITC-merkt mótefni (sjá 24. lið) eða própídíumjodíð (sjá 18. lið) t.d. með því að prófa hæfnisefnin í 1.–2. viðbæti. Í ljósi framangreinds ætti að túlka neikvæðar niðurstöður með skírskotun til umræddra takmarkana og ásamt öðrum upplýsingaveitum innan ramma samþættrar aðferðar við prófun og mat. Í tilvikum þar sem um er að ræða sannanir sem sýna fram á að aðferðin h-CLAT-prófun sé ónothæf fyrir aðra tiltekna flokka prófunaríðefna skal ekki nota hana fyrir þessa tilteknu flokka.

5. Eins og lýst er hér að framan er aðferðin h-CLAT-prófun til stuðnings við að skilja á milli húðnæma og efna sem eru ekki næmandi. Þó getur hún einnig hugsanlega stuðlað að mati á næmingarmætti (4.–5. og 9. heimild) þegar hún er notuð í samþættum aðferðum, s.s. samþættri aðferð við prófun og mat. Samt sem áður er þörf á frekari vinnu, helst á grundvelli gagna um menn, til að ákvarða hvernig niðurstöður úr h-CLAT-prófun geta hugsanlega legið til grundvallar mati á mætti.
6. Skilgreiningar eru gefnar í viðbæti 1.1.

#### MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

7. Aðferðin h-CLAT-prófun er greining í glasi þar sem breytingar á tjáningu frumuyfirborðsmarkna (þ.e. CD86 og CD54) eru magngreindar í línu einkjörnungahvítblæðisfrumna úr mönnum, THP-1-frumum, eftir váhrif frá prófunaríðefninu í 24 klukkustundir. Þessar yfirborðssameindir eru dæmigerðir markar fyrir virkjun THP-1-einkjörnunga og geta líkt eftir virkjun angafruma sem gegnir mikilvægu hlutverki við að setja T-frumur af stað. Breytingar á tjáningu yfirborðsmarkna eru mældar með frumuflæðissjargreiningu eftir frumulitun með flúrskinsmerktum mótefnum. Mælingar á frumueiturhrifum eru einnig gerðar samhliða til að meta hvort stýrð fjölgun í tjáningu yfirborðsmarkna komi fram við styrk sem er undir frumueitrandi styrk. Hlutfallslegur flúrljómunarstyrkur yfirborðsmarkna, samanborið við samanburð með leysi/burðarefni, er reiknaður út og notaður í spálíkaninu (sjá 26. lið) til stuðnings við að skilja á milli næmandi efna og efna sem eru ekki næmandi.

#### SÝNT FRAM Á HÆFNI

8. Áður en prófunin, sem lýst er í þessum viðauka við prófunaraðferð B.71., er tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur staðfesta tæknilega hæfni sína með hæfnisefnunum 10 sem eru tilgreind í viðbæti 1.2. Enn fremur skulu notendur prófunarinnar viðhalda sögulegum gagnagrunni yfir gögn sem er aflað með athugunum á virkni (sjá 11. lið) og með jákvæðum samanburðum og samanburðum með leysi/burðarefni (sjá 20.–22. lið) og nota þessi gögn til að staðfesta að samanburðarnákvæmni prófunarinnar á rannsóknarstofu þeirra sé viðhaldið yfir lengri tíma.

#### VERKFERLI

9. Þessi prófun er byggð á gagnagrunnsþjónustu h-CLAT-prófunar varðandi annars konar aðferðir en dýratilraunir (DB-ALM), aðferðarlýsingu nr. 158 (18. heimild), sem er aðferðarlýsingin sem var notuð í samræmdri fullgildingarrannsókn tilvísunnarrannsóknarstofu Evrópusambandsins fyrir annars konar aðferðir en prófanir á dýrum (EURL ECVAM). Mælt er með því að þessi aðferðarlýsing sé notuð þegar aðferðin h-CLAT-prófun er innleidd og notuð á rannsóknarstofu. Hér á eftir er lýsing á helstu þáttum og tilhögun aðferðarinnar h-CLAT-prófun sem samanstendur af tveimur þrepum: *skammtaákvörðunarprófun og mæling á tjáningu CD86/CD54*.

#### Undirbúningur frumna

10. Nota skal frumulínu einkjörnungahvítblæðis úr mönnum, THP-1, til að framkvæma aðferðina h-CLAT-prófun. Mælt er með því að frumur (TIB-202™) séu fengnar frá viðurkenndu frumusafni, s.s. „American Type Culture Collection“.
11. THP-1-frumur eru ræktaðar í rakabættu andrúmslofti við 37 °C og 5% koltvísýring (CO<sub>2</sub>) og í RPMI-1640-æti með viðbættu 10% nautgripafósturssermi, 0,05 mM 2-merkaptóetanóli, 100 einingar/ml penisillíni og 100 µg/ml streptomýsini. Hægt er að komast hjá því að nota penisillín og streptomýsín í ræktunarætinu. Í slíku tilviki skulu notendur þó sannreyna að þótt sýkladrepandi efni sé ekki fyrir hendi í ræktunarætinu hafi það ekki áhrif á niðurstöður, t.d. með því að prófa hæfnisefnin sem eru tilgreind í viðbæti 1.2. Til þess að lágmarka áhættu á mengun skal þó í öllum tilvikum fylgja góðum starfsvenjum við frumurækt, óháð því hvort sýkladrepandi efni eru fyrir hendi í frumuræktunarætinu eða ekki. THP-1-frumum er sáð kerfisbundið á tveggja til þriggja daga fresti með þéttleikann 0,1 til 0,2 × 10<sup>6</sup> frumur/ml. Þeim skal viðhaldið við þéttleikann frá 0,1 til 1,0 × 10<sup>6</sup> frumur/ml. Áður en frumurnar eru notaðar til prófunar skal hæfi þeirra athugað með því að framkvæma athugun á virkni. Athugun á virkni frumnanna skal framkvæmd með því að nota jákvæðu samanburðina 2,4-dínítróklóróbensen (DNCB) (CAS-númer 97-00-7, ≥ 99% hreinleiki) og nikkelsúlfat (NiSO<sub>4</sub>) (CAS-númer 10101-97-0, ≥ 99% hreinleiki) og neikvæða samanburðinn mjólkursýru (LA) (CAS-númer 50-21-5, ≥ 85% hreinleiki) tveimur vikum eftir afþíðingu. Bæði 2,4-dínítróklóróbensen og nikkelsúlfat eiga að framkalla jákvæða svörun hjá báðum frumuyfirborðsmörkunum CD86 og CD54 og mjólkursýra á að framkalla neikvæða svörun hjá báðum frumuyfirborðsmörkunum CD86 og CD54. Einungis skal nota þær frumur í prófunina sem stóðust athugun á virkni. Hægt er að láta frumur fjölga sér í allt að tvo mánuði eftir afþíðingu. Umsáningartala skal ekki fara yfir 30. Athugun á virkni skal framkvæmd samkvæmt verklaginu sem lýst er í 20.–24. lið.

12. Fyrir prófun er THP-1-frumum sáð með þéttleika sem nemur annaðhvort  $0,1 \times 10^6$  frumum/ml eða  $0,2 \times 10^6$  frumum/ml og þær forræktaðar í ræktunarflöskum í 72 klst. eða í 48 klst., eftir því sem við á. Mikilvægt er að frumuþéttleiki í ræktunarflöskunni rétt eftir forræktunartímabilið sé eins samræmdur og unnt er í hverri tilraun (með því að nota önnur hvor skilyrðin við forræktunina sem lýst er hér að framan) vegna þess að frumuþéttleikinn í ræktunarflöskunni rétt eftir forræktunartímabilið getur haft áhrif á tjáningu CD86/CD54 sem ofnæmisvaldar kalla fram (19. heimild). Á prófunardaginn eru frumur, sem eru heimtar úr ræktunarflöskunni, enduruppleystar með nýju ræktunaræti með  $2 \times 10^6$  frumur/ml. Síðan er frumunum dreift í 24 holu bakka með flatrí botnplötu (500  $\mu$ l,  $1 \times 10^6$  frumur/holu) eða í 96 holu bakka með flatrí botnplötu (80  $\mu$ l,  $1,6 \times 10^5$  frumur/holu).

#### Skammtaákvörðunarprófun

13. Skammtaákvörðunarprófun er framkvæmd til að ákvarða CV75 sem er styrkur prófunaríðefnis sem leiðir til 75% lífvænleika frumna (CV) samanborið við samanburð með leysi/burðarefni. CV75-gildið er notað til að ákvarða styrk prófunaríðefna fyrir mælingu á tjáningu CD86/CD54 (sjá 20.-24. lið.).

#### Tilreiðsla prófunaríðefna og samanburðarefna

14. Prófunaríðefni og samanburðarefni eru tilreidd á prófunardegi. Að því er varðar aðferðina h-CLAT-prófun eru prófunaríðefnin leyst upp í eða stöðug dreifilausn í (sjá einnig 4. lið) saltlausn eða æti sem fyrsti leysis-/burðarefnisvalkostur, eða dímetýlsúlfoxíði (DMSO, 99% hreinleiki) sem annar leysis-/burðarefnisvalkostur ef prófunaríðefnið er ekki uppleysanlegt eða myndar ekki stöðuga dreifilausn í fyrrnefndum tveimur leysum/burðarefnum, í lokastyrk sem nemur 100 mg/ml (í saltlausn eða æti) eða 500 mg/ml (í dímetýlsúlfoxíði). Nota má aðra leysa/önnur burðarefni en þau sem lýst er að framan ef færð eru fullnægjandi vísindaleg rök fyrir því. Taka skal tillit til stöðugleika prófunaríðefnisins í endanlegu(m) leysi/burðarefni.
15. Byrjað er á 100 mg/ml (í saltlausn eða æti) eða 500 mg/ml (í dímetýlsúlfoxíði) af stofnlausn prófunaríðefnisins og gera skal eftirfarandi þynningu í þrepum:

- Með saltlausn eða æti sem leysi/burðarefni: Átta stofnlausnir (8 styrkleikar) eru tilreiddar með tvöfaldri raðþynningu með því að nota samsvarandi leysi/burðarefni. Þessar stofnlausnir eru þynntar enn frekar 50-falt í ræktunaræti (vinnulausnir). Ef hæsti lokastyrkur í bakkanum með 1 000  $\mu$ g/ml er ekki eitruður skal endurákvæða hámarksstyrkinn með því að framkvæma nýtt frumueiturhrifapróf. Lokastyrkurinn í bakkanum skal ekki fara yfir 5 000  $\mu$ g/ml fyrir prófunaríðefni sem eru uppleyst í eða stöðug dreifilausn í saltlausn eða æti.
- Með dímetýlsúlfoxíði sem leysi/burðarefni: Átta stofnlausnir (8 styrkleikar) eru tilreiddar með tvöfaldri raðþynningu með því að nota samsvarandi leysi/burðarefni. Þessar stofnlausnir eru þynntar enn frekar 250-falt í ræktunaræti (vinnulausnir). Lokastyrkurinn í bakkanum skal ekki fara yfir 1 000  $\mu$ g/ml jafnvel þótt þessi styrkleiki sé ekki eitruður.

Að lokum eru vinnulausnirnar notaðar til vóðrifa með því að bæta sama rúmmáli af vinnulausn við rúmmál THP-1-frumusviflausnarrinnar í bakkanum (sjá einnig 17. lið) til að ná fram tvöfaldri þynningu í viðbót (yfirleitt er endanleg röð styrkleika á bakkanum 7,81–1 000  $\mu$ g/ml).

16. Samanburðurinn með leysi/burðarefni, sem er notaður í aðferðinni h-CLAT-prófun, er ræktunaræti (fyrir prófunaríðefni sem eru uppleyst eða stöðug dreifilausn (sjá 4. lið) annaðhvort með saltlausn eða æti) eða dímetýlsúlfoxíði (fyrir prófunaríðefni sem eru uppleyst í eða stöðug dreifilausn í dímetýlsúlfoxíði) sem er prófað í einum lokastyrk í bakkanum við 0,2%. Hann er þynntur á sama hátt og lýst er fyrir vinnulausnirnar í 15. lið.

#### Notkun prófunaríðefna og samanburðarefna

17. Ræktunarætið eða vinnulausnirnar, sem lýst er í 15. og 16. lið, eru blandaðar í hlutfallinu 1:1 (rúmmálshlutfall) með frumusviflausnum sem eru tilreiddar í 24 holu eða 96 holu bakka með flatrí botnplötu (sjá 12. lið). Meðhöndluðu bakkarnir eru síðan settir í ræktun í  $24 \pm 0,5$  klst. við 37 °C og 5% koltvísýring (CO<sub>2</sub>). Þess skal gætt að forðast uppgufun rokkgjarnra prófunaríðefna og víxlmengun prófunaríðefna milli hola, t.d. með því að hylja bakkann fyrir ræktunina með prófunaríðefnunum (20. heimild).

*Própidíumjodíðlitun*

18. Eftir váhrif í  $24 \pm 0,5$  klst. eru frumurnar færðar yfir í sýnaglös og safnað með skiljun. Flotinu er fleygt og frumurnar sem eftir eru enduruppleystar með 200  $\mu\text{l}$  (ef um er að ræða 96 holu bakka) eða 600  $\mu\text{l}$  (ef um er að ræða 24 holu bakka) af fosfatstilltri saltlausn sem inniheldur 0,1% af nautgripasermisalbúmíni (litunarjafnalausn). Tvö hundruð  $\mu\text{l}$  af frumusviflausn eru færðir yfir í 96 holu bakka með kúptri botnplötu (ef um er að ræða 96 holu bakka) eða örtíraunaglas (ef um er að ræða 24 holu bakka) og þvegnir tvisvar með 200  $\mu\text{l}$  (ef um er að ræða 96 holu bakka) eða 600  $\mu\text{l}$  (ef um er að ræða 24 holu bakka) af litunarjafnalausn. Að lokum eru frumurnar enduruppleystar í litunarjafnalausn (t.d. 400  $\mu\text{l}$ ) og própidíumjodíðlausn (t.d. 20  $\mu\text{l}$ ) er bætt við (lokastyrkur própidíumjodíðlausnarinnar er t.d. 0,625  $\mu\text{g/ml}$ ). Nota má aðra frumueiturhrifamarka, s.s. 7-amínóaktínómýsín-D (7-AAD), trypan-bláan (e. *Trypan blue*) eða annað ef hægt er að sýna fram á að staðgöngulitir gefi svipaðar niðurstöður og própidíumjodíð, t.d. með því að prófa hæfnisefnin í viðbæti 1.2.

*Mælingar á frumueiturhrifum með frumuflæðissjárgreiningu og mati á CV75-gildi*

19. Uptaka própidíumjodíðs er greind með því að nota frumuflæðissjárgreiningu með aðfangarásina FL-3. Samtals 10 000 lifandi frumna (própidíumjodíðneikvæðum) er aflað. Hægt er að reikna lífvænleika frumna út með eftirfarandi jöfnu í greiningarforriti frumumælisins. Ef lífvænleiki frumna er lítill skal afla allt að 30 000 frumna, þ.m.t. dauðar frumur. Að öðrum kosti er hægt að afla gagna í eina mínútu eftir að greiningin hefst.

$$\text{Lífvænleiki frumna} = \frac{\text{Fjöldi lifandi frumna}}{\text{Heildarfjöldi frumna sem er aflað}} \times 100$$

CV75-gildið (sjá 13. lið), þ.e. styrkur sem sýnir 75% af lifun THP-1-frumna (25% frumueiturhrif), er reiknað út með logalínulegum innreikningi með eftirfarandi jöfnu:

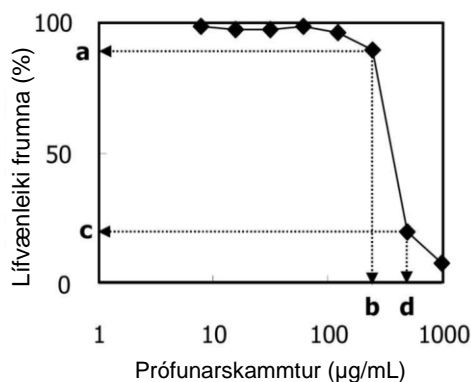
$$\text{Log CV75} = \frac{(75 - c) \times \text{Log}(b) - (75 - a) \times \text{Log}(d)}{a - c}$$

Þar sem:

a er lágmarksgildi lífvænleika frumna yfir 75%

c er hámarksgildi lífvænleika frumna undir 75%

b og d eru styrkleikar sem sýna gildi lífvænleika frumna a og c, eftir því sem við á



Hægt er að nota aðrar aðferðir til að fá fram CV75 svo fremi að sýnt sé fram á að það hafi engin áhrif á niðurstöðurnar (t.d. með því að prófa hæfnisefnin).

## Mæling á tjáningu CD86/CD54

### Tilreiðsla prófunaríðefna og samanburðarefna

20. Viðeigandi leysir/burðarefni (saltlausn, æti eða dímetýlsúlfoxíð; sjá 14. lið.) er notað til að leysa prófunaríðefnin upp eða mynda stöðuga dreifilausn. Fyrst eru prófunaríðefnin þynnt í styrk sem samsvarar 100-faldri þynningu (saltlausn eða æti) eða 500-faldri þynningu (dímetýlsúlfoxíð) á  $1,2 \times CV75$  sem er ákvarðað í skammtaákvörðunargreiningunni (sjá 19. lið). Ef ekki er hægt að ákvarða CV75 (þ.e. ef fullnægjandi frumueiturhrif koma ekki fram í skammtaákvörðunargreiningunni) skal nota hæsta styrk prófunaríðefnis sem er uppleyst eða myndar stöðuga dreifilausn, sem er tilreitt með hverjum leysi/hverju burðarefni, sem upphafsstyrk. Vakin er athygli á að lokastyrkurinn í bakkanum skal ekki fara yfir 5 000  $\mu\text{g/ml}$  (ef um er að ræða saltlausn eða æti) eða 1 000  $\mu\text{g/ml}$  (ef um er að ræða dímetýlsúlfoxíð). Þá eru útbúnar 1,2-faldar raðþynningar með því að nota samsvarandi leysi/burðarefni til að fá stofnlausnirnar (átta styrkleikar á bilinu frá  $100 \times 1,2 \times CV75$  til  $100 \times 0,335 \times CV75$  (saltlausn eða æti) eða frá  $500 \times 1,2 \times CV75$  til  $500 \times 0,335 \times CV75$  (dímetýlsúlfoxíð)) sem á að prófa með aðferðinni h-CLAT-prófun (sjá dæmi um skammtaáætlun í aðferðarlýsingu DB-ALM nr. 158). Stofnlausnirnar eru þynntar enn frekar 50-falt (saltlausn eða æti) eða 250-falt (dímetýlsúlfoxíð) í ræktunaræti (vinnulausnir). Þessar vinnulausnir eru að lokum notaðar til váhrifa með endanlegum tvöföldum þynningarstuðli í viðbót í bakkanum. Ef niðurstöðurnar uppfylla ekki samþykktarviðmiðanirnar, sem lýst er í 29. og 30. lið varðandi lífvænleika frumna, má endurtaka skammtaákvörðunarprófunina til að ákvarða nákvæmara CV75. Takið eftir að einungis er hægt að nota 24 holu bakka til að mæla tjáningu CD86/CD54.
21. Samanburður með leysi/burðarefni er tilreiddur eins og lýst er í 16. lið. Jákvæði samanburðurinn, sem er notaður í aðferðinni h-CLAT-prófun, er 2,4-dínítróklóróbensen (sjá 11. lið) og stofnlausnir fyrir hann eru tilreiddar í dímetýlsúlfoxíði og þynntar eins og lýst er fyrir stofnlausnirnar í 20. lið. Nota skal 2,4-dínítróklóróbensen sem jákvæðan samanburð fyrir mælingu á tjáningu CD86/CD54 í einum lokastyrkleika í bakkanum (yfirleitt 4,0  $\mu\text{g/ml}$ ). Til að fá styrkleikann 4,0  $\mu\text{g/ml}$  af 2,4-dínítróklóróbenseni í bakka er tilreidd 2 mg/ml stofnlausn af 2,4-dínítróklóróbenseni í dímetýlsúlfoxíði og þynnt enn frekar, 250-falt með ræktunaræti, í vinnulausn sem nemur 8  $\mu\text{g/ml}$ . Að öðrum kosti er einnig hægt að nota CV75-gildi 2,4-dínítróklóróbensens, sem er ákvarðað hjá hverri prófunarstöð fyrir sig, sem jákvæðan samanburðarstyrk. Nota má aðra heppilega jákvæða samanburði ef rannsóknarsöguleg gögn eru tiltæk til að leiða út samanburðarhæfar viðmiðanir fyrir ásætlanlegar keyrslur. Að því er varðar jákvæða samanburði skal eini lokastyrkleikinn í bakkanum ekki fara yfir 5 000  $\mu\text{g/ml}$  (ef um er að ræða saltlausn eða æti) eða 1 000  $\mu\text{g/ml}$  (ef um er að ræða dímetýlsúlfoxíð). Viðmiðanir fyrir ásætlanlegar keyrslur eru þær sömu og lýst er fyrir prófunaríðefnið (sjá 29. lið) nema að því er varðar síðustu samþykktarviðmiðunina þar sem jákvæði samanburðurinn er prófaður við einn styrkleika.

### Notkun prófunaríðefna og samanburðarefna

22. Að því er varðar hvert prófunaríðefni og samanburðarefni þarf eina tilraun til að fá fram spá. Hver tilraun samanstendur af a.m.k. tveimur sjálfstæðum keyrslum fyrir mælingu á tjáningu CD86/CD54 (sjá 26.–28. lið). Hver sjálfstæð keyrsla er gerð á mismunandi degi eða sama dag að því tilskildu að fyrir hverja keyrslu sé(u): a) sjálfstæð ný stofnlausn og vinnulausnir prófunaríðefnisins og mótefnalausnanna tilreiddar og b) notaðar frumur sem eru heimtar ósamfellt (þ.e. frumurnar eru heimtar úr mismunandi ræktunarflöskum); þó mega frumurnar koma úr sömu umsáningu. Prófunaríðefni og samanburðarefni, tilreidd sem vinnulausnir (500  $\mu\text{l}$ ), eru blönduð með 500  $\mu\text{l}$  af enduruppleystum frumum ( $1 \times 10^6$  frumur) í hlutfallinu 1:1 og frumurnar eru settar í ræktun í  $24 \pm 0,5$  klst eins og lýst er í 20. og 21. lið. Í hverri keyrslu er nóg að vera með eina samhliða prófun fyrir hvern styrkleika prófunaríðefnisins og samanburðarefnisins þar sem spá er fengin úr a.m.k. tveimur sjálfstæðum keyrslum.

### Frumulitun og greining

23. Eftir váhrif í  $24 \pm 0,5$  klst. eru frumurnar færðar úr 24 holu bakka yfir í sýnaglös, safnað með skiljun og síðan þvegnar tvisvar með 1 ml af litunarjafnalausn (ef nauðsyn krefur má bæta við þvottaþrepum). Eftir þvott eru frumurnar blokkadaðar með blokklausn (litunarjafnalausn sem inniheldur 0,01% (massi miðað við rúmmál) af glóbúlíni (Cohn-þáttur II, III, úr mönnum; SIGMA, #G2388-10G eða jafngildi)) og settar í ræktun við 4 °C í 15 mínútur. Eftir blokkun er frumunum skipt niður í þrjá 180  $\mu\text{l}$  deiliskammta í 96 holu bakka með kúptri botnplötu eða örtilraunaglas.
24. Eftir skiljun eru frumurnar litaðar með 50  $\mu\text{l}$  af FITC-merktum mótefnum af tegundinni and-CD86-, and-CD54- eða IgG1 (flokkur) úr músum við 4 °C í 30 mínútur. Mótefnin, sem lýst er í h-CLAT aðferðarlýsingu DB-ALM nr. 158 (18. heimild), skulu notuð með því að þynna 3:25 rúmmálshlutfall (fyrir CD86: (BD-PharMingen, #555657; klón: Fun-1)) eða 3:50 rúmmálshlutfall (fyrir CD54: (DAKO, #F7143; klón: 6.5B5) og IgG1 (DAKO, #X0927)) með litunarjafnalausn. Hönnuðir prófunarinnar skilgreindu þessa mótefnaþynningarstuðla sem þá sem gáfu besta suðhlutfallið. Á grundvelli



reynslu hönnuða prófunarinnar er flúrljómunarstyrkur mótiefnanna yfirleitt svipaður milli mismunandi lota. Þó geta notendur íhugað að títra mótiefnin við eigin rannsóknarstofuskilyrði til að skilgreina bestu styrkleikana til að nota. Nota má önnur flúrskinsmerkt and-CD86- og/eða and-CD54-mótiefni ef hægt er að sýna fram á að þau gefi svipaðar niðurstöður og tilsvareandi mótiefni ísóþíósýanats í flúrskinslausn, t.d. með því að prófa hæfnisefnin í viðbæti 1.2. Það skal tekið fram að breyting á klóni eða birgi mótiefnanna, eins og lýst er í h-CLAT aðferðarlýsingu DB-ALM nr. 158 (18. heimild), getur haft áhrif á niðurstöðurnar. Eflir því, tvisvar sinnum eða oftar, með 150 µl af litunarjafnalausn eru frumurnar enduruppleystar í litunarjafnalausn (t.d. 400 µl) og própídíumjoðiðlausn (t.d. 20 µl til að fá lokastyrk sem nemur 0,625 µg/ml) eða annarri frumueiturhrifamarkalausn (sjá 18. lið) er bætt við. Gildi tjáningar CD86 og CD54 og lífvænleiki frumna eru greind með frumuflæðissjargreiningu.

## GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

### Mat á gögnum

25. Tjáning CD86 og CD54 er greind með frumuflæðissjargreiningu með aðfangarásina FL-1. Hlutfallslegur flúrljómunarstyrkur (RFI) CD86 og CD54 fyrir jákvæðar samanburðarfrumur og íðefnameðhöndlaðar frumur er reiknaður út, byggt á faldmeðaltali flúrljómunarstyrks (MFI), samkvæmt eftirfarandi jöfnu:

$$RFI = \frac{MFI \text{ fyrir íðefnameðhöndlaðar frumur} - MFI \text{ fyrir íðefnameðhöndlaðan flokk samanburðarfrumna}}{MFI \text{ fyrir leysi/burðarefnismeðhöndlaðar samanburðarfrumur} - MFI \text{ fyrir leysi/burðarefnismeðhöndlaður flokkur samanburðarfrumna}} \times 100$$

Lífvænleiki frumna úr flokki samanburðarfrumna (sem eru litaðar með IgG1- (flokkur) mótiefnum úr músum) er einnig reiknaður út samkvæmt jöfnunni sem lýst er í 19. lið.

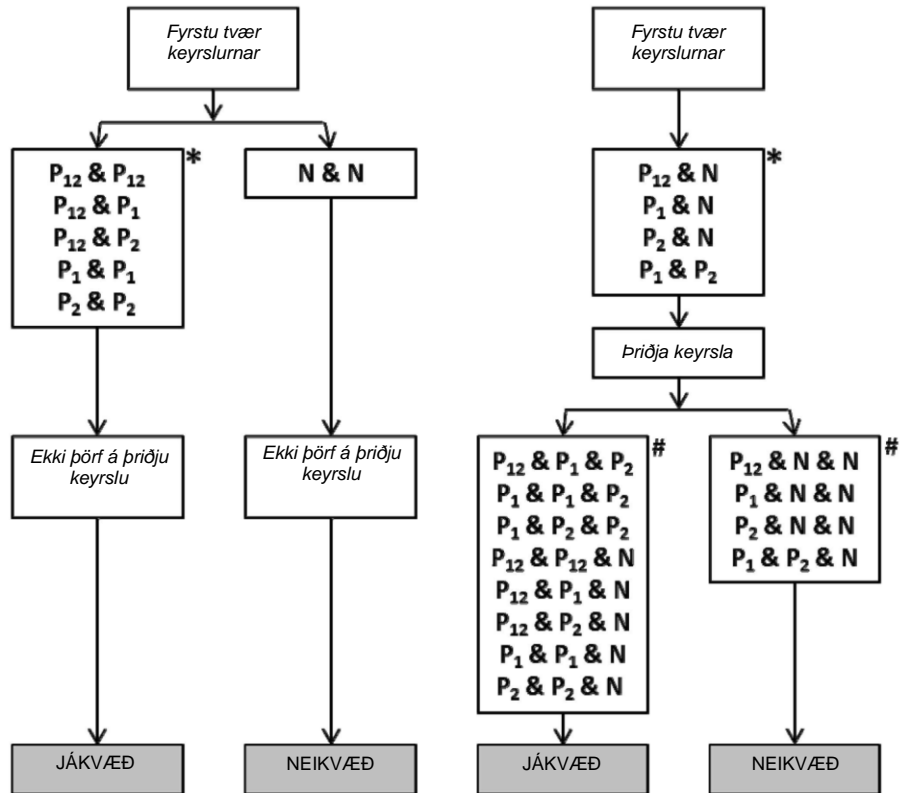
### Spálíkan

26. Að því er varðar mælingu á tjáningu CD86/CD54 er hvert prófunaríðefni prófað í a.m.k. tveimur sjálfstæðum keyrslum til að leiða út eina spá (JÁKVÆÐA eða NEIKVÆÐA). Spá með h-CLAT-prófun er talin JÁKVÆÐ ef a.m.k. eitt af eftirfarandi skilyrðum er uppfyllt í 2 af 2 eða í a.m.k. 2 af 3 sjálfstæðum keyrslum, að öðrum kosti telst spá með h-CLAT-prófun vera NEIKVÆÐ (mynd 1):

— Hlutfallslegur flúrljómunarstyrkur (RFI) CD86 er jafn eða meiri en 150% í öllum prófuðum styrkleikum (með lífvænleika frumna  $\geq 50\%$ ).

— Hlutfallslegur flúrljómunarstyrkur (RFI) CD54 er jafn eða meiri en 200% í öllum prófuðum styrkleikum (með lífvænleika frumna  $\geq 50\%$ ).

27. Ef fyrstu tvær keyrslurnar eru báðar jákvæðar fyrir CD54 er spá með h-CLAT-prófun talin JÁKVÆÐ á grundvelli framangreinds og ekki er þörf á að framkvæma þriðju keyrsluna. Á sama hátt, ef fyrstu tvær keyrslurnar eru neikvæðar fyrir báðum mörkunum, telst spá með h-CLAT-prófuninni NEIKVÆÐ (að teknu tilhlýðilegu tilliti til ákvæðanna í 30. lið) án þess að það þurfi að keyra þriðju keyrsluna. Ef fyrstu tvær keyrslurnar eru ekki samsvarandi fyrir a.m.k. annan markann (CD54 eða CD86) er þó þörf á þriðju keyrslunni og endanleg spá verður byggð á niðurstöðu úr meirihluta keyrslunnanna þriggja, hverri um sig, (þ.e. 2 af 3). Að því er þetta varðar skal bent á að ef tvær sjálfstæðar keyrslur eru framkvæmdar og önnur er einungis jákvæð fyrir CD86 (hér á eftir nefnd P<sub>1</sub>) og hin er einungis jákvæð fyrir CD54 (hér á eftir nefnd P<sub>2</sub>) þarf að keyra þriðju keyrsluna. Ef þriðja keyrslan er neikvæð fyrir báðum mörkunum (hér á eftir nefnt N) telst spá með h-CLAT-prófuninni NEIKVÆÐ. Ef þriðja keyrslan er jákvæð fyrir öðrum hvorum markanum (P<sub>1</sub> eða P<sub>2</sub>) eða fyrir báðum mörkunum (hér á eftir nefnt P<sub>12</sub>) er spáin með h-CLAT-prófuninni talin JÁKVÆÐ.



**Mynd 1** Spálíkan sem er notað í aðferðinni h-CLAT-prófun. Spá með h-CLAT-prófun skal skoðuð innan ramma samþættrar aðferðar við prófun og mat og í samræmi við ákvæði 7. og 8. liðar í almenna innganginum.

P<sub>1</sub>: keyrsla þar sem einungis CD86 er jákvæður; P<sub>2</sub>: keyrsla þar sem einungis CD54 er jákvæður; P<sub>12</sub>: keyrsla þar sem bæði CD86 og CD54 eru jákvæðir; N: keyrsla þar sem hvorki CD86 né CD54 eru jákvæðir.

\* Reitirnir sýna viðeigandi samsetningu niðurstaðna úr tveimur fyrstu keyrslunum, óháð því í hvaða röð þær kunna að hafa fengist.

# Reitirnir sýna viðeigandi samsetningu niðurstaðna úr þremur keyrslum á grundvelli niðurstaðna sem fengust úr tveimur fyrstu keyrslunum, sem eru sýndar í reitnum hér að framan, en endurspeгла ekki í hvaða röð þær kunna að hafa fengist.

- Að því er varðar prófunaríðefni, sem spáð er fyrir um að séu jákvæð með h-CLAT-prófun, er hægt að ákveða tvö hrifstyrksgildi (EC-gildi), EC150 fyrir CD86 og EC200 fyrir CD54, þ.e. við hvaða styrk prófunaríðefnin kölluðu fram hlutfallslegan flúrljómunarstyrk (RFI) sem nemur 150 eða 200. Þessi EC-gildi geta hugsanlega stuðlað að mati á næmingarmætti (9. heimild) þegar þau eru notuð í samþættum aðferðum, s.s. samþættri aðferð við prófun og mat (4.–8. heimild). Þau er hægt að reikna út með eftirfarandi jöfnum:

$$EC\ 150\ (fyrir\ CD86) = B_{styrkur} + [(150 - B_{RFI}) / (ARFI - B_{RFI}) \times (A_{styrkur} - B_{styrkur})]$$

$$EC\ 200\ (fyrir\ CD86) = B_{styrkur} + [(200 - B_{RFI}) / (ARFI - B_{RFI}) \times (A_{styrkur} - B_{styrkur})]$$

þar sem

A<sub>styrkur</sub> er lægsti styrkur í µg/ml með hlutfallslegan flúrljómunarstyrk (RFI) > 150 (CD86) eða 200 (CD54)

B<sub>styrkur</sub> er hæsti styrkur í µg/ml með hlutfallslegan flúrljómunarstyrk (RFI) < 150 (CD86) eða 200 (CD54)

ARFI er hlutfallslegur flúrljómunarstyrkur (RFI) við lægsta styrk með hlutfallslegan flúrljómunarstyrk (RFI) > 150 (CD86) eða 200 (CD54)

BRFI er hlutfallslegur flúrljómunarstyrkur (RFI) við hæsta styrk með hlutfallslegan flúrljómunarstyrk (RFI) < 150 (CD86) eða 200 (CD54)

Í þeim tilgangi að leiða gildi EC150 og EC200 út af meiri nákvæmni getur verið þörf á þremur sjálfstæðum keyrslum til að *mæla tjáningu* CD86/CD54. Endanleg gildi EC150 og EC200 eru síðan ákvörðuð sem miðgildi EC-gilda sem eru reiknuð út frá sjálfstæðu keyrslunum þremur. Ef einungis tvær af þremur sjálfstæðum keyrslum uppfylla viðmiðanir um jákvæðni (sjá 26.–27. lið) er hærra útreiknaða gildið af þessum tveimur útreiknuðu gildum, EC150 eða EC200, notað.

### Samþykktarviðmiðanir

29. Eftirfarandi samþykktarviðmiðanir skulu uppfylltar þegar aðferðin h-CLAT-prófun er notuð (22. og 27. heimild).

- Lífvænleiki frumna í samanburði með æti og samanburði með leysi/burðarefni skal vera yfir 90%.
- Í samanburði með leysi/burðarefni skulu gildi hlutfallslegs flúrljómunarstyrks (RFI) bæði CD86 og CD54 ekki fara yfir jákvæðu viðmiðanirnar (CD86 RFI 150% og CD54 RFI 200%). Gildi hlutfallslegs flúrljómunarstyrks (RFI) í samanburði með leysi/burðarefni eru reiknuð út með jöfnunni sem lýst er í 25. lið (í staðinn fyrir „faldmeðaltal flúrljómunarstyrks (MFI) fyrir íðefni“ kemur „faldmeðaltal flúrljómunarstyrks (MFI) fyrir samanburð með leysi/burðarefni“ og í staðinn fyrir „faldmeðaltal flúrljómunarstyrks (MFI) fyrir samanburð með leysi/burðarefni“ kemur „faldmeðaltal flúrljómunarstyrks (MFI) fyrir samanburð með æti“).
- Að því er varðar bæði samanburð með æti og samanburð með leysi/burðarefni skal hlutfallið milli faldmeðaltals flúrljómunarstyrks (MFI) fyrir bæði CD86 og CD54 og flokkssamanburðarins vera > 105%.
- Í jákvæða samanburðinum (2,4-dínítróklóróbensen) skulu gildi hlutfallslegs flúrljómunarstyrks (RFI) fyrir bæði CD86 og CD54 uppfylla jákvæðu viðmiðanirnar (CD86 RFI 150 og CD54 RFI 200) og lífvænleiki frumna skal vera yfir 50%.
- Að því er varðar prófunaríðefni skal lífvænleiki frumna vera yfir 50% í a.m.k. fjórum prófuðum styrkleikum í hverri keyrslu.

30. Aðeins er hægt að viðurkenna neikvæðar niðurstöður fyrir prófunaríðefni sem sýna minni lífvænleika frumna en 90% við hæsta styrk sem er prófaður (þ.e.  $1,2 \times CV75$  samkvæmt raðþynningaráætluninni sem er lýst í 20. lið). Ef lífvænleiki frumna við  $1,2 \times CV75$  er jafn eða hærri en 90% skal ekki nota neikvæðu niðurstöðurnar. Í slíku tilviki er mælt með því að reyna að betrubæta val á skömmtum með því að endurtaka ákvörðunina á CV75. Það skal bent á að þegar 5 000 µg/ml í saltlausn (eða æti eða öðrum leysum/burðarefnum), 1 000 µg/ml í dímetýlsúlfoxíði eða hæsti leysanlegi styrkur er notaður sem hámarksprófunarstyrkur prófunaríðefnis er hægt að viðurkenna neikvæðar niðurstöður jafnvel þótt lífvænleiki frumna sé yfir 90%.

### Prófunarskýrsla

31. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

#### Prófunaríðefni

Efni með einum efnisþætti

- Efnafræðileg sanngreining s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-númer, SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla og/eða aðrar auðkenningar.
- Útlit, Log  $K_{ow}$ , vatnsleysni, leysni í dímetýlsúlfoxíði, sameindþyngd og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli, að því marki sem unnt er.
- Hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.
- Meðhöndlun fyrir prófun, ef við á (t.d. hitun, mölun).
- Styrkur eða styrkleikar sem eru prófaðir.
- Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.
- Rökstuðningur fyrir vali á leysi/burðarefni fyrir hvert prófunaríðefni.

#### Fjölpáttaefni, UVCB-efni og blanda

- Lýsing á eiginleikum eins og kostur er, t.d. með efnakenni (sjá hér að framan), hreinleika, magnbundu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli (sjá hér að framan), að því marki sem unnt er.
- Útlit, vatnsleysni, leysni í dímetýlsúlfoxíði og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli, að því marki sem unnt er.
- Sameindaþyngd eða sýndarsameindarþyngd ef um er að ræða blöndur/fjölliður af þekktri samsetningu eða aðrar upplýsingar sem skipta máli fyrir framkvæmd rannsóknarinnar.
- Meðhöndlun fyrir prófun, ef við á (t.d. hitun, mölun).
- Styrkur eða styrkleikar sem eru prófaðir.
- Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.
- Rökstuðningur fyrir vali á leysi/burðarefni fyrir hvert prófunaríðefni.

#### Samanburður

##### Jákvæður samanburður

- Efnafræðileg sanngreining s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-númer, SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla og/eða aðrar auðkenningar.
- Útlit,  $\log K_{ow}$ , vatnsleysni, leysni í dímetýlsúlfoxíði, sameindaþyngd og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli, að því marki sem unnt er.
- Hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.
- Meðhöndlun fyrir prófun, ef við á (t.d. hitun, mölun).
- Styrkur eða styrkleikar sem eru prófaðir.
- Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.
- Tilvísanir í rannsóknarsögulegar niðurstöður fyrir jákvæðan samanburð sem sýna viðeigandi viðmiðanir fyrir ásættanlegar keyrslur, ef við á.

##### Neikvæður samanburður og samanburður með leysi/burðarefni

- Efnafræðileg sanngreining s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-númer, SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla og/eða aðrar auðkenningar.
- Hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.
- Útlit, sameindaþyngd og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli, ef aðrir samanburðir með leysi/öðrum burðarefnum eru notuð en þau sem getið er um í viðmiðunarreglum um prófanir og að því marki sem unnt er.
- Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.
- Rökstuðningur fyrir vali á leysi/burðarefni fyrir hvert prófunaríðefni.

*Prófunarskilyrði*

- Heiti og heimilisfang bakhjarls, prófunarstöðvar og rannsóknarstjóra.
- Lýsing á prófun sem er notuð.
- Frumulína sem er notuð, skilyrði við geymslu hennar og uppruni (t.d. frá hvaða starfsstöð hún var fengin).
- Frumflæðissjargreining sem er notuð (t.d. líkan), þ.m.t. stillingar á tæki, glóbúlín, mótefni og frumueiturhrifamarkar sem eru notaðir.
- Verklag sem er notað til að sýna fram á hæfni rannsóknarstofunnar til að framkvæma prófunina með því að prófa hæfnisefnin og verklag sem er notað til að sýna fram á að samanburðarnákvæmni prófunarinnar sé viðhaldið yfir lengri tíma, t.d. rannsóknarsöguleg samanburðargögn og/eða söguleg gögn um athuganir á virkni.

*Viðmiðanir fyrir samþykkt prófunar*

- Lífvænleiki frumna, gildi faldmeðaltals flúrljómunarstyrks (MFI) og hlutfallslegs flúrljómunarstyrks (RFI), sem fást með samanburði með leysi/burðarefni, í samanburði við ásættanleikasviðin.
- Lífvænleiki frumna og gildi hlutfallslegs flúrljómunarstyrks (RFI), sem fást með jákvæðum samanburði, í samanburði við ásættanleikasviðin.
- Lífvænleiki frumna í öllum prófuðum styrkleikum prófaða íðefnisins.

*Prófunaraðferð*

- Fjöldi keyrslna sem er notaður.
- Styrkur prófunaríðefna, íbæting og váhrifatími sem eru notuð (ef frábrugðið því sem mælt er með).
- Lýsing á þeim matsviðmiðunum og viðmiðunum fyrir ákvarðanir sem eru notaðar.
- Lýsing á öllum breytingum á prófunaraðferðinni.

*Niðurstöður*

- Töflusetning gagnanna, þ.m.t. CV75 (ef við á), einstök rúmfræðileg gildi fyrir faldmeðaltal flúrljómunarstyrks (MFI) og hlutfallslegan flúrljómunarstyrk (RFI), gildi fyrir lífvænleika frumna, gildi fyrir EC150/EC200 (ef við á), sem fást fyrir prófunaríðefnið og fyrir jákvæða samanburðinn í hverri keyrslu, og upplýsingar um flokkun prófunaríðefnis samkvæmt spálíkaninu.
- Lýsing á öðrum athugunum sem skipta máli, ef við á.

*Umfjöllun um niðurstöðurnar*

- Umfjöllun um niðurstöðurnar sem fást með aðferðinni h-CLAT-prófun.
- Athugun á niðurstöðum prófunarinnar með skírskotun til samþættrar aðferðar við prófun og mat ef aðrar upplýsingar sem skipta máli eru tiltækar.

*Ályktanir*

## HEIMILDIR

- 1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, 767–773.
- 2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro* 21, 428-437.
- 3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Aðgengilegt á: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- 4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, 1318-1332.
- 5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol.* 35, 1333-1347.
- 6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol.* 63, 489-504.
- 7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69, 371-379.
- 8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71, 337-351.
- 9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol.* 89, 2355-2383.

- 10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol*. DOI 10.1002/jat.3281.
- 11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150-60.
- 12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Aðgengilegt á: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>
- 13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Accessible at: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- 14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38, 599-609.
- 15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- 16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch Toxicol* 87, 1683-1969.
- 17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6<sup>th</sup> report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. *AATEX* 15, 81-88.
- 18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Aðgengilegt á: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- 19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamoto K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. *AATEX* 13, 70-82.

- 20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H., Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7<sup>th</sup> report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.
- 21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2005, 96 bls.
- 22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Aðgengilegt á: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- 23) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Aðgengilegt á: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev05/05files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html)
- 24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).
- 25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.



## Viðbætur 1.1

## SKILGREININGAR

**Nákvæmni:** Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktu viðmiðunargildi niðurstaða úr prófun er. Þetta er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferða og einn þáttur gildis. Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli rétttra niðurstaðna úr prófun (21. heimild).

**Ferli neikvæðra afleiðinga (AOP):** Röð atburða, frá efnafræðilegri byggingu markíðefnis, eða hóps svipaðra íðefna, um sameindaræsingu að niðurstöðu, sem miðað er við, í lífi (22. heimild).

**Íðefni:** Efni eða blanda.

**CV75:** Áætlaður styrkur sem sýnir 75% lífvænleika frumna.

**EC150:** styrkur sem sýnir gildi hlutfallslegs flúrljómunarstyrks (RFI) sem nemur 150 í tjáningu CD86.

**EC200:** styrkur sem sýnir gildi hlutfallslegs flúrljómunarstyrks (RFI) sem nemur 200 í tjáningu CD54.

**Frumuflæðissjárgreining:** frumumælingartækni þar sem frumur, sem eru leystar upp í vökva, flæða ein í einu gegnum brennipunkt segulmögnunarljósgeisla (e. *focus of exciting light*) sem dreifist í mynstri sem er einkennandi fyrir frumurnar og hluta þeirra; frumurnar eru oft merktar með flúrmerkiefnum þannig að fyrst er ljósið ísogað en síðan sent út á annarri tíðni.

**Hætta:** Sá eðlislægi eiginleiki efnis eða aðstæðna að geta valdið skaðlegum áhrifum þegar lífvera, kerfi eða (undir)hópur kemst í snertingu við það efni.

**Samþætt aðferð við prófun og mat (IATA):** Skipulögð aðferð sem er notuð til hættugreiningar (hugsanlegrar), hættulýsingar (máttur) og/eða öryggismats (hugsanleg(ur)/máttur og váhrif) á íðefnum eða hópi íðefna, sem samþættar og vegur skipulega öll gögn sem skipta máli til grundvallar eftirlitsákvörðunum sem varða hugsanlega hættu og/eða áhættu og/eða þörf á nákvæmari og þar af leiðandi færri prófunum

**Samanburður með æti:** Ómeðhöndlað, samhlíða sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis. Sýnið er unnið með sýnum, sem hafa verið meðhöndluð með prófunariðefni og öðrum samanburðarsýnum, til að ákvarða hvort leysirinn/burðarefnið víxlverkar við prófunarkerfið.

**Blanda:** Blanda eða lausn tveggja eða fleiri efna.

**Efni með einum efnisþætti:** Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi að a.m.k. 80% (massahlutfall).

**Fjölþáttaefni:** Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem fleiri en einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi í styrk sem nemur  $\geq 10\%$  (massahlutfall) og  $< 80\%$  (massahlutfall). Fjölþáttaefni er afleiðing af framleiðsluferli. Mismunurinn á blöndu og fjölþáttaefni er sá að blandan fæst með blöndun tveggja eða fleiri efna án efnahvarfs. Fjölþáttaefni er afleiðing af efnahvarfi.

**Jákvæður samanburður:** Samskonar sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis og er meðhöndlað með efni sem vitað er að framkallar jákvæða svörun. Til að tryggja að hægt sé að meta breytileika í svörun jákvæða samanburðarins yfir tíma skal þessi jákvæða svörun þó ekki vera of kröftug.

**Ólífrænt umbreyttir meðvakar:** Íðefni sem verða næmandi efni með ummyndun án tilstillis lífvera.

**Lífrænt umbreyttir meðvakar:** Íðefni sem þurfa ensímvirkjun til að hafa húðnæmingarmátt.

**Hlutfallslegur flúrljómunarstyrkur (RFI):** Hlutfallsleg gildi faldmeðaltals flúrljómunarstyrks (MFI) í íðefnameðhöndluðum frumum samanborið við faldmeðaltal flúrljómunarstyrks (MFI) í leysi-/burðarefnismeðhöndluðum frumum.

**Gildi:** Lýsing á sambandi prófunarinnar og áhrifanna, sem miðað er við, og hvort sambandið hefur merkingu og er gagnlegt miðað við tiltekinn tilgang. Gildið lýsir því að hvaða marki prófunin nær að mæla rétt eða spá fyrir um líffræðilegu áhrifin sem miðað er við. Gildi felur í sér umfjöllun um nákvæmni (samsvörun) prófunar (21. heimild).

**Áreiðanleiki:** Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma prófun með samanburðarnákvæmni hjá hverri rannsóknarstofu og hjá mismunandi rannsóknarstofum yfir lengri tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Áreiðanleiki er metinn með því að reikna út einsetursamanburðarnákvæmni og fjölsetra samanburðarnákvæmni og einsetursendurtekningarnákvæmni (21. heimild).

**Keyrsla:** Keyrsla samanstendur af einu eða fleirum prófunaríðefnum sem eru prófuð samskiða með samanburði með leysi/burðarefni og með jákvæðum samanburði.

**Næmi:** Hlutfall allra jákvæðra/virkra íðefna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Þetta er mælikvarði á nákvæmni prófunar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunar (21. heimild).

**Litunarjafnalausn:** Fosfatstillt saltlausn sem inniheldur 0,1% af nautgripasermisalbúmíni.

**Samanburður með leysi/burðarefni:** Ómeðhöndlað sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis nema prófunaríðefnið en með leysinum/burðarefninu sem er notað. Hann er notaður til að ákvarða grunnviðmiðunarsvörun fyrir sýni sem eru meðhöndluð með prófunaríðefni sem er uppleyst í eða myndar stöðuga dreifilausn í sama leysi/burðarefni. Þegar þetta sýni er prófað með samskiða samanburðarsýni með æti sýnir það einnig fram á hvort leysirinn/burðarefnið víxlverkar við prófunarkerfið.

**Sértæki:** Hlutfall allra neikvæðra/óvirkra íðefna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Þetta er mælikvarði á nákvæmni prófunar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunar (21. heimild).

**Efni:** Frumefni og efnasambönd þess, náttúruleg eða unnin með framleiðsluferlum, þ.m.t. öll aukefni, sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika þess, og öll óhreinindi, sem stafa frá vinnslunni, en þó ekki leysiefni sem skilja má frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess.

**Prófunariðefni:** Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari aðferð.

**Hnattsamræmt kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK SP):** Kerfi til flokkunar íðefna (efna og blandna), samkvæmt stöðluðum tegundum og stigum eðlisrænnar hættu, heilbrigðishættu og umhverfishættu, sem tekur til samsvarandi hættuboðsatriða, s.s. skýringarmynda, viðvörunarorða, hættusetninga, varnaðarsetninga og öryggisblaða til að miðla upplýsingum um skaðleg áhrif þeirra til verndar fólki (þ.m.t. vinnuveitendur, starfsmenn, flytjendur, neytendur og bráðaliðar) og umhverfinu (23. heimild).

**UVCB-efni:** efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.

**Fullgild prófun:** Prófun sem telst hafa fullnægjandi gildi og áreiðanleika í tilteknum tilgangi og sem byggist á vísindalega traustum meginreglum. Prófun er aldrei fullkomlega algild, einungis í tengslum við skilgreindan tilgang (21. heimild).

## Viðbætur 1.2

## HÆFNISEFNI

Áður en prófunin, sem lýst er í þessum viðbæti við prófunaraðferð B.71, er tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur sýna fram á tæknilega hæfni sína með því að fá rétta þá spá sem búist er við með h-CLAT-prófuninni fyrir hæfnisefni 10, sem mælt er með í töflu 1, og með því að fá fram CV75-, EC150- og EC200-gildi sem falla innan viðkomandi viðmiðunarþils fyrir a.m.k. 8 af hæfnisefnunum 10. Hæfnisefni voru valin sem dæmigerð fyrir svörunarsvið húðnæmingarhættu. Aðrar valviðmiðanir voru þær að efnin eru fánleg á almennum markaði og að hágæða tilvísunargögn um rannsóknir í líffi, sem og um rannsóknir í glasi, sem verða til með aðferðinni h-CLAT-prófun eru tiltæk. Birt tilvísunargögn eru einnig tiltæk fyrir aðferðina h-CLAT-prófun (3. og 14. heimild).

Tafla 1

## Efni sem mælt er með til að sýna fram á tæknilega hæfni fyrir aðferðina h-CLAT-prófun

Hæfnisefni	CAS-númer	Eðlisástand	Spá í líffi <sup>(1)</sup>	CV75- viðmiðunarbíl í µg/ml <sup>(2)</sup>	Niðurstöður h- CLAT-prófunar fyrir CD86 (EC150- viðmiðunarbíl í µg/ml) <sup>(3)</sup>	Niðurstöður h- CLAT-prófunar fyrir CD54 (EC150- viðmiðunarbíl í µg/ml) <sup>(4)</sup>
2,4-dínítróklóróbensen	97-00-7	Fast efni	Næmir (mjög sterkur)	2–12	Jákvæðar (0,5–10)	Jákvæðar (0,5–15)
4-fenýlendíamín	106-50-3	Fast efni	Næmir (sterkur)	5–95	Jákvæðar (<40)	Neikvæðar (>1,5) <sup>(3)</sup>
Nikkelsúlfat	10101-97-0	Fast efni	Næmir (meðalsterkur)	30–500	Jákvæðar (<100)	Jákvæðar (10–100)
2-merkaptbensóþíasól	149-30-4	Fast efni	Næmir (meðalsterkur)	30–400	Neikvæðar (>10) <sup>(3)</sup>	Jákvæðar (10–140)
R(+)-límónen	5989-27-5	Vökvi	Næmir (vægur)	>20	Neikvæðar (>5) <sup>(3)</sup>	Jákvæðar (<250)
Ímídasólídínúrea	39236-46-9	Fast efni	Næmir (vægur)	25–100	Jákvæðar (20–90)	Jákvæðar (20–75)
Ísoprópanól	67-63-0	Vökvi	Ekki næmir	>5000	Neikvæðar (>5000)	Neikvæðar (>5000)
Glýseról	56-81-5	Vökvi	Ekki næmir	>5000	Neikvæðar (>5000)	Neikvæðar (>5000)
Mjólkursýra	50-21-5	Vökvi	Ekki næmir	1500–5000	Neikvæðar (>5000)	Neikvæðar (>5000)
4-amínóbensósýra	150-13-0	Fast efni	Ekki næmir	>1000	Neikvæðar (>1000)	Neikvæðar (>1000)

Skammstafanir: CAS-númer = Skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um iðefni

<sup>(1)</sup> Spá um hættu í líffi og (mátt) byggist á eitlagreiningargögnum (3. og 14. heimild). Máttur í líffi er fenginn með því að nota viðmiðanirnar sem lagðar eru til hjá Evrópumíðstöð rannsókna á umhverfiseiturhrifum og eiturefnafræði (ECETOC) (24. heimild).

<sup>(2)</sup> Byggt á sögulegum mældum gildum (13. og 25. heimild).

<sup>(3)</sup> Sögulega séð hafa neikvæðar niðurstöður verið í meirihluta fyrir þennan markað og þess vegna er aðallega búist við neikvæðri niðurstöðu. Styrkbilið sem var gefið var skilgreint á grundvelli þessara fáu sögulegu jákvæðu niðurstaðna sem fengust. Ef jákvæð niðurstaða fæst ætti EC-gildi að vera innan tilgreinds viðmiðunarþils.

## 2. viðbætur

## HÚÐNÆMING Í GLASI: VIRKJUNARPRÓFUN U937-FRUMULÍNU (U-SENS™-PRÓFUN)

## ATRÍÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

1. Í U-SENS™-prófun eru magngreindar breytingar á tjáningu frumuyfirborðsmarkna sem tengjast ferlinu við virkjun einkjörnunga og angafruma (þ.e. CD86) í U937-frumulínu eitelfrumukrabbameins í mönnum eftir váhrif frá næmandi efnum (1. heimild). Mæld gildi tjáningar CD86-frumuyfirborðsmarkans í U937-frumulínunni er síðan notað til stuðnings við að skilja á milli húðnæma og efna sem eru ekki næmandi.
2. U-SENS™-prófunin var metin í fullgildingarrannsókn (2. heimild) sem var samræmd af L'Oreal og síðan fór fram óháð jafningjaryni af hálfu vísindalegrar ráðgjafarnefndar tilvísunarrannsóknarstofu Evrópusambandsins fyrir annars konar aðferðir en prófanir á dýrum (EURL ECVAM) (3. heimild). Að teknu tilliti til allra fyrirliggjandi sannana og innleggs frá eftirlitsaðilum og hagsmunaaðilum mælti tilvísunarrannsóknarstofu Evrópusambandsins fyrir annars konar aðferðir en prófanir á dýrum (EURL ECVAM) (4. heimild) með því að U-SENS™-prófunin yrði notuð sem hluti af samþættri aðferð við prófun og mat til stuðnings við að skilja á milli næmandi efna og efna sem eru ekki næmandi til hættuflokkunar og merkinga. Sem stendur fjallar Efnahags- og framfarastofnunin um nokkrar raundæmarannsóknir, þar sem mismunandi prófunaráætlunum og spálíkönunum er lýst, í leiðbeiningarskjali sínu um skýrslugjöf um skipulagðar aðferðir við samþættingu gagna og einstakra upplýsingaveita sem eru notaðar innan samþættra aðferða við prófun og mat vegna húðnæmingar. Ein af mismunandi skilgreindum aðferðum er byggð á U-SENS-greiningunni (5. heimild). Einnig er gerð grein fyrir dæmum um notkun á gögnum úr U-SENS™-prófun í samsetningu með öðrum upplýsingum, þ.m.t. söguleg gögn og fyrirliggjandi gild gögn um menn (6. heimild), annars staðar í heimildum (4.–5. heimild og 7. heimild).
3. Í ljós kom að U-SENS™-prófunin reyndist yfirferanleg til rannsóknarstofa sem hafa reynslu af frumuræktunartækni og frumuflæðissjargreiningum. Búast má við að samanburðarnákvæmni spáa sem fást með prófuninni sé við 90% og 84% markið innan og milli rannsóknarstofa, eftir því sem við á (8. heimild). Niðurstöður sem urðu til í fullgildingarrannsókninni (8. heimild) og aðrar birtar rannsóknir (1. heimild) benda í heildina til þess að nákvæmni til að skilja á milli húðnæma (þ.e. 1. undirflokkur HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) og efna sem eru ekki næmandi sé 86% (N=166) með 91% næmi (118/129) og 65% sértæki (24/37) þegar hún er borin saman við niðurstöður úr eitlagreiningu. Samanborið við niðurstöður að því er varðar menn er nákvæmnin til að skilja á milli húðnæma (þ.e. 1. undirflokkur HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) og efna sem eru ekki næmandi 77% (N=101) með 100% næmi (58/58) og 47% sértæki (20/43). Falsneikvæðar spár með U-SENS™-prófuninni, samanborið við eitlagreiningu, eru líklegri til að varða íðefni sem sýna vægan húðnæmingarmátt eða húðnæmingarmátt í meðallagi (þ.e. undirundirflokkur 1B í HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) en íðefni sem sýna mikinn húðnæmingarmátt (þ.e. undirundirflokkur 1A í HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) (1., 8. og 9. heimild). Þegar þessar upplýsingar eru teknar saman benda þær til þess að U-SENS™-prófunin sé gagnleg til að stuðla að því að greina áhættu á húðnæmingu. Þó eru gildin fyrir nákvæmni, sem hér eru gefin fyrir U-SENS™-prófunina sem sjálfstæða prófun, einungis leiðbeinandi þar eð líta skal á prófunina í samsetningu með öðrum upplýsingum með skírskotun til samþættra aðferða við prófun og mat og í samræmi við ákvæði 7. og 8. liðar í almenna innganginum. Þegar aðferðir, án tilrauna á dýrum, vegna húðnæmingar eru metnar ætti enn fremur að hafa í huga að eitlagreining, sem og aðrar prófanir á dýrum, endurspeglar e.t.v. ekki að fullu aðstæður hjá mönnum.
4. Á grundvelli gagna sem nú liggja fyrir reyndist U-SENS™-prófunin nothæf til að prófa íðefni (þ.m.t. innihaldsefni í snyrtivörur, t.d. rotvarnarefni, yfirborðsvirk efni, virk efni og litarefni) sem búa yfir ýmsum lífrænum virkum hópum, eðlisefnafræðilegum eiginleikum, húðnæmingarmætti (sem hefur verið ákvarðaður með rannsóknunum í lífi) og sýna svið hvarfganga sem vitað er að tengjast húðnæmingu (þ.e. sem fela í sér Michael-þega, Schiff-basamyndun, asýlfærslufni, kjarnasækin tveggja sameinda skiptihvörf [SN2] eða kjarnasækin arómatísk skiptihvörf [SNAr]) (1. og 8.–10. heimild). U-SENS™-prófunin hentar fyrir prófunaríðefni sem eru leysanleg eða sem mynda stöðuga dreifilaun (þ.e. með svifögnum eða í sviflausn þar sem prófunaríðefnið hvorki sest né skilur sig frá leysinum/burðarefninu í mismunandi fasa) í víðeigandi leysi/burðarefni (sjá 13. lið). Með U-SENS™-prófuninni (1. og 10. heimild) var spáð rétt fyrir um íðefni sem gefin eru upp í gagnamenginu sem lífrænt umbreyttir meðvakar (þ.e. efni sem virkjast með oxun) eða ólífrænt umbreyttir meðvakar (þ.e. efni sem þurfa ensímvirkjun, t.d. fyrir milligöngu P450-ensíma). Himnutruflandi efni geta leitt til falsjákvæðra

niðurstaðna vegna ósértækrar aukningar á tjáningu CD86 þar sem 3 af 7 falsjávæðum svörum í tengslum við viðmiðunarflokkunina *í lífi* voru yfirborðsvirk efni (1. heimild). Gæta skal varúðar varðandi slíkar jákvæðar niðurstöður með yfirborðsvirkum efnum en á hinn bóginn er enn unnt að nota neikvæðar niðurstöður með yfirborðsvirkum efnum til að styðja við greiningu á íðefni sem efni sem er ekki næmandi. Hægt er að meta flúrskinsprófunariðefni með U-SENS<sup>TM</sup>-prófuninni (1. heimild) en engu að síður munu sterk flúrskinsprófunariðefni, sem senda út á sömu bylgjulengd og ísóþíósýanat í flúrskinslausn (FITC) eða própídíumjodíð, trufla frumuflæðissjargreininguna og af þeim sökum er ekki hægt að meta þau rétt með því að nota tilsvarendi mótefni ísóþíósýanats í flúrskinslausn (hugsanlega falsneikvæðar niðurstöður) eða própídíumjodíð (lífvænleiki ekki mælanlegur). Í slíku tilviki er hægt að nota önnur flúrskinsmerkt mótefni eða aðra frumueiturhrifamarka, eftir því sem við á, svo fremi að hægt sé að sýna fram á að þeir gefi svipaðar niðurstöður og FITC-merkt mótefni eða própídíumjodíð (sjá 18. lið), t.d. með því að prófa hæfnisefnin í viðbæti 2.2. Í ljósi framangreinds ætti að túlka jákvæðar niðurstöður með yfirborðsvirkum efnum og neikvæðar niðurstöður með sterkum flúrskinsprófunariðefnum með skírskotun til umræddra takmarkana og ásamt öðrum upplýsingaveitum innan ramma samþættrar aðferðar við prófun og mat. Í tilvikum þar sem um er að ræða sannanir sem sýna fram á að U-SENS<sup>TM</sup>-prófunin sé ónothæf fyrir aðra tiltekna flokka prófunariðefna skal ekki nota hana fyrir þessa tilteknu flokka.

5. Eins og lýst er hér að framan er U-SENS<sup>TM</sup>-prófunin til stuðnings við að skilja á milli húðnæma og efna sem eru ekki næmandi. Þó getur hún einnig hugsanlega stuðlað að mati á næmingarmætti þegar hún er notuð í samþættum aðferðum, s.s. samþættri aðferð við prófun og mat. Samt sem áður er þörf á frekari vinnu, helst á grundvelli gagna um menn, til að ákvarða hvernig niðurstöður úr U-SENS<sup>TM</sup>-prófun geta hugsanlega legið til grundvallar mati á næmingarmætti.
6. Skilgreiningar eru gefnar í viðbæti 2.1.

#### MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

7. U-SENS<sup>TM</sup>-prófunin er greining *í glasi* þar sem breytingar á tjáningu CD86-frumuyfirborðsmarka eru magngreindar í frumulínu eitulfrumukrabbameins í mönnum, U937-frumur, eftir váhrif frá prófunariðefninu í  $45 \pm 3$  klukkustundir. Yfirborðsmarkinn CD86 er dæmigerður marki fyrir virkjun U937. Vitað er að CD86 er samörvandi sameind sem getur líft eftir virkjun einkjörnunga sem gegnir mikilvægu hlutverki við að setja T-frumur af stað. Breytingar á tjáningu CD86-frumuyfirborðsmarka eru mældar með frumuflæðissjargreiningu eftir frumulitun, yfirleitt með FITC-merktum mótefnum. Mælingar á frumueiturhrifum eru einnig gerðar samhliða (t.d. með því að nota própídíumjodíð) til að meta hvort stýrð fjölgun í tjáningu CD86-frumuyfirborðsmarka komi fram við styrk sem er undir frumueitrandi styrk. Örvunarstuðull (S.I.) CD86-frumuyfirborðsmarka, samanborið við samanburð með leysi/burðarefni, er reiknaður út og notaður í spálkaninu (sjá 19. lið) til stuðnings við að skilja á milli næmandi efna og efna sem eru ekki næmandi.

#### SÝNT FRAM Á HÆFNI

8. Áður en prófunin, sem lýst er í þessum viðauka við prófunaraðferð B.71., er tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur staðfesta tæknilega hæfni sína með hæfnisefnunum 10, sem eru tilgreind í viðbæti 2.2, í samræmi við góðar starfsvenjur við aðferðir *í glasi* (11. heimild). Enn fremur skulu notendur prófunarinnar viðhalda sögulegum gagnagrunni yfir gögn sem er aflað með athugunum á virkni (sjá 11. lið) og með jákvæðum samanburðum og samanburðum með leysi/burðarefni (sjá 15.–16. lið) og nota þessi gögn til að staðfesta að samanburðarnákvæmni prófunarinnar á rannsóknarstofu þeirra sé viðhaldið yfir lengri tíma.

#### VERKFERLI

9. Þessi prófun er byggð á gagnagrunnsþjónustu U-SENS<sup>TM</sup>-prófunar varðandi annars konar aðferðir en dýratilraunir (DB-ALM), aðferðarlýsingu nr. 183 (12. heimild). Staðlaðar verklagsreglur fyrir U-SENS<sup>TM</sup>-prófunina skulu notaðar þegar hún er innleidd og notuð á rannsóknarstofu. Hægt er að nota sjálfvirkt kerfi til að keyra U-SENS<sup>TM</sup>-prófunina ef hægt er að sýna fram á að það gefi svipaðar niðurstöður, t.d. með því að prófa hæfnisefnin í viðbæti 2.2. Hér á eftir er lýsing á helstu þáttum og tilhögum U-SENS<sup>TM</sup>-prófunarinnar.

**Undirbúningur frumna**

10. Nota skal frumulínu eitilfrumukrabbameins í mönnum, U937-frumur (13. heimild), til að framkvæma U-SENS™-prófunina. Frumur (klón CRL1593.2) skulu fengnar frá viðurkenndu frumusafni, s.s. „American Type Culture Collection“.
11. U937-frumur eru ræktaðar í rakabættu andrúmslofti við 37 °C og 5% koltvísýring (CO<sub>2</sub>) og í RPMI-1 640-æti með viðbættu 10% nautgripafósturssermi, 2 mM L-glútamíni, 100 einingum/ml penisillíni og 100 µg/ml streptómýsini (tilbúið æti). U937-frumum er umsóð kerfisbundið á tveggja til þriggja daga fresti með þéttleikann 1,5 til 3 × 10<sup>5</sup> frumur/ml, eftir því sem við á. Frumuþéttleiki skal ekki fara yfir 2 × 10<sup>6</sup> frumur/ml og lífvænleiki frumna, mældur með útilokun með trypan-bláum, skal vera ≥ 90% (skal ekki beitt við fyrstu umsáningu eftir afþiðingu). Áður en hver lota af frumum, nautgripafósturssermi eða sýklalyfjum er notuð til prófunar skal hæfi hennar athugað með því að framkvæma athugun á virkni. Athugun á virkni frumnanna skal framkvæmd með því að nota jákvæða samanburðinn píkrýlsúlfónsýru (2,4,6-trínítróbensensúlfónsýra: TNBS) (CAS-númer 2 508-19-2, ≥ 99% hreinleiki) og neikvæða samanburðinn mjólkursýru (CAS-númer 50-21-5, ≥ 85% hreinleiki) a.m.k. viku eftir afþiðingu. Fyrir athugun á virkni skal prófa sex lokastyrkleika fyrir hvorn samanburð fyrir sig af tveimur (trínítróbensensúlfónsýra: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100µg/ml og mjólkursýra: 1, 10, 20, 50, 100, 200µg/ml). Trínítróbensensúlfónsýra, sem er leyst upp í tilbúnu æti, á að veita jákvæða og styrkleikatengda svörun hjá CD86 (t.d. þegar jákvæðum styrk, CD86 með örvunarstuðulinn (S.I.) ≥ 150, er fylgt eftir með styrk með hækkandi örvunarstuðli (S.I.) CD86) og mjólkursýra sem er leyst upp í tilbúnu æti á að veita neikvæða svörun hjá CD86 (sjá 21. lið). Einungis skal nota þá frumulotu, sem stóðst athugun á virkni tvisvar sinnum, í greininguna. Hægt er að láta frumur fjölga sér í allt að sjö vikur eftir afþiðingu. Umsáningartala skal ekki fara yfir 21. Athugun á virkni skal framkvæmd samkvæmt verklaginu sem lýst er í 18.–22. lið.
12. Fyrir prófun er U937-frumum sáð með þéttleika sem nemur annaðhvort 3 × 10<sup>5</sup> frumum/ml eða 6 × 10<sup>5</sup> frumum/ml og þær forræktaðar í ræktunarflöskum í 2 daga eða í 1 dag, eftir því sem við á. Nota má önnur forræktunarskilyrði en þau sem lýst er hér að framan ef færð eru fullnægjandi, vísindaleg rök fyrir því og ef hægt er að sýna fram á að þau gefi svipaðar niðurstöður, t.d. með því að prófa hæfnisefnin í viðbæti 2.2. Á prófunardaginn eru frumur, sem eru heimtar úr ræktunarflöskunni, enduruppleystar með nýjum ræktunarmiðli með 5 × 10<sup>5</sup> frumum/ml. Síðan er frumunum dreift í 96 holu bakka með flatrí botnplötu með 100 µl (endanlegur frumuþéttleiki er 0,5 × 10<sup>5</sup> frumur/holu).

**Tilreiðsla prófunaríðefna og samanburðarefna**

13. Mat á leysni er framkvæmt á undan prófuninni. Í þessu skyni eru prófunaríðefni leyst upp eða stöðug dreifilausn mynduð við styrk sem nemur 50 mg/ml í tilbúnu æti sem fyrsti leysisvalkostur, eða í dímetýlsúlfoxíði (dímetýlsúlfoxíð 99% hreinleiki) sem annar leysis-/burðarefnisvalkostur. ef prófunaríðefnið er ekki leysanlegt í tilbúnu æti með leysi/burðarefni. Fyrir prófunina er prófunaríðefnið leyst upp í lokastyrk sem nemur 0,4 mg/ml tilbúnu æti ef íðefnið er leysanlegt í þessum leysi/þessu burðarefni. Ef íðefnið er einungis leysanlegt í dímetýlsúlfoxíði er það leyst upp við styrk sem nemur 50 mg/ml. Nota má aðra leysa/önnur burðarefni en þau sem lýst er að framan ef færð eru fullnægjandi vísindaleg rök fyrir því. Taka skal tillit til stöðugleika prófunaríðefnisins í endanlegu(m) leysi/burðarefni.
14. Prófunaríðefni og samanburðarefni eru tilreidd á prófunardegi. Þar eð skammtaákvörðunargreining er ekki framkvæmd fyrir fyrstu keyrsluna skal prófa 6 lokastyrkleika (1, 10, 20, 50, 100 og 200 µg/ml) í samsvarandi /leysi/burðarefni, annaðhvort í tilbúnu æti eða í 0,4% dímetýlsúlfoxíði í æti. Fyrir síðari keyrslur eru tilreiddar a.m.k. 4 vinnulausnir (þ.e. a.m.k. 4 styrkleikar) af prófunaríðefnunum þar sem byrjað er á 0,4 mg/ml í tilbúnu æti eða 50 mg/ml í dímetýlsúlfoxíði og notaður samsvarandi leysir/burðarefni. Vinnulausnirnar eru að lokum notaðar til meðferðar með því að bæta sama rúmmáli af U937-frumusviflausn (sjá 11. lið hér að framan) við rúmmál vinnulausnanna í bakkanum til að ná fram tvöfaldri þynningu í viðbót (12. heimild). Styrkleikarnir (a.m.k. 4 styrkleikar) fyrir frekari keyrslur eru valdir á grundvelli niðurstæðna úr öllum fyrri keyrslum, hverri um sig, (8. heimild). Nothæfir lokastyrkleikar eru 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 og 200 µg/ml. Hámarkslokastyrkur er 200 µg/ml. Ef í ljós kemur jákvætt gildi fyrir CD86 við 1 µg/ml er gildið 0,1 µg/ml metið til að finna styrk prófunaríðefnisins sem kallar ekki fram CD86 yfir jákvæðu viðmiðunarmörkunum. Fyrir hverja keyrslu er EC150 (styrkur þar sem íðefni nær jákvæðu

CD86-viðmiðunarmörkunum 150%, sjá 19. lið) reiknað út ef jákvæð styrkháð CD86-svörun kemur fram. Ef prófunaríðefnið kallar fram jákvæða CD86-svörun, sem er ekki styrkháð, skiptir útreikningur á EC150 e.t.v. ekki máli eins og lýst er í U-SENS™ aðferðarlýsingu DB-ALM nr. 183 (12. heimild). Fyrir hverja keyrslu er CV70 (styrkur þar sem íðefni nær frumueiturhrifaviðmiðunarmörkunum 70%, sjá 19. lið) reiknað út þegar unnt er (12. heimild). Til að rannsaka áhrif styrkháðrar svörunar við aukningu hjá CD86 skulu allir styrkleikar, sem eru valdir úr nothæfum styrkleikum, dreifast sem jafnast milli EC150 (eða hæsta CD86-neikvæða styrkleika sem er ekki frumueitrandi) og CV70 (eða hæsta styrkleika sem er leyfður, þ.e. 200 µg/ml). Prófa skal a.m.k. fjóra styrkleika í hverri keyrslu þar sem a.m.k. tveir styrkleikar eru þeir sömu og í fyrri keyrslu(m) til samanburðar.

15. Samanburður með leysi/burðarefni, sem er notaður í U-SENS™-prófuninni, er tilbúið æti (fyrir prófunaríðefni sem eru uppleyst í eða stöðug dreifilausn í tilbúnu æti) (sjá 4. lið) eða 4% dímetýlsúlfoxíð í tilbúnu æti (fyrir prófunaríðefni sem eru uppleyst í eða stöðug dreifilausn í dímetýlsúlfoxíði).
16. Jákvæður samanburður, sem er notaður í U-SENS™-prófuninni, er trínítróbensensúlfónsýra (sjá 11. lið) sem er tilreidd í tilbúnu æti. Nota skal trínítróbensensúlfónsýru sem jákvæðan samanburð fyrir mælingu á tjáningu CD86 með einum lokastyrkleika í bakka (50 µg/ml) sem gefur > 70% lífvænleika frumna. Til að fá styrkleikann 50 µg/ml af trínítróbensensúlfónsýru í bakka er tilreidd 1 M (þ.e. 293 mg/ml) stofnlausn af trínítróbensensúlfónsýru í tilbúnu æti og þynnt enn frekar, 2930-falt með tilbúnu æti, í vinnulausn sem nemur 100 µg/ml. Nota skal mjólkursýru (CAS-númer 50-21-5) sem neikvæðan samanburð með 200 µg/ml, uppleyst í tilbúnu æti (úr 0,4 mg/ml stofnlausn). Í hvern bakka fyrir hverja keyrslu eru tilreiddar þrjár samhliða prófanir með ómeðhöndluðum samanburði með tilbúnu æti, samanburður með leysi/burðarefni, neikvæður samanburður og jákvæður samanburður (12. heimild). Nota má aðra heppilega jákvæða samanburði ef rannsóknarsöguleg gögn eru tiltæk til að leiða út samanburðarhæfar viðmiðanir fyrir ásættanlegar keyrslur. Viðmiðanir fyrir ásættanlegar keyrslur eru þær sömu og lýst er fyrir prófunaríðefnið (sjá 12. lið).

#### Notkun prófunaríðefna og samanburðarefna

17. Samanburður með leysi/burðarefni eða vinnulausnirnar, sem lýst er í 14.–16. lið, eru blandaðar í hlutfallinu 1:1 (rúmmálshlutfall) með frumusvíflausnum sem eru tilreiddar í 96 holu bakka með flatrí botnplötu (sjá 12. lið). Meðhöndluðu bakkarnir eru síðan settir í ræktun í 45±3 klst. við 37 °C og 5% koltvísýring (CO<sub>2</sub>). Fyrir ræktun er bökkunum þéttlokað með hálfgegnðræpri himnu til að komast hjá því að rokgjörn prófunaríðefni gufi upp og komast hjá víxlmengun milli frumna sem eru meðhöndlaðar með prófunaríðefnum (12. heimild).

#### Frumulitun

18. Eftir váhrif í 45±3 klst. eru frumurnar færðar yfir í V-laga míkrotítunarbakka og safnað með skiljun. Leysnitruflun er skilgreind sem kristallar eða dropar sem sjást í smásjá 45±3 klst. eftir meðhöndlun (fyrir frumulitunina). Flotinu er fleygt og frumurnar sem eftir eru eru þvegnar einu sinni með 100 µl af ískaldri fosfatstilltri saltlausn sem inniheldur 5% af kálfsfósturssermi (litunarjafnalausn). Eftir skiljun eru frumurnar enduruppleystar með 100 µl af litunarjafnalausn og litaðar með 5 µl (t.d. 0,25 µg) af FITC-merktum mótefnum af tegundinni and-CD86 eða IgG1 (flokkur) úr músnum við 4 °C í 30 mín, varið ljósi. Nota skal mótefnin sem lýst er í U-SENS™ aðferðarlýsingu DB-ALM nr. 183 (12. heimild) (fyrir CD86: BD-PharMingen #5556 57 klón: Fun-1 eða Caltag/Invitrogen # MHCD8601 klón: BU63 og fyrir IgG1: BD-PharMingen #5557 48 eða Caltag/Invitrogen # GM4992). Á grundvelli reynslu hönnuða prófunarinnar er flúrljómunarstyrkur mótefnanna yfirleitt svipaður milli mismunandi lota. Nota má mótefni af öðrum klónum eða frá öðrum birgjum, sem stöðust athuganir á virkni, í prófunina (sjá 11. lið). Þó geta notendur íhugað að útra mótefnin við eigin rannsóknarstofuskilyrði til að skilgreina besta styrkleikann til að nota. Nota má önnur greinikerfi, t.d. flúrskinsmerkt



and-CD86 mótefni, ef hægt er að sýna fram á að þau gefi svipaðar niðurstöður og tilsvareandi mótefni ísóþíósýanats í flúrskinslausn, t.d. með því að prófa hæfnisefnin í viðbæti 2.2. Eftir tvo þvotta með 100 µl af litunarjafnlausn og einn með 100 µl af ískaldri fosfatstilltri saltlausn eru frumurnar enduruppleystar í ískaldri fosfatstilltri saltlausn (t.d. 125 µl fyrir sýni sem eru greind handvirkt, tilraunaglas fyrir tilraunaglas, eða 50 µl fyrir notkun á sjálfvirkum sýnatökubakka) og própídíumjoðiðlausn bætt við (lokastyrkur 3 µg/ml). Nota má aðra frumueiturhrifamarka, s.s. 7-amínóaktínómýsín-D (7-AAD) eða trypan-bláan, ef hægt er að sýna fram á að staðgöngulitir gefi svipaðar niðurstöður og própídíumjoðið, t.d. með því að prófa hæfnisefnin í viðbæti 1.2.

### Frumuflæðissjargreining

19. Gildi tjáningar fyrir CD86 og lífvænleika frumna eru greind með frumuflæðissjargreiningu. Frumurnar eru sýndar á punktalínuriti, sem er stillt á lograkvarða, eftir stærð (FSC) og kornagerð (SSC) til að greina með skýrum hætti hóp við fyrstu afmörkun (e. *first gate*) R1 og fjarlægja leifar. Samtals 10 000 frumna í afmörkun R1 er aflað fyrir hverja holu. Frumur úr sömu R1-afmörkuninni eru sýndar á FL3- eða FL4-/SSC-punktalínuriti. Lífvænlegar frumur eru teiknaðar upp með því að koma fyrir annarri afmörkun, R2, sem velur hóp própídíumjoðiðneikvæðra frumna (FL3- eða FL4-rás). Hægt er að reikna lífvænleika frumna út með eftirfarandi jöfnu í greiningarforriti frumumælisins. Ef lífvænleiki frumna er lítill er hægt að afla allt að 20 000 frumna, þ.m.t. dauðar frumur. Að öðrum kosti er hægt að afla gagna í eina mínútu eftir að greiningin hefst.

$$\text{Lífvænleiki frumna} = \frac{\text{Fjöldi lifandi frumna}}{\text{Heildarfjöldi frumna sem er aflað}} \times 100$$

Hundraðshluti FL1-jákvæðra frumna er síðan mældur í hópi þessara lífvænlegra frumna sem afmarkast við R2 (innan R1). Tjáning frumuyfirborðs CD86 er greind á FL1-/SSC-punktalínuriti sem afmarkast við lífvænlegar frumur (R2).

Að því er varðar holur með tilbúnu æti/IgG1 er greiningarmarkinn settur nálægt aðalhöpnum þannig að IgG1 í samanburðinum með tilbúna ætinu liggi innan við marksvæðið 0,6 til 0,9%.

Litatruflun er skilgreind sem hliðrun FITC-merktra IgG1 í punktalínuritinu (IgG1 FL1 faldmeðaltal örvunarstuðulsins (S.I.)  $\geq 150\%$ ).

Örvunarstuðull (S.I.) CD86 fyrir samanburðarfrumur (ómeðhöndlaðar eða í 0,4% dímetýlsúlfoxíði) og íðefnameðhöndlaðar frumur er reiknaður út með eftirfarandi jöfnu:

$$\text{Örvunarstuðull (S.I.)} = \frac{\% \text{ af } CD86^+ \text{ meðhöndlaðar frumur} - \% \text{ af } IgG1^+ \text{ meðhöndlaðar frumur}}{\% \text{ af } CD86^+ \text{ samanburðarfrumur} - \% \text{ af } IgG1^+ \text{ samanburðarfrumur}} \times 100$$

% af ómeðhöndluðum IgG1<sup>+</sup> samanburðarfrumum: vísað er til þeirra sem hundraðshluta FL1-jákvæðra IgG1-frumna, skilgreindar með greiningarmarknum (samþykkt styrkbil sem nemur  $\geq 0,6\%$  og  $< 1,5\%$ , sjá 22. lið), í hópi lífvænlegra ómeðhöndlaðra frumna.

% af samanburðarfrumum/meðhöndluðum frumum IgG1<sup>+</sup>/CD86<sup>+</sup>: vísað er til þeirra sem hundraðshluta FL1-jákvæðra IgG1-/CD86-frumna sem eru mældar án þess að færa greiningarmarkann til í hópi lífvænlegra samanburðarfrumna/meðhöndlaðra frumna.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

### Mat á gögnum

20. Eftirfarandi breytur eru reiknaðar út í U-SENS<sup>TM</sup>-prófuninni: Gildi CV70, þ.e. styrkur sem sýnir 70% af lifun U937-frumna (30% frumueiturhrif) og EC150-gildi, þ.e. styrkur þar sem prófunaríðefnin framkalla örvunarstuðul (S.I.) CD86 sem nemur 150%.

CV70 er reiknað út með logralínulegum innreikningi með eftirfarandi jöfnu:

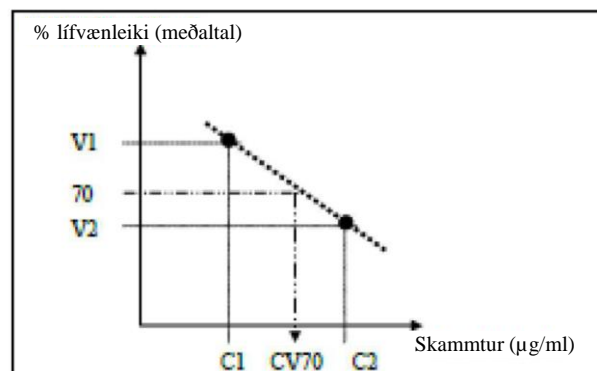
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

Þar sem:

V1 er lágmarksgildi lífvænleika frumna yfir 70%

V2 er hámarksgildi lífvænleika frumna undir 70%

C1 og C2 eru styrkleikar sem sýna gildi lífvænleika frumna V1 og V2, eftir því sem við á



Hægt er að nota aðrar aðferðir til að fá fram CV70 svo fremi að sýnt sé fram á að það hafi engin áhrif á niðurstöðurnar (t.d. með því að prófa hæfnisefnin).

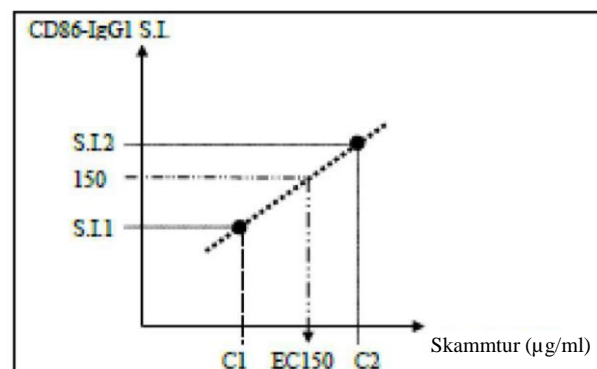
EC150 er reiknað út með logralínulegum innreikningi með eftirfarandi jöfnu:

$$EC150 = C1 + [(150 - S.I.1) / (S.I.2 - S.I.1) * (C2 - C1)]$$

Þar sem:

C1 er hæsti styrkur í µg/ml með örvunarstuðul (S.I.) CD86 < 150% (S.I. 1)

C2 er lægsti styrkur í µg/ml með örvunarstuðul (S.I.) CD86 ≥ 150% (S.I. 2).

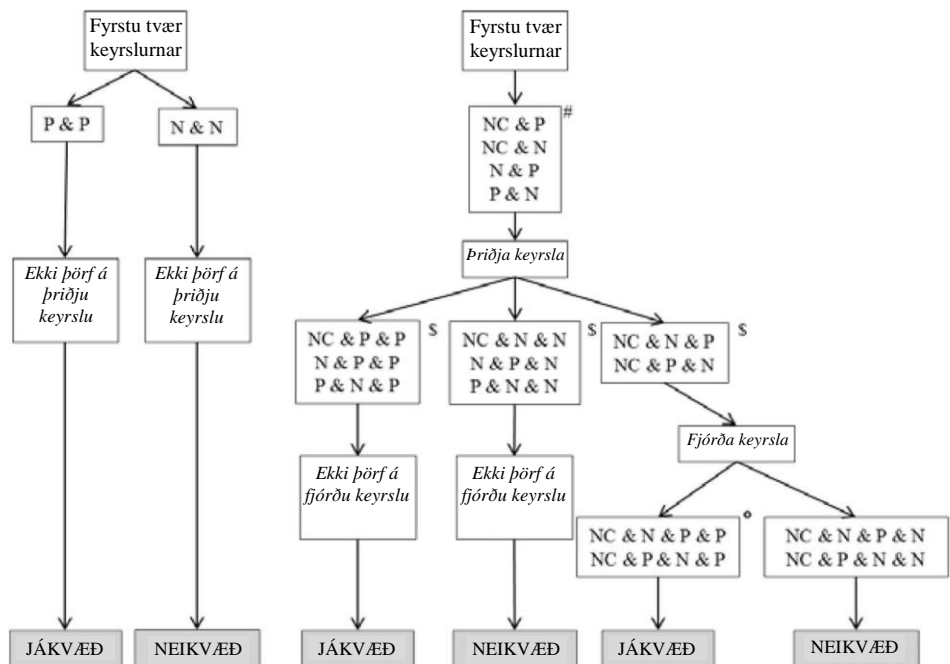


Gildi EC150 og CV70 eru reiknuð út

- fyrir hverja keyrslu: einstök gildi EC150 og CV70 eru notuð sem verkfæri til að rannsaka áhrif styrkháðrar svörunar við aukningu hjá CD86 (sjá 14. lið),
- CV70 í heildina er ákvarðað á grundvelli lífvænleikameðaltals (12. heimild),
- EC150 í heildina er ákvarðað fyrir prófunaríðefni, sem spáð er að sé JÁKVÆTT með U-SENS<sup>TM</sup>-prófuninni (sjá 21. lið) (12. heimild), á grundvelli meðaltals örvunarstuðulsins (S.I.) fyrir CD86-gildin.

## Spálíkan

21. Að því er varðar mælingu á tjáningu CD86 er hvert prófunaríðefni prófað í a.m.k. fjórum styrkleikum og í a.m.k. tveimur sjálfstæðum keyrslum (gerðar á mismunandi degi) til að leiða út eina spá (JÁKVÆÐA eða NEIKVÆÐA).
- Niðurstaða úr hverri keyrslu U-SENS<sup>TM</sup>-prófunar fyrir sig telst vera neikvæð (hér á eftir nefnd „N“) ef örvunarstuðull (S.I.) CD86 er lægri en 150% í öllum styrkleikum sem eru ekki frumueitrandi (lifvænleiki frumna  $\geq 70\%$ ) og ef engin truflun kemur fram (frumueiturhrif, leysni: sjá 18. lið eða litur: sjá 19. lið, óháð styrkleikum, sem eru ekki frumueitrandi, þar sem truflunin kemur fram). Í öllum öðrum tilvikum: ef örvunarstuðull (S.I.) CD86 er hærri en eða jafn og 150% og/eða ef truflanir koma fram telst niðurstaða úr hverri keyrslu U-SENS<sup>TM</sup>-prófunar fyrir sig vera jákvæð (hér á eftir nefnd „P“).
  - Spá með U-SENS<sup>TM</sup>-prófun er talin NEIKVÆÐ ef a.m.k. tvær sjálfstæðar keyrslur eru neikvæðar (N) (mynd 1). Ef fyrstu tvær keyrslurnar eru báðar neikvæðar (N) telst spáin með U-SENS<sup>TM</sup>-prófuninni NEIKVÆÐ og það þarf ekki að framkvæma þriðju keyrsluna.
  - Spá með U-SENS<sup>TM</sup>-prófun er talin JÁKVÆÐ ef a.m.k. tvær sjálfstæðar keyrslur eru jákvæðar (P) (mynd 1). Ef fyrstu tvær keyrslurnar eru báðar jákvæðar (P) telst spáin með U-SENS<sup>TM</sup>-prófuninni JÁKVÆÐ og það þarf ekki að framkvæma þriðju keyrsluna.
  - Sökum þess að skammtaákvörðunargreining er ekki framkvæmd gildir undantekning ef örvunarstuðull (S.I.) fyrir CD86, í fyrstu keyrslunni, er hærri en eða jafn og 150% við einungis hæsta styrkleikann sem er ekki frumueitrandi. Þá telst keyrslan EKKI AFGERANDI (NC) og prófa skal viðbótarstyrkleika (á milli hæsta styrks sem hefur ekki frumueiturhrif og lægsta styrks sem hefur frumueiturhrif - sjá 20. lið) í viðbótarkeyrslum. Ef keyrsla reynist vera NC skal keyra a.m.k. 2 viðbótarkeyrslur og fjórðu keyrslu ef keyrsla 2 og keyrsla 3 eru ekki samsvarandi (N og/eða P óháð hvor annari) (mynd 1). Eftirfylgnikeyrslur teljast jákvæðar þó að einungis einn styrkleiki, sem er ekki frumueitrandi, gefi CD86 sem er jafnt og eða meira en 150% af því að ákvörðun á styrkleikunum hefur verið aðlöguð fyrir þetta tiltekna prófunaríðefni. Endanleg spá verður byggð á niðurstöðu úr meirihluta keyrslanna þriggja eða fjögurra, hverri um sig, (þ.e. 2 af 3 eða 2 af 4) (mynd 1).



**Mynd 1** Spálíkan sem er notað í U-SENS<sup>TM</sup>-prófuninni. U-SENS<sup>TM</sup>-spá skal skoðuð innan ramma samþættrar aðferðar við prófun og mat og í samræmi við ákvæði 4. liðar og 7., 8. og 9. liðar í almenna innganginum.

N: Keyrsla án jákvæðrar CD86-niðurstöðu eða truflun kom fram.

P: Keyrsla með jákvæðri CD86-niðurstöðu og/eða truflun/truflanir kom(u) fram.

NC: Ekki afgerandi. Fyrsta keyrsla með „Ekki afgerandi“ þegar CD86 er einungis jákvætt við hæsta styrk sem er ekki frumueitrandi.

#: Ein niðurstaða með „Ekki afgerandi“ (NC), sem kemur einungis fram í fyrstu keyrslunni, hefur sjálfkrafa í för með sér að þörf verður á þriðju keyrslunni til að ná meirihluta jákvæðra (P) eða neikvæðra (N) niðurstaðna í a.m.k. 2 af 3 sjálfstæðum keyrslum.

§: Reitirnir sýna viðeigandi samsetningu niðurstaðna úr þremur keyrslum á grundvelli niðurstaðna sem fengust í fyrstu tveimur keyrslunum sem koma fram í reitnum hér að framan.

°: Reitirnir sýna viðeigandi samsetningu niðurstaðna úr fjórum keyrslum á grundvelli niðurstaðna sem fengust í fyrstu þremur keyrslunum sem koma fram í reitnum hér að framan.

### Samþykktarviðmiðanir

22. Eftirfarandi samþykktarviðmiðanir skulu uppfylltar þegar U-SENS™-prófun er notuð (12. heimild).

- Við lok  $45 \pm 3$  klst. váhrifatímabils verður meðaltal lífvænleika í þremur samhliða prófunum með ómeðhöndluðum U937-frumum að vera  $> 90\%$  og ekkert rek í tjáningu CD86 kemur fram. Grunntjáning CD86 í ómeðhöndluðum U937-frumum verður að hafa legið á bilinu  $2\%$  og  $\leq 25\%$ .
- Þegar dímetýlsúlfoxíð er notað sem leysir er gildi samanburðar með dímetýlsúlfoxíði/burðarefni metið með því að reikna út örvunarstuðul (S.I.) dímetýlsúlfoxíðs samanborið við ómeðhöndlaðar frumur og meðaltal lífvænleika frumnanna í þremur samhliða prófunum með frumum verður að vera  $> 90\%$ . Samanburður með dímetýlsúlfoxíði/burðarefni er gildur ef meðalgildið fyrir örvunarstuðul (S.I.) CD86 í samhliða prófununum þremur var lægra en  $250\%$  af meðalgildinu fyrir örvunarstuðul (S.I.) CD86 í samhliða prófununum þremur með ómeðhöndluðum U937-frumum.
- Keyrslurnar teljast gildar ef a.m.k. tvö af þremur IgG1-gildum ómeðhöndlaðra U937-frumna falla innan styrkbilsins  $\geq 0,6\%$  og  $< 1,5\%$ .
- Neikvæður samanburður sem er prófaður samskeiða (mjólkursýra) telst gildur ef a.m.k. tvær af þremur samhliða prófunum voru neikvæðar (örvunarstuðull (S.I.) CD86  $< 150\%$ ) og ekki frumueitrandi (lífvenleiki frumna  $\geq 70\%$ ).
- Jákvæður samanburður (trínítróbensensúlfoxíðsýra) taldist gildur ef a.m.k. tvær af þremur samhliða prófunum voru jákvæðar (örvunarstuðull (S.I.) CD86  $\geq 150\%$ ) og ekki frumueitrandi (lífvenleiki frumna  $\geq 70\%$ ).

### Prófunarskýrsla

23. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

#### Prófunaríðefni

Efni með einum efnisþætti

- Efnafraðileg sanngreining s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-númer, SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla og/eða aðrar auðkenningar.

- Útlit, leysni í tilbúnu æti, leysni í dímetýlsúlfoxíði, sameindaþyngd og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli, að því marki sem unnt er.
- Hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.
- Meðhöndlun fyrir prófun, ef við á (t.d. hitun, mölun).
- Styrkur eða styrkleikar sem eru prófaðir.
- Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.
- Rökstuðningur fyrir vali á leysi/burðarefni fyrir hvert prófunaríðefni.

Fjölpáttæfni, UVCB-efni og blanda:

- Lýsing á eiginleikum eins og kostur er, t.d. með efnakenni (sjá hér að framan), hreinleika, magnbundu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli (sjá hér að framan), að því marki sem unnt er.
- Útlit, leysni í tilbúnu æti, leysni í dímetýlsúlfoxíði, sameindaþyngd og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli, að því marki sem unnt er.
- Sameindaþyngd eða sýndarsameindarþyngd ef um er að ræða blöndur/fjölliður af þekktri samsetningu eða aðrar upplýsingar sem skipta máli fyrir framkvæmd rannsóknarinnar.
- Meðhöndlun fyrir prófun, ef við á (t.d. hitun, mölun).
- Styrkur eða styrkleikar sem eru prófaðir.
- Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.
- Rökstuðningur fyrir vali á leysi/burðarefni fyrir hvert prófunaríðefni.

*Samanburður*

Jákvæður samanburður

- Efnafræðileg sanngreining s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-númer, SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla og/eða aðrar auðkenningar.
- Útlit, leysni í dímetýlsúlfoxíði, sameindaþyngd og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli, að því marki sem unnt er.
- Hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.
- Meðhöndlun fyrir prófun, ef við á (t.d. hitun, mölun).
- Styrkur eða styrkleikar sem eru prófaðir.
- Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.

- Tilvísanir í rannsóknarsögulegar niðurstöður fyrir jákvæðan samanburð sem sýna viðeigandi viðmiðanir fyrir ásættanlegar keyrslur, ef við á.

#### Neikvæður samanburður og samanburður með leysi/burðarefni

- Efnafræðileg samngreining s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-númer, SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla og/eða aðrar auðkenningar.
- Hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.
- Útlit, sameindapýngd og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli, ef aðrir samanburðir með leysi/öðrum burðarefnum eru notuð en þau sem getið er um í viðmiðunarreglum um prófanir og að því marki sem unnt er.
- Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.
- Rökstuðningur fyrir vali á leysi/burðarefni fyrir hvert prófunaríðefni.

#### Prófunarskilyrði

- Heiti og heimilisfang bakhjarls, prófunarstöðvar og rannsóknarstjóra.
- Lýsing á prófuninni sem er notuð.
- Frumúlína sem er notuð, skilyrði við geymslu hennar og uppruni (t.d. frá hvaða starfsstöð hún var fengin).
- Frumflæðissjargreining sem er notuð (t.d. líkan), þ.m.t. stillingar á tæki, mót efni og frumueiturhrifamarkar sem eru notaðir.
- Verklag sem er notað til að sýna fram á hæfni rannsóknarstofunnar til að framkvæma prófunina með því að prófa hæfnisefnin og verklag sem er notað til að sýna fram á að samanburðarnákvæmni prófunarinnar sé viðhaldið yfir lengri tíma, t.d. rannsóknarsöguleg samanburðargögn og/eða söguleg gögn um athuganir á virkni.

#### Viðmiðanir fyrir samþykkt prófunar

- Lífvænleiki frumna og gildi örvunarstuðuls (S.I.) CD86, sem fást með samanburði með leysi/burðarefni, í samanburði við ásættanleikasviðin.
- Lífvænleiki frumna og gildi örvunarstuðuls (S.I.), sem fást með jákvæðum samanburði, í samanburði við ásættanleikasviðin.
- Lífvænleiki frumna í öllum prófuðum styrkleikum prófaða íðefnisins.

#### Prófunaraðferð

- Fjöldi keyrslna sem er notaður.
- Styrkur prófunaríðefna, íbæting og váhrifatími sem eru notuð (ef frábrugðið því sem mælt er með).
- Tími sem váhrif standa yfir.

- Lýsing á þeim matsviðmiðunum og viðmiðunum fyrir ákvarðanir sem eru notaðar.
- Lýsing á öllum breytingum á prófunaraðferðinni.

#### Niðurstöður

- Töflusetning gagnanna, þ.m.t. CV70 (ef við á), örvunarstuðull (S.I.), gildi fyrir lífvænleika frumna, gildi fyrir EC150 (ef við á), sem fást fyrir prófunaríðefnið og fyrir jákvæða samanburðinn í hverri keyrslu, og upplýsingar um flokkun prófunaríðefnis samkvæmt spálíkaninu.
- Lýsing á öðrum athugunum sem skipta máli, ef við á.

#### Umfjöllun um niðurstöðurnar

- Umfjöllun um niðurstöðurnar sem fást með U-SENS™-prófuninni.
- Athugun á niðurstöðum prófunarinnar með skírskotun til samþættrar aðferðar við prófun og mat ef aðrar upplýsingar sem skipta máli eru tiltækar.

#### Ályktanir

#### HEIMILDIR

- 1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.
- 2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Aðgengilegt á: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations)
- 3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EN; doi 10.2787/815737. Available at: [<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705>].
- 4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2760/588955. Aðgengilegt á: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing>.
- 5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.
- 6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Aðgengilegt á: [<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].

- 7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.
- 8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.
- 9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehn, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.
- 10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1 683-1 696.
- 11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Aðgengilegt á: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD\\_Final\\_Draft\\_GIVIMP.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf).
- 12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS<sup>TM</sup>), 33 bls. Aðgengilegt á: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>].
- 13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.
- 14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Aðgengilegt á: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- 15) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Aðgengilegt á: [http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf](http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf).
- 16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Aðgengilegt á: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- 17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Aðgengilegt á: [https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC\\_2003-TR87.pdf](https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf).



## Viðbætur 2.1

## SKILGREININGAR

**Nákvæmni:** Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktu viðmiðunargildi niðurstaða úr prófun er. Þetta er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferða og einn þáttur gildis. Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli rétttra niðurstaðna úr prófun (14. heimild).

**Ferli neikvæðra afleiðinga (AOP):** Röð atburða, frá efnafræðilegri byggingu markíðefnis, eða hóps svipaðra íðefna, um sameindarásingu að niðurstöðu, sem miðað er við, í lífi (15. heimild).

**Styrkháð svörun CD86:** Um er að ræða styrkhæði (eða styrkháða svörun) þegar jákvæðum styrk (örvunarstuðull (S.I.) CD86  $\geq$  150) er fylgt eftir með styrk með hækkandi örvunarstuðli (S.I.) CD86.

**Íðefni:** Efni eða blanda.

**CV70:** Áætlaður styrkur sem sýnir 70% lífvænleika frumna.

**Rek:** Rek er skilgreint með i. leiðrétt %CD86<sup>+</sup>-gildi í ómeðhöndluðum samhliða samanburði 3 er lægra en 50% af meðaltali leiðréttis %CD86<sup>+</sup>-gildis í ómeðhöndluðum samhliða samanburðum 1 og 2 og ii. leiðrétt %CD86<sup>+</sup>-gildi í neikvæðum samhliða samanburði 3 er minna en 50% af meðaltali leiðréttis %CD86<sup>+</sup>-gildis í neikvæðum samhliða samanburðum 1 og 2.

**EC150:** áætlaður styrkur sem sýnir 150% af örvunarstuðli (S.I.) tjáningar CD86.

**Frumuflæðissjárgreining:** frumumælingartækni þar sem frumur, sem eru leystar upp í vökva, flæða ein í einu gegnum brennipunkt segulmögnunarljósgeisla (e. *focus of exciting light*) sem dreifist í mynstri sem er einkennandi fyrir frumurnar og hluta þeirra; frumurnar eru oft merktar með flúrmerkiefnum þannig að fyrst er ljósið ísogað en síðan sent út á annarri tíðni.

**Hætta:** Sá eðlislægi eiginleiki efnis eða aðstæðna að geta valdið skaðlegum áhrifum þegar lífvera, kerfi eða (undir)hópur kemst í snertingu við það efni.

**Samþætt aðferð við prófun og mat (IATA):** Skipulögð aðferð sem er notuð til hættugreiningar (hugsanlegrar), hættulýsingar (máttur) og/eða öryggismats (hugsanleg(ur)/máttur og váhrif) á íðefnum eða hópi íðefna, sem samþættar og vegur skipulega öll gögn sem skipta máli til grundvallar eftirlitsákvörðunum sem varða hugsanlega hættu og/eða áhættu og/eða þörf á nákvæmari og þar af leiðandi færri prófunum

**Blanda:** Blanda eða lausn tveggja eða fleiri efna.

**Efni með einum efnisþætti:** Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi að a.m.k. 80% (massahlutfall).

**Fjölþáttaefni:** Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem fleiri en einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi í styrk sem nemur  $\geq 10\%$  (massahlutfall) og  $< 80\%$  (massahlutfall). Fjölþáttaefni er afleiðing af framleiðsluferli. Mismunurinn á blöndu og fjölþáttaefni er sá að blandan fæst með blöndun tveggja eða fleiri efna án efnahvarfs. Fjölþáttaefni er afleiðing af efnahvarfi.

**Jákvæður samanburður:** Samskonar sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis og er meðhöndlað með efni sem vitað er að framkallar jákvæða svörun. Til að tryggja að hægt sé að meta breytileika í svörun jákvæða samanburðarins yfir tíma skal þessi jákvæða svörun þó ekki vera of kröftug.

**Ólífrænt umbreyttir meðvakar:** Ídefni sem verða næmandi efni með ummyndun án tilstillis lífvera, t.d. með oxun.

**Lífrænt umbreyttir meðvakar:** Ídefni sem þurfa ensímvirkjun til að hafa húðnæmingarmátt.

**Gildi:** Lýsing á sambandi prófunarinnar og áhrifanna, sem miðað er við, og hvort sambandið hefur merkingu og er gagnlegt miðað við tiltekinn tilgang. Gildið lýsir því að hvaða marki prófunin nær að mæla rétt eða spá fyrir um líffræðilegu áhrifin sem miðað er við. Gildi felur í sér umfjöllun um nákvæmni (samsvörun) prófunar (14. heimild).

**Áreiðanleiki:** Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma prófun með samanburðarnákvæmni hjá hverri rannsóknarstofu og hjá mismunandi rannsóknarstofum yfir lengri tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Áreiðanleiki er metinn með því að reikna út einseturssamanburðarnákvæmni og fjölsetra samanburðarnákvæmni og einsetursendurtekningarnákvæmni (14. heimild).

**Keyrsla:** Keyrsla samanstendur af einu eða fleirum prófunaríðefnum sem eru prófuð samskiða með samanburði með leysi/burðarefni og með jákvæðum samanburði.

**Næmi:** Hlutfall allra jákvæðra/virkra ídefna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Þetta er mælikvarði á nákvæmni prófunar sem gefur aðrættarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunar (14. heimild).

**S.I.:** Örvunarstuðull. Hlutfallsleg gildi faldmeðaltals flúrljómunarstyrks (MFI) í ídefnameðhöndluðum frumum samanborið við leysimeðhöndlaðar frumur.

**Samanburður með leysi/burðarefni:** Ómeðhöndlað sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis nema prófunarídefnið en með leysinum/burðarefninu sem er notað. Hann er notaður til að ákvarða grunnviðmiðunarsvörun fyrir sýni sem eru meðhöndluð með prófunarídefni sem er uppleyst í eða myndar stöðuga dreifilausn í sama leysi/burðarefni. Þegar þetta sýni er prófað með samskiða samanburðarsýni með æti sýnir það einnig fram á hvort leysirinn/burðarefnið víxlverkar við prófunarkerfið.

**Sértæki:** Hlutfall allra neikvæðra/óvirkra ídefna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Þetta er mælikvarði á nákvæmni prófunar sem gefur aðrættarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunar (14. heimild).

**Litunarjafnalausn:** Fosfatstillt saltlausn sem inniheldur 5% af kálfsfósturssermi.

**Efni:** Frumefni og efnasambönd þess, náttúruleg eða unnin með framleiðsluferlum, þ.m.t. öll aukefni, sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika þess, og öll óhreinindi, sem stafa frá vinnslunni, en þó ekki leysiefni sem skilja má frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess.

**Prófunaríðefni:** Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófun.

**Hnattsamræmt kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK SP):** Kerfi til flokkunar íðefna (efna og blandna), samkvæmt stöðluðum tegundum og stigum eðlisrænnar hættu, heilbrigðishættu og umhverfishættu, sem tekur til samsvarandi hættuboðsatriða, s.s. hættumerkja, viðvörunarorða, hættusetninga, varnaðarsetninga og öryggisblaða, til að miðla upplýsingum um skaðleg áhrif íðefnanna í því skyni að vernda fólk (þ.m.t. vinnuveitendur, launafólk, flytjendur, neytendur og bráðaliða) og umhverfið (16. heimild).

**UVCB-efni:** efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.

**Fullgild prófun:** Prófun sem telst hafa fullnægjandi gildi og áreiðanleika í tilteknum tilgangi og sem byggist á vísindalega traustum meginreglum. Prófun er aldrei fullkomlega algild, einungis í tengslum við skilgreindan tilgang (14. heimild).

## Viðbætur 2.2

## HÆFNISEFNI

Áður en prófunin, sem lýst er í þessum viðbæti við prófunaraðferð B.71, er tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur sýna fram á tæknilega hæfni sína með því að fá rétta þá spá sem búið er við með U-SENS<sup>TM</sup>-prófuninni fyrir hæfnisefni 10, sem mælt er með í töflu 1, og með því að fá fram CV70- og EC150-gildi sem falla innan viðkomandi viðmiðunarbilis fyrir a.m.k. 8 af hæfnisefnunum 10. Hæfnisefni voru valin sem dæmigerð fyrir svörunarsvið húðnæmingarhættu. Aðrar valviðmiðanir voru þær að efnið eru fáanleg á almennum markaði og að hágæða tilvísunargögn um rannsóknir í lífi, sem og um rannsóknir í glasi sem verða til með U-SENS<sup>TM</sup>-prófuninni, eru tiltæk. Birt tilvísunargögn eru einnig tiltæk fyrir U-SENS<sup>TM</sup>-prófunina (1. og 8. heimild).

Tafla 1

Efni sem mælt er með til að sýna fram á tæknilega hæfni í tengslum við U-SENS<sup>TM</sup>-prófunina

Hæfnisefni	CAS-númer	Eðlisástand	Spá í lífi <sup>(1)</sup>	U-SENS <sup>TM</sup> leysir/burðarefni	U-SENS <sup>TM</sup> CV70-viðmiðunarbil í µg/ml <sup>(2)</sup>	U-SENS <sup>TM</sup> EC150-viðmiðunarbil í µg/ml <sup>(2)</sup>
4-fenýlendíamín	106-50-3	Fast efni	Næmir (sterkur)	Tilbúið æti <sup>(3)</sup>	<30	Jákvætt (≤10)
Þíkrýlsúlfónsýra	2508-19-2	Vökvi	Næmir (sterkur)	Tilbúið æti	>50	Jákvætt (≤50)
Dímetýlmalet	141-05-9	Vökvi	Næmir (meðalsterkur)	Dímetýlsúlfoxíð	10–100	Jákvætt (≤20)
Resorsínól	108-46-3	Fast efni	Næmir (meðalsterkur)	Tilbúið æti	>100	Jákvætt (≤50)
Sinnamínalkóhól	104-54-1	Fast efni	Næmir (vægur)	Dímetýlsúlfoxíð	>100	Jákvætt (10–100)
4-allýlanísól	140-67-0	Vökvi	Næmir (vægur)	Dímetýlsúlfoxíð	>100	Jákvætt (<200)
Sakkarín	81-07-2	Fast efni	Ekki næmir	Dímetýlsúlfoxíð	>200	Neikvætt (>200)
Glýseról	56-81-5	Vökvi	Ekki næmir	Tilbúið æti	>200	Neikvætt (>200)
Mjólkursýra	50-21-5	Vökvi	Ekki næmir	Tilbúið æti	>200	Neikvætt (>200)
Salísýlsýra	69-72-7	Fast efni	Ekki næmir	Dímetýlsúlfoxíð	>200	Neikvætt (>200)

Skammstafanir: CAS-númer = Skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um iðefni

<sup>(1)</sup> Spár um hættu í lífi og (mátt) byggjast á eitlagreiningargögnum (1. og 8. heimild). Máttur í lífi er fenginn með því að nota viðmiðanirnar sem lagðar eru til hjá Evrópumíðstöð rannsókna á umhverfiseiturhrifum og eiturefnafræði (ECETOC) (17. heimild).

<sup>(2)</sup> Byggt á sögulegum mældum gildum (1. og 8. heimild).

<sup>(3)</sup> Tilbúið æti: RPMI-1640-æti með viðbættu 10% kálfstúrssemi, 2 mM L-glútamíni, 100 einingar/ml penisillíni og 100 µg/ml streptomýsínsi (8. heimild).

## 3. viðbætur

## HÚÐNÆMING Í GLASI: IL-8 LUC-GREINING

## ATRÍÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFI Á HUGA Í UPPHAFI

1. Öfugt við greiningar sem greina tjáningu frumuyfirborðsmarkna magngreinar IL-8 Luc-greiningin breytingar á tjáningu IL-8, frumuboða sem tengist virkjun angafruma. Í frumulínu, sem er fengin frá THP-1, með vísigenið IL-8 (THP-G8, úr THP-1 línu einkjörnungahvítblæðisfrumna úr mönnum) er tjáning IL-8 mæld eftir váhrif frá næmandi efnun (1. heimild). Tjáning lúsíferasans er síðan notuð til stuðnings við að skilja á milli húðnæma og efna sem eru ekki næmandi.
2. IL-8 Luc-greiningin var metin í fullgildingarrannsókn (2. heimild) sem „Japanese Centre for the Validation of Alternatives Methods“ (miðstöð Japans fyrir fullgildinguna staðgönguáðferða) (JaCVAM), „**Ministry of Economy, Trade and Industry**“ (Efnahags-, viðskipta- og iðnaðarráðuneytið) (METI) og „Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments“ (japönsk samtök um annars konar aðferðir en tilraunir á dýrum) (**JSAAE**) inntu af hendi og síðan fór fram óháð jafningjarýni (3. heimild) á vegum „Japanese Centre for the Validation of Alternatives Methods“ (JaCVAM) og „Ministry of Health, Labour and Welfare“ (Heilbrigðis-, atvinnu- og velferðarráðuneytið) (MHLW) með stuðningi „**International Cooperation on Alternative Test Methods**“ (alþjóðleg samvinna um annars konar prófunaraðferðir) (ICATM). Að teknu tilliti til allra fyrirliggjandi sannana og innleggs frá eftirlitsaðilum og hagsmunaaðilum telst IL-8 Luc-greiningin gagnleg sem hluti af samþættri aðferð við prófun og mat til stuðnings til að skilja á milli næmandi efna og efna sem eru ekki næmandi til hættuflokkunar og merkinga. Dæmi um notkun á gögnum úr IL-8 Luc-greiningu í samsetningu með öðrum upplýsingum eru tilgreind í heimildum (4.–6. heimild).
3. Í ljós kom að IL-8 Luc-greiningin reyndist yfirferanleg til rannsóknarstofa sem hafa reynslu af frumuræktun og lúsíferasamælingum. Samanburðarnákvæmni innan og milli rannsóknarstofa var 87,7% og 87,5%, eftir því sem við á (2. heimild). Gögn sem var aflað í fullgildingarrannsókninni (2. heimild) og önnur útgefin verk (1. og 6. heimild) sýna að öfugt við eitlagreiningu mat IL-8 Luc-greiningin 118 af 143 íðefnum sem jákvæð eða neikvæð og mat 25 íðefni sem ekki afgerandi og nákvæmni IL-8 Luc-greiningarinnar við að skilja á milli húðnæma (þ.e. 1. undirflokkur HSK-SP/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) og efna sem eru ekki næmandi (þ.e. utan flokks í HSK-SP/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) er 86% (101/118) með 96% næmi (92/96) og 41% sértæki (9/22). Að undanskildum efnun sem eru utan notkunarviðsins sem lýst er hér á eftir (5. liður) mat IL-8 Luc-greiningin 113 af 136 íðefnum sem jákvæð eða neikvæð og mat 23 íðefni sem ekki afgerandi og nákvæmni IL-8 Luc-greiningarinnar er 89% (101/113) með 96% næmi (92/96) og 53% sértæki (9/17). Með því að nota gögn um menn, sem um getur í Urbisch o.fl. (7. heimild), mat IL-8 Luc-greiningin 76 af 90 íðefnum sem jákvæð eða neikvæð og mat 14 íðefni sem ekki afgerandi og nákvæmni er 80% (61/76) með 93% næmi (54/58) og 39% sértæki (7/18). Að undanskildum efnun sem eru utan notkunarviðsins mat IL-8 Luc-greiningin 71 af 84 íðefnum sem jákvæð eða neikvæð og mat 13 íðefni sem ekki afgerandi og nákvæmni er 86% (61/71) með 93% næmi (54/58) og 54% sértæki (7/13). Falsneikvæðar spár með IL-8 Luc-greiningunni eru líklegri til að eiga sér stað varðandi íðefni sem sýna vægan húðnæmingarmátt/húðnæmingarmátt í meðallagi (undirundirflokkur 1B í HSK-SP/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) en varðandi þau sem sýna mikinn mátt (undirundirflokkur 1A í HSK-SP/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) (6. heimild). Til samans styðja upplýsingarnar hlutverk IL-8 Luc-greiningarinnar við að greina áhættu á húðnæmingu. Nákvæmni sem gefin er fyrir IL-8 Luc-greininguna sem sjálfstætt próf er einungis leiðbeinandi þar eð líta skal á prófið í samsetningu með öðrum upplýsingum með skírskotun til samþættra aðferða við prófun og mat og í samræmi við ákvæði 7. og 8. liðar í almenna innganginum. Þegar aðferðir, án prófana á dýrum, vegna húðnæmingar eru metnar skal enn fremur hafa í huga að eitlagreining og aðrar prófanir á dýrum endurspegla e.t.v. ekki að fullu aðstæður hjá mönnum.
4. Á grundvelli gagna sem nú liggja fyrir reyndist IL-8 Luc-greiningin nothæf til að prófa íðefni sem búa yfir ýmsum lífrænum virkum hópum, hvarfgöngum, húðnæmingarmætti (sem hefur verið ákvarðaður með rannsóknunum í lífi) og eðlisefnafræðilegum eiginleikum (2. og 6. heimild).

5. Jafnvel þótt X-VIVO™ 15 væri notað sem leysir í IL-8 Luc-greiningunni mat það rétt íðefni með  $\text{Log } K_{ow} > 3,5$  og þau sem eru með vatnsleysni sem nemur u.þ.b. 100 µg/ml, eins og það er reiknað út með EPI Suite™, og nothæfi þess til að greina næmandi efni sem eru torleysanleg í vatni er betri en með því að nota dímetýlsúlfoxíð sem leysi (2. heimild) í IL-8 Luc-greiningunni. Þó geta neikvæðar niðurstöður fyrir prófunariðefni, sem eru ekki uppleyst við 20 mg/ml, framkallað falsneikvæðar niðurstöður vegna þess að þau geta ekki leystst upp í X-VIVO™ 15. Þess vegna skal ekki taka tillit til neikvæðra niðurstöðna fyrir þessi íðefni. Í fullgildingarrannsókninni kom í ljós hátt hlutfall falsneikvæðra niðurstöðna fyrir anhýdríð. Vegna takmarkaðrar efnaskiptagetu frumulínunnar (8. heimild) og tilraunaskilyrðanna geta lífrænt umbreyttir meðvakar (efni sem þurfa efnaskiptavirkjun) og ólífrænt umbreyttir meðvakar (efni sem virkjast með loftoxun) enn fremur gefið neikvæðar niðurstöður í greiningunni. Jafnvel þótt túlka skuli neikvæðar niðurstöður varðandi grun um ólífrænt/lífrænt umbreytta meðvaka með fyrirvara mat IL-8 Luc-greiningin þó 11 af 11 ólífrænt umbreyttum meðvökum, 6/6 af lífrænt umbreyttum meðvökum og 6/8 af ólífrænt/lífrænt umbreyttum meðvökum á réttan hátt í gagnamengi IL-8 Luc-greiningarinnar. Á grundvelli nýlegrar heildarúttektar á þremur prófunum án dýra (Bein prófun á hvarfgirni við peptíð (DPRA), KeratinoSens™ og h-CLAT-prófun) til að greina ólífrænt og lífrænt umbreytta meðvaka (9. heimild) og á grundvelli þeirrar staðreyndar að THP-G8-frumur, sem eru notaðar í IL-8 Luc-greiningunni, eru frumulína, sem er fengin frá THP-1, sem er notuð í h-CLAT-prófuninni getur IL-8 Luc-greiningin einnig stuðlað að því að auka næmi prófana án dýra að því er varðar að greina ólífrænt og lífrænt umbreytta meðvaka í samsetningu með öðrum prófunum. Yfirborðsvirk efni, sem hafa verið prófuð fram að þessu, gáfu (fals)jákvæðar niðurstöður óháð tegund (t.d. plúshlaðið, mínushlaðið eða ójónað). Að lokum geta íðefni, sem trufla lúsíferasa, ruglað virkni/mælingar á efninu, valdið greinilegri hömlun eða aukið ljómun (10. heimild). Til dæmis var greint frá því að plöntuestrógenstyrkur yfir 1 µM hefði áhrif á ljómunarmerki í öðrum lúsíferasamiðuðum vísigensprófum vegna ofvirkunar á vísigeni lúsíferasans. Af þessum sökum þarf að rannsaka lúsíferasatjáningu, sem fæst við háan styrk plöntuestrógena eða samsettra efna sem grunur leikur á um að myndi plöntuestrógenlíka virkjun á vísigeni lúsíferasa, vandlega (11. heimild). Á grundvelli framangreinds eru yfirborðsvirk efni, anhýdríð og íðefni sem trufla lúsíferasa utan notkunarviðs þessa prófs. Í tilvikum þar sem um er að ræða sannanir sem sýna fram á að IL-8 Luc-prófið sé ónothæft fyrir aðra tiltekna flokka prófunariðefna skal ekki nota prófið fyrir þessa tilteknu flokka.
6. Eins og lýst er hér að framan er IL-8 Luc-prófið til stuðnings við að skilja á milli húðnæma og efna sem eru ekki næmandi. Þörf er á frekari vinnu, helst á grundvelli gagna um menn, til að ákvarða hvernig niðurstöður úr IL-8 Luc-prófi geta stuðlað að því að meta mátt þegar litið er á þær í samsetningu með öðrum upplýsingaveitum.
7. Skilgreiningar eru gefnar í viðbæti 3.1.

#### MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

8. Í IL-8 Luc-prófinu er notuð lína einkjörnungahvítblæðisfrumna úr mönnum, THP-1, sem var fengin frá American Type Culture Collection (Manassas, VA, Bandaríkin). Með notkun á þessari frumulínu ákvarðaði húðsjúkdómafræðideild læknadeildar háskólans í Tohoku (Tohoku University School of Medicine) frumulínu, sem er fengin frá THP-1, með vísigenið IL-8, THP-G8, sem hýsir lúsíferasagenin SLO (*Stable Luciferase Orange*) og SLR (*Stable Luciferase Red*) undir stjórn IL-8- og GAPDH- (glýseraldehyð-3-fosfatvetnisviptis) stýrila, eftir því sem við á (1. heimild). Þetta gerir það kleift að gera megindlegar mælingar á vakningu lúsíferasagena með því að greina ljómun frá vel þekktum ljósgefandi lúsíferasahvarfefnum sem mælikvarða á virkni IL-8 og GAPDH í frumum eftir váhrif frá næmandi íðefnum.
9. Prófunarkerfi með tveimur litum samanstendur af lúsíferasa sem gefur frá sér appelsínugulan lit (SLO; hámark = 580 nm) (12. heimild) fyrir genatjáningu IL-8-stýrilsins, sem og lúsíferasa sem gefur frá sér rauðan lit (SLR; hámark = 630 nm) (13. heimild) fyrir genatjáningu stýrils innri stjórnuar, GAPDH. Lúsíferasarnir tveir gefa frá sér mismunandi liti þegar þeir hvarfast við d-lúsiferín úr eldflugum og ljómun þeirra er mæld samtímis í eins þreps efnahvarfi með því að skipta útgeisluninni frá prófunarblöndunni með ljóssú (14. heimild) (viðbætur 3.2).

10. THP-G8-frumur eru meðhöndlaðar með prófunaríðefninu í 16 klst. og eftir það er virkni SLO-lúsíferasans (SLO-LA), sem endurspeglar virkni IL-8-stýrilsins, og virkni SLR-lúsíferasans (SLR-LA), sem endurspeglar virkni GAPDH-stýrilsins, mæld. Til að auðveldara verði að skilja skammstafanirnar eru virkni SLO-lúsíferasans og virkni SLR-lúsíferasans nefndar IL8LA og GAPLA, eftir því sem við á. Í töflu 1 er lýsing á hugtökum sem tengjast lúsíferasavirkni í IL-8 Luc-prófinu. Mæld gildi eru notuð til að reikna út staðlað IL8LA (nIL8LA) sem er hlutfallið milli IL8LA og GAPLA; örvun nIL8LA (Ind-IL8LA) sem er hlutfall meðaltals fjórmældra gilda nIL8LA í THP-G8-frumum, sem eru meðhöndlaðar með prófunaríðefni, og gildi nIL8LA í ómeðhöndluðum THP-G8-frumum; og hömlun GAPLA (Inh-GAPLA) sem er hlutfall meðaltals fjórmældra gilda GAPLA í THP-G8-frumum, sem eru meðhöndlaðar með prófunaríðefni, og gildi GAPLA í ómeðhöndluðum THP-G8-frumum, og notuð sem vísir um frumueiturhrif.

Tafla 1

## Lýsing á hugtökum sem tengjast lúsíferasavirkni í IL-8 Luc-prófinu

Skammstafanir	Skilgreining
GAPLA	Virkni SLR-lúsíferasa sem endurspeglar virkni GAPDH-stýrils
IL8LA	Virkni SLO-lúsíferasa sem endurspeglar virkni IL-8-stýrils
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA fyrir THP-G8-frumur sem eru meðhöndlaðar með íðefnum/nIL8LA fyrir ómeðhöndlaðar frumur
Inh-GAPLA	GAPLA í THP-G8-frumum sem eru meðhöndlaðar með íðefnum/ GAPLA í ómeðhöndluðum frumum
CV05	Lægsti styrkur íðefnis þar sem Inh-GAPLA verður < 0,05.

11. Nothæfisstaðlar (15. heimild) eru fánlegir til að auðvelda fullgildingu á breyttum IL-8-lúsíferasaprófum í glasi, sem eru svipuð og IL-8 Luc prófið, og gefa færi á tímanlegum breytingum á OECD-viðmiðunarreglu 442E um prófanir til að fella þau inn. Aðeins er hægt að tryggja gagnkvæma samþykkt gagna samkvæmt Efnahags- og framfarastofnuninni fyrir prófanir sem eru fullgiltar samkvæmt nothæfisstöðlunum ef þessar prófanir hafa verið endurskoðaðar og Efnahags- og framfarastofnunin fellt þær inn í viðmiðunarreglu 442E um prófanir (16. heimild).

## SÝNT FRAM Á HÆFNI

12. Áður en prófunin, sem lýst er í þessum viðauka við prófunaraðferð B.71., er tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur staðfesta tæknilega hæfni sína með hæfnisefnunum 10, sem eru tilgreind í viðbæti 3.3, í samræmi við góðar starfsvenjur við aðferðir í glasi (17. heimild). Enn fremur skulu notendur prófunarinnar viðhalda sögulegum gagnagrunni yfir gögn sem er aflað með athugunum á virkni (sjá 15. lið) og með jákvæðum samanburðum og samanburðum með leysi/burðarefni (sjá 21.–24. lið) og nota þessi gögn til að staðfesta að samanburðarnákvæmni prófunarinnar á rannsóknarstofu þeirra sé viðhaldið yfir lengri tíma.

## VERKFERLI

13. Staðlaðar verklagsreglur fyrir IL-8 Luc-prófið eru fánlegar og skulu notaðar þegar prófið er framkvæmt (18. heimild). Rannsóknarstofur, sem vilja framkvæma prófunina, geta fengið endurraðaða THP-G8-frumulínu frá GPC Lab. Co. Ltd.,

Tottori, Japan eftir undirritun samnings um yfirfærslu efnis í samræmi við skilyrðin í sniðmáti Efnahags- og framfarastofnunarinnar. Í eftirfarandi málsgreinum er lýsing á helstu þáttum og tilhögun prófsins.

### Undirbúningur frumna

14. Nota skal THP-G8-frumulínuna frá GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan til að framkvæma IL-8 Luc-prófið (sjá 8. og 13. lið). Við móttöku eru frumurnar látnar fjölga sér (2–4 umsáningar) og geymdar frosnar sem einsleitur stofn. Hægt er að láta frumur úr þessum stofni fjölga sér í að hámarki 12 umsáningum eða í 6 vikur hið mesta. Ætið sem er notað til fjölgunar er RPMI-1640-ræktunaræti sem inniheldur 10% nautgripafósturssermi, lausn sýkladrepanni efnis/sveppalyfs, (100U/ml af penisillíni G, 100µg/ml af streptomýsini og 0,25µg/ml af amfóterisíni B í 0,85% saltlausn) (t.d. GIBCO Cat#15 240-062), 0,15µg/ml af púrómýsini (t.d. CAS-númer: 58-58-2) og 300µg/ml G418 (t.d. CAS-númer: 1083 21-42-2).
15. Áður en frumurnar eru notaðar til prófunar skal hæfi þeirra athugað með því að framkvæma athugun á virkni. Þessi athugun skal gerð 1–2 vikum eða 2–4 umsáningum eftir afþíðingu með því að nota jákvæða samanburðinn 4-nítróbensýlbrómíð (4-NBB) (CAS-númer: 100-11-8,  $\geq 99\%$  hreinleiki) og neikvæða samanburðinn mjólkursýru (CAS-númer: 50-21-5,  $\geq 85\%$  hreinleiki). 4-nítróbensýlbrómíð á að framkalla jákvæða svörun hjá Ind-IL8LA ( $\geq 1.4$ ) en mjólkursýra á að framkalla neikvæða svörun hjá Ind-IL8LA ( $< 1.4$ ). Einungis skal nota þær frumur í prófunina sem stöðust athugun á virkni. Athuginin skal framkvæmd samkvæmt verklaginu sem lýst er í 22.–24. lið.
16. Fyrir prófun er THP-G8-frumum sáð með þéttleika sem nemur 2 til  $5 \times 10^5$  frumum/ml og þær forræktaðar í ræktunarflöskum í 48 til 96 klukkustundir. Daginn sem prófið er framkvæmt eru frumur, sem eru heimtar úr ræktunarflöskunni, þvegnar með RPMI-1640 sem inniheldur 10% nautgripafósturssermi án allra sýkladrepanni efna og síðan enduruppleystar með RPMI-1640 sem inniheldur 10% nautgripafósturssermi án allra sýkladrepanni efna með  $1 \times 10^6$  frumur/ml. Síðan er frumunum dreift í 96 holu bakka með flatri botnplötu (t.d. Costar Cat#3 603) með 50µl ( $5 \times 10^4$  frumur/holu).

### Tilreiðsla prófunaríðefna og samanburðarefna

17. Prófunaríðefni og samanburðarefni eru tilreidd á prófunardegi. Að því er varðar IL-8 Luc-prófið eru prófunaríðefnin leyst upp í X-VIVO™ 15, sermislausu æti sem er fánlegt á almennum markaði (Lonza, 04-418Q), í lokastyrk sem nemur 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 er bætt við 20 mg af prófunaríðefninu (óháð leysni íðefnisins) í örskilvinduglasi og fyllt upp að rúmmálinu 1 ml, síðan hringsnúið kröftuglega og hrist á snúði, á hraða sem er í mesta lagi 8 snún./mín., í 30 mínútur við u.þ.b. 20 °C umhverfshita. Ef föst íðefni eru enn óleysanleg er tilraunaglasíð sett í hátíðnihljóðsundrun þangað til íðefnið er alveg uppleyst eða myndar stöðuga dreifilausn. Að því er varðar prófunaríðefni sem eru uppleysanleg í X-VIVO™ 15 er lausnin þynnt, með stuðlinum 5, með X-VIVO™ 15 og notuð sem X-VIVO™ 15 stofnlausn prófunaríðefnisins (4 mg/ml). Að því er varðar prófunaríðefni, sem eru ekki uppleysanleg í X-VIVO™ 15, er blöndunni snúði aftur í a.m.k. 30 mínútur, síðan skilin í skilvindu við 15,000 snún./mín. ( $\approx 20$  000g) í 5 mínútur; flotið sem verður til er notað sem X-VIVO™ 15 stofnlausn prófunaríðefnisins. Færa skal fullnægjandi vísindaleg rök fyrir notkun annarra leysa, s.s. dímetýlsúlfoxíðs, vatns eða ræktunarætis. Nákvæmt verklag til að leysa upp íðefni er sýnt í viðbæti 3.5. X-VIVO™ 15-lausnirnar, sem lýst er í 18.–23. lið, eru blandaðar í hlutfallinu 1:1 (rúmmálshlutfall) með frumusviflausnum sem eru tilreiddar í 96 holu bakka með flatri botnplötu (sjá 16. lið).
18. Fyrsta prófunarkeyrslan miðar að því að ákvarða frumueitrandi styrk og að rannsaka húðnæmingarmátt íðefna. Með því að nota X-VIVO™ 15 eru gerðar raðþynningar af X-VIVO™ 15 stofnlausn prófunaríðefna með þynningarstuðlinum 2 (sjá viðbæti 3.5) og notaður er 96 holu greiningarbakki (e. *assay block*) (t.d. Costar Cat#EW-1 729-03). Næst er 50 µl/holu af þynntri lausn bætt við 50 µl af frumusviflausn í 96 holu bakka með flatri botnplötu. Af þessum sökum, að því er varðar prófunaríðefni sem eru uppleysanleg í X-VIVO™ 15, er lokastyrkur prófunaríðefnanna á bilinu frá 0,002 til 2 mg/ml (viðbætur 3.5). Að því er varðar prófunaríðefni sem eru ekki uppleysanleg í X-VIVO™ 15 við 20 mg/ml eru einungis þynningarstuðlar á bilinu frá 2 til  $2^{10}$  ákvarðaðir þó að óvissa ríki um raunverulega lokastyrki prófunaríðefnanna og eru háðir mettnastyrk prófunaríðefnanna í X-VIVO™ 15 stofnlausninni.



19. Í síðari prófunarkeyrslum (þ.e. annarri, þriðju og fjórðu samhliða prófun) er stofnlausn X-VIVO™ 15 tilreidd í styrk sem er fjórfalt hærri en styrkur fyrir lífvænleika frumna 05 (CV05; lægsti styrkur þar sem Inh-GAPLA verður <0.05) í fyrstu tilrauninni. Ef Inh-GAPLA fellur ekki niður fyrir 0,05 við hæsta styrk í fyrstu keyrslu er X-VIVO™ 15 stofnlausnin tilreidd með hæsta styrknum í fyrstu keyrslunni. Styrkur CV05 er reiknaður út með því að deila styrk stofnlausnarinnar í fyrstu keyrslu með þynningarstuðlinum fyrir CV05 (X) (þynningarstuðull CV05 (X); sá þynningarstuðull sem þarf til að þynna stofnlausn niður í CV05) (sjá viðbæti 3.5). Að því er varðar prófunaríðefni sem eru ekki uppleysanleg í X-VIVO™ 15 við 20 mg/ml er CV05 ákvarðað með styrk stofnlausnar  $\times 1/X$ . Fyrir keyrslur 2 til 4 er tilreidd önnur stofnlausn með styrkleikann  $4 \times CV05$  (viðbætur 3.5).
20. Raðþynningar annarrar X-VIVO™ 15 stofnlausnarinnar eru tilreiddar með þynningarstuðlinum 1,5 og notaður er 96 holu greiningarbakki. Næst er 50 µl/holu af þynntri lausn bætt við 50 µl af frumusviflausn í holer 96 holu bakka með flatrí botnplötu. Hver styrkleiki hvers prófunaríðefnis skal prófaður í 4 holum. Síðan eru sýnin blönduð á bakkahristara og sett í ræktun í 16 klst. við 37 °C og 5% koltvísýring (CO<sub>2</sub>) og eftir það er lúsíferasavirknin mæld eins og lýst er hér á eftir.
21. Samanburður með leysi er blanda af 50 µl/holu af X-VIVO™ 15 og 50 µl/holu af frumusviflausn í RPMI-1640 sem inniheldur 10% nautgripafósturssermi.
22. Jákvæður samanburður, sem mælt er með, er 4-nítróbensýlbrómíð. Tuttugu mg af 4-nítróbensýlbrómíði eru tilreidd í 1,5 ml örskilvinduglasi og X-VIVO™ 15 bætt við upp í 1 ml. Glasinu er hringsnúið kröftuglega og hrist á snúði, á hraða sem er í mesta lagi 8 snún./mín., í a.m.k. 30 mínútur. Eftir skiljun við 20 000g í 5 mínútur er flotíð þynnt, með stuðlinum 4, með X-VIVO™ 15 og 500 µl af þynnta flotinu færðir yfir í holer í 96 holu greiningarbakka. Þynnta flotíð er þynnt enn frekar með X-VIVO™ 15, með stuðlunum 2 og 4, og 50 µl af lausninni er bætt í 50 µl af THP-G8-frumusviflausn í holum í 96 holu bakka með flatrí botnplötu (viðbætur 3.6). Hver styrkleiki jákvæða samanburðarins skal prófaður í 4 holum. Bakkinn er hristur á bakkahristara og settur í ræktun í CO<sub>2</sub>-ræktunarkassa í 16 klst. (37 °C, 5% koltvísýringur (CO<sub>2</sub>)) og eftir það er lúsíferasavirknin mæld eins og lýst er í 29. lið.
23. Neikvæður samanburður, sem mælt er með, er mjólkursýra. Tuttugu mg af mjólkursýru eru tilreidd í 1,5 ml örskilvinduglasi og X-VIVO™ 15 bætt við upp í 1 ml (20 mg/ml). Tuttugu mg/ml af mjólkursýrulausn eru þynnt með X-VIVO™ 15, með stuðlinum 5 (4 mg/ml); 500 µl af þessari 4 mg/ml mjólkursýrulausn eru færðir yfir í holer í 96 holu greiningarbakka. Þessi lausn er þynnt með X-VIVO™ 15, með stuðlinum 2, og síðan þynnt aftur með stuðlinum 2 til að fá 2 mg/ml og 1 mg/ml lausnir. Fimmtíu µl af þessum þremur lausnum og samanburði með burðarefni (X-VIVO™ 15) er bætt við 50 µl af THP-G8-frumusviflausn í holer á 96 holu bakka með flatrí botnplötu. Hver styrkleiki neikvæða samanburðarins er prófaður í 4 holum. Bakkinn er hristur á bakkahristara og settur í ræktun í CO<sub>2</sub>-ræktunarkassa í 16 klst. (37 °C, 5% koltvísýringur (CO<sub>2</sub>)) og eftir það er lúsíferasavirknin mæld eins og lýst er í 29. lið.
24. Nota má aðra heppilega jákvæða eða neikvæða samanburði ef rannsóknarsöguleg gögn eru tiltæk til að leiða út samanburðarhæfar viðmiðanir fyrir ásættanlegar keyrslur.
25. Þess skal gætt að forðast uppgufun rokgjarnra prófunaríðefna og víxlmengun prófunaríðefna milli hola, t.d. með því að hylja bakkann fyrir ræktunina með prófunaríðefnunum.
26. Prófunaríðefni og samanburður með leysi útheimta 2 til 4 keyrslur til að leiða út jákvæða eða neikvæða spá (sjá töflu 2). Hver keyrsla er gerð á mismunandi degi með nýrri stofnlausn prófunaríðefnisins X-VIVO™ 15 og frumum sem eru heimtar meðan þær eru ósamfelldar. Frumur mega vera úr sömu umsáningu.

**Mælingar á virkni lúsíferasa**

27. Ljómun er mæld með örbakkaljósmæli með 96 holum sem er búinn ljóssíum, t.d. Phelios (ATTO, Tokyo, Japan), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Þýskaland) og ARVO-röðin (PerkinElmer, Waltham, MA, Bandaríkin). Kvarða skal ljósmælinn fyrir hvert próf til að tryggja samanburðarnákvæmni (19. heimild). Raðbrigða-lúsíferasar, sem senda frá sér appelsínugulan og rauðan lit, eru fáanlegir fyrir þessa kvörðun.
28. Hundrað  $\mu$ l af forhituðu Tripluc®-prófefni fyrir lúsíferasagreiningu (Tripluc) eru færðir yfir í hverja holu á bakka sem inniheldur frumsviflausn sem er meðhöndluð með eða án íðefnis. Bakkin er hristur í 10 mínútur við umhverfishita sem nemur u.þ.b. 20 °C. Bakkin er settur í ljósmælinn til að mæla lúsíferasavirknina. Lífljómun er mæld í 3 sekúndur án ljóssíunnar (F0) og með ljóssíunni (F1). Færa skal rök fyrir því ef annars konar fyrirkomulag er notað, t.d. notkun á annarri tegund ljósmælis.
29. Breytur fyrir hvern styrk eru reiknaðar út frá mældum gildum, t.d. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, meðaltal  $\pm$ SD fyrir IL8LA, meðaltal  $\pm$ SD fyrir GAPLA, meðaltal  $\pm$ SD fyrir nIL8LA, meðaltal  $\pm$ SD fyrir Ind-IL8LA, meðaltal  $\pm$ SD fyrir Inh-GAPLA, og 95% öryggisbil fyrir Ind-IL8LA. Skilgreiningar á breytunum sem eru notaðar í þessum lið eru gefnar í viðbættum 3.1 og 3.4.
30. Áður en mæling hefst er yfirleitt hægt að sundurgreina liti í fjöllum vísigensprófum með því að nota skynjara (ljósmæli og bakkalesara), sem er búinn ljóssíum, s.s. síum með skarpru afmörkun (e. *sharp-cut*) (langbylgju- eða stuttbylgjusúr (e. *long-pass/short-pass*)) eða bandsíum. Kvarða skal framferðarstuðla fyrir síurnar fyrir hvert lífljómunarlitmerki áður en prófunin er framkvæmd, samkvæmt viðbætti 3.2.

**GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF****Mat á gögnum**

31. Viðmiðanir fyrir jákvæða/neikvæða ákvörðun útheimta að í hverri keyrslu:
- sé spá með IL-8 Luc-prófi metin jákvæð ef prófunaríðefni er með Ind-IL8LA 1,4 og lægri mörkin fyrir 95% öryggisbilið fyrir Ind-IL8LA 1,0,
  - sé spá með IL-8 Luc-prófi metin neikvæð ef prófunaríðefni er með Ind-IL8LA <1,4 og/eða lægri mörkin fyrir 95% öryggisbilið fyrir Ind-IL8LA <1,0.

**Spálíkan**

32. Prófunaríðefni, sem gefa tvær jákvæðar niðurstöður í fyrstu, annarri, þriðju eða fjórðu keyrslu, eru greind sem jákvæð en þau sem gefa þrjár neikvæðar niðurstöður í fyrstu, annarri, þriðju eða fjórðu keyrslu eru greind sem „talin neikvæð“ (tafla 2). Í hópi efna, sem talin eru neikvæð, eru íðefni, sem leysast upp í 20 mg/ml af X-VIVO™ 15, metin sem neikvæð en ekki skal taka með íðefni sem leysast ekki upp í 20 mg/ml af X-VIVO™ 15 (mynd 1).

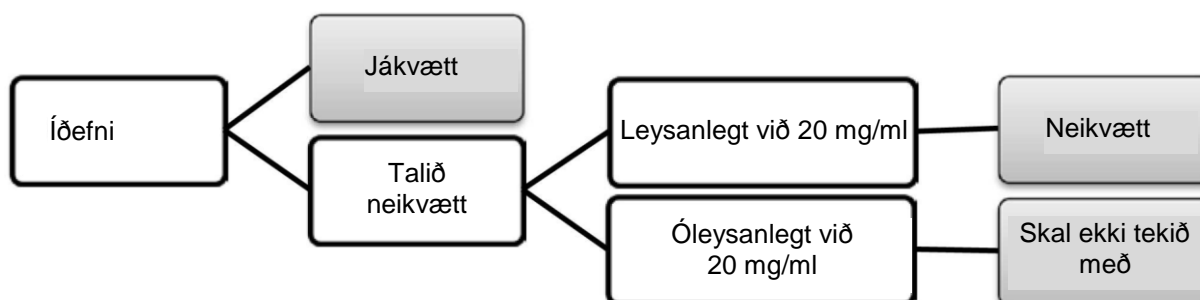
Tafla 2

## Viðmiðanir til að greina jákvæðar niðurstöður og niðurstöður sem eru taldar neikvæðar

Fyrsta keyrsla	Önnur keyrsla	Þriðja keyrsla	Fjórða keyrsla	Endanleg spá	
Jákvæð	Jákvæð	—	—	Jákvæð	
	Neikvæð	Jákvæð	—	Jákvæð	
		Neikvæð	Jákvæð	Jákvæð	
		Neikvæð	Neikvæð	Talin neikvæð	
Neikvæð	Jákvæð	Jákvæð	—	Jákvæð	
		Neikvæð	Jákvæð	Jákvæð	
		Neikvæð	Neikvæð	Talin neikvæð	
	Neikvæð	Jákvæð	Jákvæð	Jákvæð	Jákvæð
		Neikvæð	Neikvæð	Talin neikvæð	
		Neikvæð	—	Talin neikvæð	

Mynd 1

## Spálíkan fyrir endanlegt mat



## Samþykktarviðmiðanir

33. Eftirfarandi samþykktarviðmiðanir skulu uppfylltar þegar IL-8 Luc-próf er notað.

- Ind-IL8LA skal vera yfir 5,0 í a.m.k. einum styrkleika af jákvæða samanburðinum 4-nítróbensýlbrómíði í hverri keyrslu.
- Ind-IL8LA skal vera undir 1,4 í sérhverjum styrkleika af neikvæða samanburðinum mjólkursýru í hverri keyrslu.

- Gögnum úr bökkum, þar sem GAPLA í samanburðarholum með frumum og Tripluc en án íðefna er innan við fimmfalt lægra en í holu sem inniheldur einungis prófunaræti (50 µl/holu af RPMI-1 640 sem inniheldur 10% nautgripafósturssermi og 50 µl/holu af X-VIVO™ 15), skal hafnað.
- Gögnum úr bökkum þar sem Inh-GAPLA allra styrkleika prófunarinnar eða viðmiðunaríðefna er minna en 0,05 skal hafnað. Í því tilviki skal endurtaka fyrstu prófunina þannig að hæsti lokastyrkur endurteknu prófunarinnar sé lægsti lokastyrkur fyrri prófunarinnar.

#### Prófunarskýrsla

34. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

#### *Prófunaríðefni*

Efni með einum efnisþætti:

- Efnafræðileg sanngreining s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-númer, SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla og/eða aðrar auðkenningar.
- Útlit, vatnsleysni, sameindabýngd og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli, að því marki sem unnt er.
- Hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.
- Meðhöndlun fyrir prófun, ef við á (t.d. hitun, mölun).
- Leysni í X-VIVO™ 15. Að því er varðar íðefni sem eru óleysanleg í X-VIVO™ 15, hvort útfelling eða flot koma fram eftir skiljun.
- Styrkur eða styrkleikar sem eru prófaðir.
- Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.
- Rökstuðningur fyrir vali á leysi/burðarefni fyrir hvert prófunaríðefni ef X-VIVO™ 15 var ekki notað.

Fjölpáttæfni, UVCB-efni og blanda:

- Lýsing á eiginleikum eins og kostur er, t.d. með efnakenni (sjá hér að framan), hreinleika, magnbundu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli (sjá hér að framan), að því marki sem unnt er.

- Útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli, að því marki sem unnt er.
- Sameindabýngd eða sýndarsameindarþýngd ef um er að ræða blöndur/fjölliður af þekktri samsetningu eða aðrar upplýsingar sem skipta máli fyrir framkvæmd rannsóknarinnar.
- Meðhöndlun fyrir prófun, ef við á (t.d. hitun, mölun).
- Leysni í X-VIVO™ 15. Að því er varðar íðefni sem eru óleysanleg í X-VIVO™ 15, hvort útfelling eða flot koma fram eftir skiljun.
- Styrkur eða styrkleikar sem eru prófaðir.
- Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.
- Rökstuðningur fyrir vali á leysi/burðarefni fyrir hvert prófunaríðefni ef X-VIVO™ 15 var ekki notað.

#### *Samanburður*

##### Jákvæður samanburður:

- Efnafraðileg sanngreining s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-númer, SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla og/eða aðrar auðkenningar.
- Útlit, vatnsleysni, sameindabýngd og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli, að því marki sem unnt er.
- Hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.
- Meðhöndlun fyrir prófun, ef við á (t.d. hitun, mölun).
- Styrkur eða styrkleikar sem eru prófaðir.
- Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.
- Tilvísanir í rannsóknarsögulegar niðurstöður fyrir jákvæðan samanburð sem sýna viðeigandi samþykktarviðmiðanir, ef við á.

##### Neikvæður samanburður:

- Efnafraðileg sanngreining s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-númer og/eða aðrar auðkenningar.
- Hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.

- Útlit, sameindabýngd og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli, ef aðrir neikvæðir samanburðir eru notaðir en þau sem getið er um í viðmiðunarreglum um prófanir og að því marki sem unnt er.
- Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.
- Rökstuðningur fyrir vali á leysi fyrir hvert prófunaríðefni.

#### *Prófunarskilyrði*

- Heiti og heimilisfang bakhjarls, prófunarstöðvar og rannsóknarstjóra.
- Lýsing á prófuninni sem er notuð.
- Frumulína sem er notuð, skilyrði við geymslu hennar og uppruni (t.d. frá hvaða starfsstöð hún var fengin).
- Lotunúmer og uppruni nautgripafósturssermis, lotunúmer 96 holu bakka með flatrí botnplötu og lotunúmer Tripluc-prófefnis.
- Fjöldi umsáninga og frumupéttleiki sem eru notuð við prófun.
- Frumutalningaráðferð sem er notuð fyrir sáningu áður en prófað er og ráðstafanir sem gerðar eru til að tryggja einsleita dreifingu frumufjöldans.
- Ljósmaelir sem er notaður (t.d. tegund), þ.m.t. tækjastillingar, lúsíferasahvarfefni sem er notað og sýnt fram á viðeigandi ljómunarmælingar, byggt á samanburðarprófuninni sem lýst er í 3.2. viðbæti.
- Verklagið sem er notað til að sýna fram á hæfni rannsóknarstofunnar til að framkvæma prófun (t.d. með prófun á hæfnisefnum) eða til að sýna fram á samanburðarnákvæma framkvæmd prófunarinnar yfir lengri tíma.

#### *Prófunaraðferð*

- Fjöldi samhliða prófana og keyrslna sem eru framkvæmdar.
- Styrkur prófunaríðefnis, íbætingaraðferð og váhrifatími (ef frábrugðið því sem mælt er með).
- Lýsing á þeim matsviðmiðunum og viðmiðunum fyrir ákvarðanir sem eru notaðar.
- Lýsing á viðmiðunum fyrir samþykkt rannsóknar sem eru notaðar,
- Lýsing á öllum breytingum á prófunaraðferðinni.

*Niðurstöður*

- Mælingar á IL8LA og GAPLA.
- Útreikningar á nIL8LA, Ind-IL8LA, og Inh-GAPLA.
- 95% öryggisbil fyrir Ind-IL8LA.
- Línurit sem sýnir skammtasvörunarferla fyrir vakningu lúsíferasavirkni og lífvænleika.
- Lýsing á öðrum athugunum sem skipta máli, ef við á.

*Umfjöllun um niðurstöðurnar*

- Umfjöllun um niðurstöðurnar sem fást með IL-8 Luc-prófinu.
- Athugun á niðurstöðum prófsins með skírskotun til samþættrar aðferðar við prófun og mat ef aðrar upplýsingar sem skipta máli eru tiltækar.

*Ályktun***HEIMILDIR**

- 1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci* 124:359-69.
- 2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Aðgengilegt á: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- 3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Aðgengilegt á: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- 4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Aðgengilegt á: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.

- 5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:371-9.
- 6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29:1 816-30.
- 7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71:337-51.
- 8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Alternatives to laboratory animals: ATLA* 38:275-84.
- 9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? *Regul Toxicol Pharmacol*, 82:147-155.
- 10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. *Chem Biol* 17:646-57.
- 11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>.
- 12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. *Biochem Biophys Res Commun* 280:1 286-91.
- 13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. *Biochemistry* 38:8 271-9.
- 14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. *Biotechniques* 38:891-4.
- 15) OECD (2017). To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, France



- 16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Paris, France.
- 17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Aðgengilegt á: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD\\_Final\\_Draft\\_GIVIMP.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf).
- 18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Aðgengilegt á: [http://www.jacvam.jp/en\\_effort/effort02.html](http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html).
- 19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochem Photobiol* 86:1 046-9.
- 20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OECD, Paris, France.
- 21) United Nations (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Aðgengilegt á: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev05/05files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html).

## Viðbætur 3.1

## SKILGREININGAR

**Nákvæmni:** Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktu viðmiðunargildi niðurstaða úr prófun er. Þetta er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferða og einn þáttur gildis. Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli réttra niðurstaðna úr prófun (16. heimild).

**Ferli neikvæðra afleiðinga (AOP):** Röð atburða, frá efnafræðilegri byggingu markíðefnis, eða hóps svipaðra íðefna, um sameindaræsingu að niðurstöðu, sem miðað er við, í lífi (20. heimild).

**Íðefni:** Efni eða blanda.

**CV05:** Lífvænleiki frumna 0,5, þ.e. lágmarksstyrkleiki þar sem íðefni sýna minna en 0,05 af Inh-GAPLA.

**FInSLO-LA:** Skammstöfun sem er notuð í fullgildingarskýrslunni og í fyrri útgáfum, að því er varðar IL-8 Luc-prófið, til að vísa til Ind-IL8LA. Sjá skilgreiningu í Ind-IL8LA.

**GAPLA:** Virkni SLR-lúsíferasa (Stable Luciferase Red) (hámark = 630 nm) sem er stýrt af GAPDH-stýrli og sýnir fram á lífvænleika frumna og fjölda lífvænlegra frumna.

**Hætta:** Sá eðlislægi eiginleiki efnis eða aðstæðna að geta valdið skaðlegum áhrifum þegar lífvera, kerfi eða (undir)hópur kemst í snertingu við það efni.

**Samþætt aðferð við prófun og mat (IATA):** Skipulögð aðferð sem er notuð til hættugreiningar (hugsanlegrar), hættulýsingar (máttur) og/eða öryggismats (hugsanleg(ur)/máttur og váhrif) á íðefnum eða hópi íðefna, sem samþættar og vegur skipulega öll gögn sem skipta máli til grundvallar eftirlitsákvörðunum sem varða hugsanlega hættu og/eða áhættu og/eða þörf á nákvæmari og þar af leiðandi færri prófunum

**II-SLR-LA:** Skammstöfun sem er notuð í fullgildingarskýrslunni og í fyrri útgáfum, að því er varðar IL-8 Luc-prófið, til að vísa til Inh-GAPLA. Sjá skilgreiningu í Inh-GAPLA.

**IL-8 (hvítfrumuboði-8):** Frumuboði, sem er fenginn frá innþekjufrumum, trefjakímfrumum, hyrnisfrumum, gleypifrumum og einkjörnungum, sem veldur efnatogi daufkyrninga og T-eitilfrumna.

**IL8LA:** Virkni SLO-lúsíferasa (Stable Luciferase Orange) (hámark = 580 nm) sem er stýrt af IL-8-stýrli.

**Ind-IL8LA:** Margfeldi vakningar nIL8LA. Það fæst með því að deila í nIL8LA fyrir THP-G8-frumur, sem eru meðhöndlaðar með íðefnum, með nIL8LA fyrir THP-G8-frumur sem eru ekki örvaðar og sýnir örvun á virkni IL-8-stýrils af völdum íðefna.

**Inh-GAPLA:** Hömlun GAPLA. Þetta fæst með því að deila í GAPLA fyrir THP-G8, sem er meðhöndlað með íðefnum, með GAPLA fyrir ómeðhöndlað THP-G8 og sýnir frumueiturhrif íðefna.

**Lægstu örvunarmörk (MIT):** lægsti styrkur þar sem íðefnið uppfyllir jákvæðar viðmiðanir.

**Blanda:** Blanda eða lausn tveggja eða fleiri efna.

**Efni með einum efnisþætti:** Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi að a.m.k. 80% (massahlutfall).

**Fjölþáttaefni:** Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem fleiri en einn af aðalefnisþáttunum er fyrir hendi í styrk sem nemur  $\geq 10\%$  (massahlutfall) og  $< 80\%$  (massahlutfall). Fjölþáttaefni er afleiðing af framleiðsluferli. Mismunurinn á blöndu og fjölþáttaefni er sá að blandan fæst með blöndun tveggja eða fleiri efna án efnahvarfs. Fjölþáttaefni er afleiðing af efnahvarfi.

**nIL8LA:** Virkni SLO-lúsíferasa sem endurspeglar virkni IL-8-stýrils (IL8LA), stöðluð með virkni SLR-lúsíferasa sem endurspeglar virkni GAPDH-stýrils (GAPLA). Þetta sýnir virkni IL-8-stýrils eftir að tekið hefur verið tillit til lífvænleika frumna eða frumufjölda.

**nSLO-LA:** Skammstöfun sem er notuð í fullgildingarskýrslunni og í fyrri útgáfum, að því er varðar IL-8 Luc-prófið, til að vísa til nIL8LA. Sjá skilgreiningu í nIL8LA.

**Jákvæður samanburður:** Samskonar sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis og er meðhöndlað með efni sem vitað er að framkallar jákvæða svörun. Til að tryggja að hægt sé að meta breytileika í svörun jákvæða samanburðarins yfir tíma skal þessi jákvæða svörun þó ekki vera of kröftug.

**Ólífrænt umbreyttir meðvakar:** Íðefni sem verða næmandi efni með ummyndun án tilstillis lífvera.

**Lífrænt umbreyttir meðvakar:** Íðefni sem þurfa ensímvirkjun til að hafa húðnæmingarmátt.

**Gildi:** Lýsing á sambandi prófunarinnar og áhrifanna, sem miðað er við, og hvort sambandið hefur merkingu og er gagnlegt miðað við tiltekinn tilgang. Gildið lýsir því að hvaða marki prófunin nær að mæla rétt eða spá fyrir um líffræðilegu áhrifin sem miðað er við. Gildi felur í sér umfjöllun um nákvæmni (samsvörun) prófunar (16. heimild).

**Áreiðanleiki:** Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma prófun með samanburðarnákvæmni hjá hverri rannsóknarstofu og hjá mismunandi rannsóknarstofum yfir lengri tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Áreiðanleiki er metinn með því að reikna út einsetursamanburðarnákvæmni og fjölsetra samanburðarnákvæmni og einsetursendurtekningarnákvæmni (16. heimild).

**Keyrsla:** Keyrsla samanstendur af einu eða fleirum prófunaríðefnum sem eru prófuð samskiða með samanburði með leysi/burðarefni og með jákvæðum samanburði.

**Næmi:** Hlutfall allra jákvæðra/virkra íðefna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Þetta er mælikvarði á nákvæmni prófunar sem gefur aðrættarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunar (16. heimild).

**SLO-LA:** Skammstöfun sem er notuð í fullgildingarskýrslunni og í fyrri útgáfum, að því er varðar IL-8 Luc-prófið, til að vísa til IL8LA. Sjá skilgreiningu í IL8LA.

**SLR-LA:** Skammstöfun sem er notuð í fullgildingarskýrslunni og í fyrri útgáfum, að því er varðar IL-8 Luc-prófið, til að vísa til GAPLA. Sjá skilgreiningu í GAPLA.

**Samanburður með leysi/burðarefni:** Ómeðhöndlað sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis nema prófunaríðefnið en með leysinum/burðarefninu sem er notað. Hann er notaður til að ákvarða grunnviðmiðunarsvörun fyrir sýni sem eru meðhöndluð með prófunaríðefni sem er uppleyst í eða myndar stöðuga dreifilausn í sama leysi/burðarefni. Þegar þetta sýni er prófað með samskeiða samanburðarsýni með æti sýnir það einnig fram á hvort leysirinn/burðarefnið víxlverkar við prófunarkerfið.

**Sértæki:** Hlutfall allra neikvæðra/óvirkra íðefna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Þetta er mælikvarði á nákvæmni prófunar sem gefur aðráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunar (16. heimild).

**Efni:** Frumefni og efnasambönd þeirra, náttúruleg eða fengin með framleiðsluferli, þ.m.t. öll aukefni, sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika vörunnar og öll óhreinindi sem verða til í vinnslunni en þó ekki leysar sem skilja má frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess.

**Yfirborðsvirkt efni:** Efni, s.s. þvotta- og hreinsiefni, sem getur minnkað yfirborðsspennu vökva og gerir því þannig kleift að freyða eða ganga inn í fast efni; efnið er einnig þekkt sem blotefni. (TG437)

**Prófunaríðefni:** Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari aðferð.

**THP-G8:** Frumulína með vísigenið IL-8 sem er notuð í IL-8 Luc-prófinu. Gleypifrumulík (e. *macrophage-like*) frumulína úr mönnum, THP-1, sem er innleidd með lúsíferasagenunum SLO og SLR, undir stjórn IL-8- og GAPDH-stýrsla, eftir því sem við á.

**Hnattsamræmt kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK SP):** Kerfi til flokkunar íðefna (efna og blandna), samkvæmt stöðluðum tegundum og stigum eðlisrænnar hættu, heilbrigðishættu og umhverfishættu, sem tekur til samsvarandi hættuboðsatriða, s.s. skýringarmynda, viðvörunarorða, hættusetninga, varnaðarsetninga og öryggisblaða til að miðla upplýsingum um skaðleg áhrif þeirra til verndar fólki (þ.m.t. vinnuveitendur, starfsmenn, flytjendur, neytendur og bráðaliðar) og umhverfinu (21. heimild).

**UVCB-efni:** efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.

Fullgild prófunaraðferð: Prófun sem telst hafa fullnægjandi gildi og áreiðanleika í tilteknum tilgangi og sem byggist á vísindalega traustum meginreglum. Prófun er aldrei fullkomlega algild, einungis í tengslum við skilgreindan tilgang.

## Viðbætur 3.2

## MEGINREGLA FYRIR MÆLINGU Á LÚSÍFERASAVIRKNI OG ÁKVÖRÐUN Á FRAMFERÐARSTUÐLUM LJÓSSÍU FYRIR SLO OG SLR

Hægt er að nota Tripluc, greiningarkerfi til að greina mörg vísigen, ásamt ljósmæli fyrir örbakka með fjölliða greiningarkerfi sem unnt er að búa ljóssíu (t.d. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Ljóssían, sem er notuð í mælingunni, er 600–620 nm löng langbylgju- eða stuttbylgjusía eða 600–700 nm bandsía.

**Mæling á lúsíferasa með tveimur litum með ljóssíu**

Þetta er dæmi með notkun Phelios AB-2350 (ATTO). Þessi ljósmælir er búinn 600 nm langbylgjusíu (R60 HOYA Co., 600 nm LP, Filter 1) til að skipta ljómuninni milli SLO (hámark = 580 nm) og SLR (hámark = 630 nm).

Til að ákvarða framferðarstuðla fyrir 600 nm langbylgjusíu er byrjað á að mæla, með því að nota hreinsuð SLO- og SLR-lúsíferasaensím, i. lífljómunarstyrk SLO og SLR án síu (F0) og ii. lífljómunarstyrk SLO og SLR sem fór í gegnum 600 nm langbylgjusíu (Filter 1) og iii. reikna út framferðarstuðla fyrir 600 nm langbylgjusíu fyrir SLO og SLR eins og tilgreint er hér á eftir.

Framferðarstuðlar	Skammstöfun	Skilgreining	
SLO	„Filter 1“ framferðarstuðlar	$=\kappa_{OR60}$	Framferðarstuðull síunnar fyrir SLO
SLR	„Filter 1“ framferðarstuðlar	$\kappa_{RR60}$	Framferðarstuðull síunnar fyrir SLR

Þegar styrkleiki fyrir SLO og SLR í prófunarsýninu er skilgreindur sem O og R, eftir því sem við á, er i. styrkleika ljóss án síu (allt ljós), F0, og ii. styrkleika ljóss sem fer í gegnum 600 nm langbylgjusíu („Filter 1“), F1, lýst hér á eftir.

$$F0=O+R$$

$$F1=\kappa_{OR60} \times O + \kappa_{RR60} \times R$$

Þessar formúlur er hægt að umorða sem hér segir:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa_{OR60} & \kappa_{RR60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Síðan er hægt að reikna út O- og R-gildin, með því að nota útreiknaða gegnfararhlutfallsstuðla ( $\kappa_{OR60}$  og  $\kappa_{RR60}$ ) og mæld gildi F0 og F1, sem hér segir:

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

### Efni og aðferðir til að ákvarða gegnfararhlutfallsstuðla

#### 1) Prófefni

Hreinsað lúsíferasaensím:

Frostþurrkað hreinsað SLO-ensím

Frostþurrkað hreinsað SLR-ensím

(sem voru fengin, vegna fullgildingarstarfsins, frá GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan með THP-G8-frumulínu)

Prófefni fyrir greiningu:

Tripluc®-prófefni fyrir lúsíferasagreiningu (t.d. frá TOYOBO Cat#MRA-301)

Æti: fyrir lúsíferasagreiningu (30 ml, geymt við 2–8 °C)

Prófefni	Styrkur	Lokastyrkur í æti	Tilskilið magn
RPMI-1640	—	—	27 ml
Nautgripafósturssermi	—	10%	3 ml

#### 2) Tilreiðsla ensímlausnar

Frostþurrkað, hreinsað lúsíferasaensím er leyst upp í tilraunaglassi með því að bæta í það 200 µl af 10 ~ 100 mM Tris/vetnisklóríði eða Hepes/vetnisklóríði (pH-gildi 7.5 ~ 8.0) með viðbættu 10% (massi miðað við rúmmál) glýseróli, ensímlausninni er skipt niður í 10 µl deiliskammta í 1,5 ml einnota tilraunaglös og sett í frysti við -80 °C. Hægt er að nota frystu ensímlausnina í allt að 6 mánuði. Þegar hún er notuð er 1 ml af lúsíferasagreiningaræti (RPMI-1640 með 10% nautgripafósturssermi) bætt í hvert tilraunaglas, sem inniheldur ensímlausnina (þynnt ensímlausn), og þau geymd á ís til að koma í veg fyrir óvirkjun.

#### 3) Lífljómunarmæling

Tripluc® prófefni fyrir lúsíferasagreiningu (Tripluc) er afþitt og geymt við stofuhita, annaðhvort í vatnsbaði eða við umhverfishita. Setja skal ljósmælinn í gang 30 mínútum áður en mæling er hafin til að ljósmagnarinn verði stöðugur. Hundrað µl af þynntu ensímlausninni eru færðir yfir í svartan 96 holu bakka (flatbotna) (SLO-viðmiðunarsýnið í #B1, #B2, #B3, SLR-viðmiðunarsýnið í #D1, #D2, #D3). Síðan eru 100 µl af forhituðu Tripluc færðir með pípettu yfir í hverja holu á bakka sem inniheldur þynntu ensímlausnina. Bakkinn er hrstur í 10 mínútur við stofuhita (u.þ.b. 25 °C) með því að nota bakkahristara. Ef loftbólur koma fram í lausnunum í holunum eru þær fjarlægðar. Bakkinn er settur í ljósmælinn til að mæla lúsíferasavirknina. Lífljómun er mæld í 3 sekúndur án ljóssfunnar (F0) og með ljóssfunni (F1).

Framferðarstuðull ljóssíunnar var reiknaður út sem hér segir:

Framferðarstuðull (SLO ( $\kappa_{OR60}$ ))= (#B1 við F1+ #B2 við F1+ #B3 við F1)/(#B1 við F0+ #B2 við F0+ #B3 við F0)

Framferðarstuðull (SLR ( $\kappa_{RR60}$ ))= (#D1 við F1+ #D2 við F1+ #D3 við F1)/(#D1 við F0+ #D2 við F0+ #D3 við F0)

Útreiknaðir gegnfararhlutfallsstuðlar eru notaðir fyrir allar mælingar sem eru framkvæmdar með því að nota sama ljósmæli.

#### **Gæðaeftirlit með búnaði**

Nota skal verklagið sem lýst er í IL-8 Luc-aðferðarlýsingunni (18. heimild).

## Viðbætur 3.3

## HÆFNISEFNI

Áður en prófunin, sem lýst er í þessum viðbæti við prófunaraðferð B.71, er tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur sýna fram á tæknilega hæfni sína með því að fá þá spá sem búist er við með IL-8 Luc-greiningunni fyrir hæfnisefni 9, sem mælt er með í töflu 1, og með því að fá fram gildi sem falla innan viðkomandi viðmiðunarbils fyrir a.m.k. 8 af hæfnisefnunum 9 (valin sem dæmigerð fyrir svörunarsvið húðnæmingarhættu). Aðrar valviðmiðanir voru þær að efnin eru fánæg á almennum markaði og að hágæða tilvísunargögn um rannsóknir *í lífi*, sem og um rannsóknir *í glasi* sem verða til með IL-8 Luc-greiningunni, eru tiltæk. Birt tilvísunargögn eru einnig tiltæk fyrir IL-8 Luc-greininguna (6. og 1. heimild).

Tafla 1

## Efni sem mælt er með til að sýna fram á tæknilega hæfni í tengslum við IL-8 Luc-greininguna

Hæfnisefni	CAS-númer	Eðlisástand	Leysni í X-VIVO15 við 20 mg/ml	Spá í lífi <sup>(1)</sup>	IL-8 Luc-spá <sup>(2)</sup>	Viðmiðunarbíl (µg/ml) <sup>(3)</sup>	
						CV <sub>05</sub> <sup>(4)</sup>	IL-8 Luc MIT <sup>(5)</sup>
2,4-dínítróklóróbensen	97-00-7	Fast efni	Óleysanlegt	Næmir (mjög sterkur)	Jákvæð	2,3–3,9	0,5–2,3
Formaldehýð	50-00-0	Vökvi	Leysanlegt	Næmir (sterkur)	Jákvæð	9–30	4–9
2-merkaptóbensóþíasól	149-30-4	Fast efni	Óleysanlegt	Næmir (meðalsterkur)	Jákvæð	250-290	60–250
Etylendíamín	107-15-3	Vökvi	Leysanlegt	Næmir (meðalsterkur)	Jákvæð	500-700	0,1–0,4
Etylenglykóldímetakrylát	97-90-5	Vökvi	Óleysanlegt	Næmir (vægur)	Jákvæð	> 2000	0,04–0,1
4-allýlanísól (estragól)	140-67-0	Vökvi	Óleysanlegt	Næmir (vægur)	Jákvæð	> 2000	0,01–0,07
Streptómýsínsúlfat	3810-74-0	Fast efni	Leysanlegt	Ekki næmir	Neikvæð	> 2000	> 2000
Glýseról	56-81-5	Vökvi	Leysanlegt	Ekki næmir	Neikvæð	> 2000	> 2000
Ísóprópanól	67-63-0	Vökvi	Leysanlegt	Ekki næmir	Neikvæð	> 2000	> 2000

Skammstafanir: CAS-númer = Skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um íðefni

<sup>(1)</sup> Máttur *í lífi* er fenginn með því að nota viðmiðanirnar sem lagðar eru til hjá Evrópumíðstöð rannsókna á umhverfiseiturhrifum og eiturefnafræði (ECETOC) (19. heimild).

<sup>(2)</sup> Byggt á sögulegum mældum gildum (1. og 6. heimild).

<sup>(3)</sup> CV<sub>05</sub> og IL-8 Luc MIT (lægstu örvunarmörk) voru reiknuð út með því að nota vatnsleysni sem fékkst með EPI Suite™.

<sup>(4)</sup> CV<sub>05</sub>: lágmarksstyrkleiki þar sem íðefni sýna minna en 0,05 af Inh-GAPLA.

<sup>(5)</sup> MIT (lægstu örvunarmörk): lægsti styrkur þar sem íðefnið uppfyllir jákvæðar viðmiðanir.



## Viðbætur 3.4

## STUÐLAR OG MATSVIÐMIÐANIR

**nIL8LA (nSLO-LA)**

J-unda endurtekningin ( $j = 1-4$ ) fyrir  $i$ -unda styrkleikann ( $i = 0-11$ ) er mæld fyrir IL8LA (SLO-LA) og GAPLA (SLR-LA), eftir því sem við á. Staðlað IL8LA, sem er nefnt nIL8LA (nSLO-LA), er skilgreint sem:

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

Þetta er grunnmælieiningin í þessu prófi.

**Ind-IL8LA (FInSLO-LA)**

Ind-IL8LA, sem er  $x$ -föld aukning meðaltals nIL8LA-gildisins (nSLO-LA) fyrir endurtekningu á  $i$ -unda styrkleika, samanborið við samsvarandi gildi fyrir 0-styrkleikann, er grundvallarmælingin í þessu prófi. Þetta hlutfall er skrifað með eftirfarandi formúlu:

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

Rannsóknarstofan sem leiddi rannsóknina, hefur lagt það til að gildi sem nemur 1,4 samsvari jákvæðri niðurstöðu fyrir prófaða íðefnið. Þetta gildi er byggt á rannsókn á rannsóknarsögulegum gögnum rannsóknarstofunnar sem leiddi rannsóknina. Síðan notaði gagnastjórnunarhópur þetta gildi í öllum áföngum fullgildingarrannsóknarinnar. Meginniðurstaðan, Ind-IL8LA, er hlutfall tveggja meðaltala eins og sýnt er í jöfnunni.

**95% öryggisbil**

Hægt er að áætla 95% öryggisbil, byggt á hlutfallinu, til að sýna nákvæmni þessarar niðurstöðu grundvallarmælingarinnar. Lægri mörk 95% öryggisbilsins  $\geq 1$  benda til þess að nIL8LA með  $i$ -unda styrk sé marktækt hærra en það sem fæst með samanburði með leysi. Það eru nokkrar leiðir til að ákvarða 95% öryggisbilið. Notuð var aðferð sem er þekkt sem „Fieller's theorem“ í þessari rannsókn. Þessi kenning um 95% öryggisbil fæst með eftirfarandi formúlu:

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

Þar sem

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0},$$

$$B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y},$$

$$C = \bar{y}_i^2 - t_{0,975(v)}^2 \times \frac{sd_{y_i}^2}{n_{y_i}}, \text{ og } n_0 = 4,$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j n_{iL8LA_{0j}},$$

$$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (n_{iL8LA_{0j}} - \bar{x}_0)^2,$$

$$n_{y_i} = 4,$$

$$\bar{y}_i = (1/n_{y_i}) \times \sum_j (n_{iL8LA_{ij}}),$$

$$sd_{y_i}^2 = \{1/(n_{y_i} - 1)\} \times \sum_j (n_{iL8LA_{ij}} - \bar{y}_i)^2.$$

$t_{0,975(v)}$  er 97,5 hundraðshluta mark fyrir miðlæga t-dreifingu með frítöluna  $v$ , þar sem

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

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

Inh-GAPLA er hlutfall meðaltalsins fyrir GAPLA (SLR-LA) fyrir endurtekningu á  $i$ -unda styrkleika, samanborið við samsvarandi gildi fyrir samanburð með leysi, og er skrifað á eftirfarandi hátt:

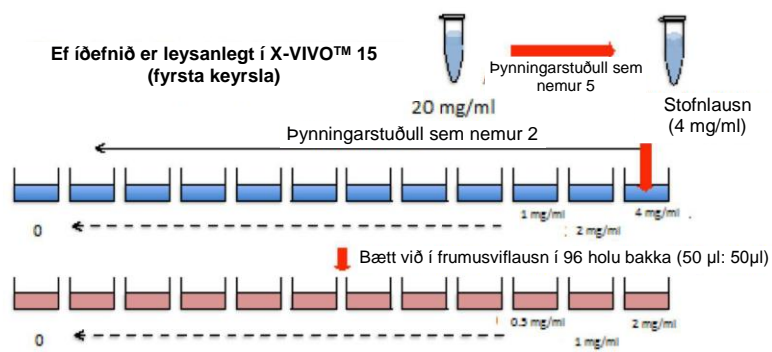
$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

Þar eð GAPLA er nefnari fyrir  $n_{iL8LA}$  veldur mjög lágt gildi miklum breytileika á  $n_{iL8LA}$ . Þess vegna er e.t.v. hægt að líta á  $Inh - GAPLA$ -gildi með mjög lágu gildi  $Inh - GAPLA$  (minna en 0,05) sem mjög ónákvæm.

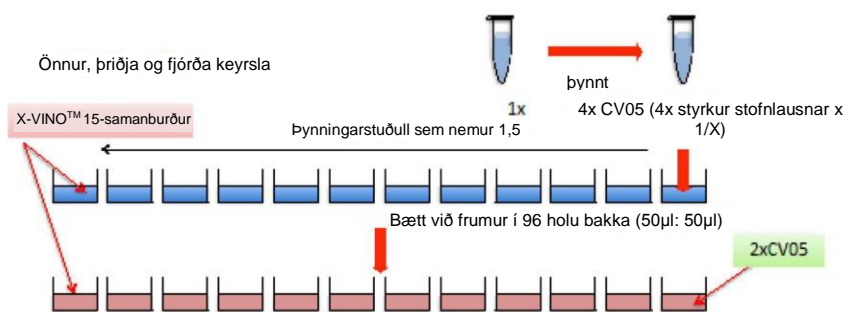
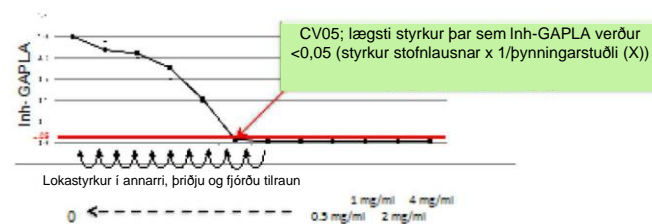
## Viðbætur 3.5

## YFIRLIT YFIR AÐFERÐIR TIL AÐ LEYSA UPP ÍÐEFNI FYRIR IL-8 LUC-PRÓFID

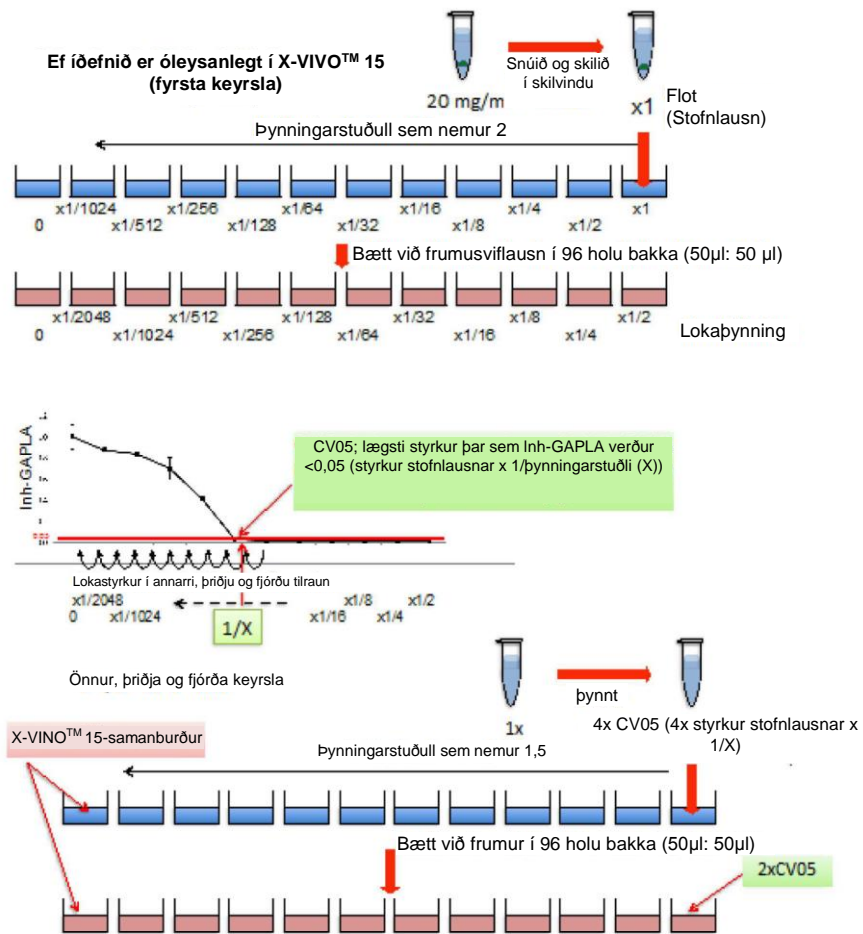
a) Að því er varðar íðefni sem eru leysanleg í X-VIVO™ 15 við 20 mg/ml



Hæsti styrkur í eftirfarandi tilraunum er ákvarðaður



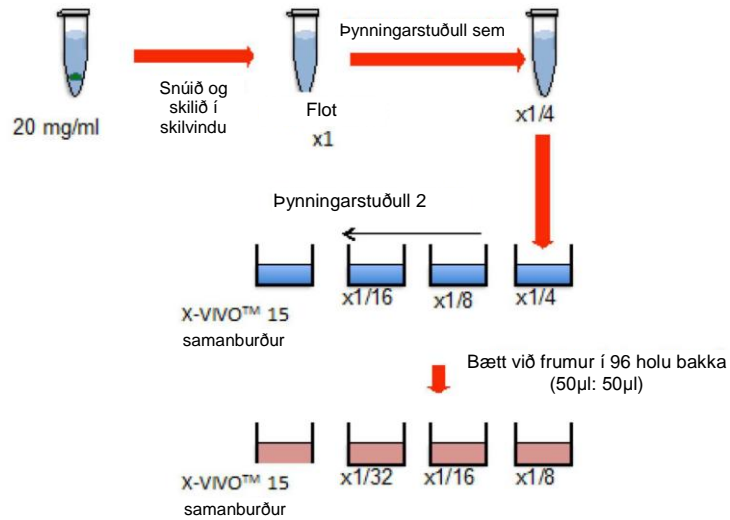
b) Að því er varðar íðefni sem eru óleysanleg í X-VIVO™ 15 við 20 mg/ml



## Viðbætur 3.6

YFIRLIT YFIR AÐFERÐINA TIL AÐ LEYSA UPP 4-NÍTRÓBENSÝLBRÓMÍÐ FYRIR JÁKVÆÐAN SAMANBURÐ FYRIR IL-8 LUC-PRÓFIÐ

Jákvæður samanburður: 4-nítrobensýlbrómíð  
(óleysanlegt í X-VIVO™ 15)





5. Prófunaraðferðin var fyrst og fremst hönnuð til að greina áhrifin frá einu efni. Ef þörf er á að prófa blöndu í eftirlitsskyni skal þó skoða hvort hún geti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi.
6. Áður en prófunin hefst er mikilvægt að búa yfir upplýsingum um eðlisefnafræðilega eiginleika prófunaríðfnisins, einkum til að unnt sé að framleiða stöðugar íðefnalausnir. Einnig er nauðsynlegt að vera með greiningaraðferð með nægilegu næmi til að sannreyna styrkleika prófunaríðfnis.

#### MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

7. Prófunin hefst á því að kynþroska hængar og hrygnur eru látin verða fyrir váhrifum (a.m.k. 12 vikur eftir frjóvgun) í undaneldispörum í 3 vikur en á þessu tímabili dreifist prófunaríðefnið í lífverunum af foreldrakynslóðinni (F0-kynslóðin) samkvæmt eitruhrvarfafræðilegri hegðun þess. Eins nálægt fyrsta degi fjórðu viku og er mögulegt er hrognunum safnað til að koma F1-kynslóðinni af stað. Meðan eldi F1-kynslóðarinnar stendur yfir (samþals 15 vikur) eru klakgeta og lifun metin. Að auki er tekið sýni úr fiskinum 9–10 vikum eftir frjóvgun m.t.t. endapunkta þroskunar og hrygning er metin í þrjár vikur, frá 12. til og með 14. viku eftir frjóvgun. F2-kynslóðinni er komið af stað eftir þriðju viku æxlunarmatsins og hún alin þangað til klaki er lokið.

#### GILDISVIÐMIÐANIR PRÓFUNAR

8. Eftirfarandi viðmiðanir eiga við fyrir gildisviðmiðanir prófunar:

- Styrkur uppleysts súrefnis skal vera  $\geq 60\%$  af mettunargildi lofts í allri prófuninni.
- Meðalhiti vatns allan tímann meðan rannsóknin stendur yfir skal vera á bilinu 24 til 26 °C. Stutt frávik frá meðaltalinu í einstaka kerjum skal ekki vera meira en 2 °C.
- Meðalfrjósemismáttur samanburðarhópa í hverri kynslóð (F0-kynslóðinni og F1-kynslóðinni) skal vera yfir 20 hrogn á dag á hvert par. Frjósemi allra hroгна, sem hrygnt er meðan matið stendur yfir, skal vera yfir 80%. Þar að auki skulu 16 af tillögðum 24 undaneldispörum í samanburðinum ( $> 65\%$ ) hrygna yfir 20 hrognum á dag á hvert par.
- Klakgeta hroгна skal vera yfir 80% (meðaltal) í samanburðinum (hjá hverri F1-kynslóð og F2-kynslóð).
- Lifun eftir klak þangað til 3 vikum eftir frjóvgun og frá því 3 vikum eftir frjóvgun og þangað til F1-kynslóðin er aflifuð (þ.e. 15 vikum eftir frjóvgun) skal vera  $\geq 80\%$  (meðaltal) og  $\geq 90\%$  (meðaltal), eftir því sem við á, í samanburðinum (F1-kynslóðin).
- Sönnunargögn skulu liggja fyrir til að sýna fram á að styrkleikum prófunaríðfnisins í lausn hafi verið viðhaldið á fullnægjandi hátt innan  $\pm 20\%$  af meðaltali mæligilda.

Að því er varðar vatnshitastig, þó að það sé ekki gildisviðmiðun, skulu samhliða prófanir innan meðferðar ekki vera tölfræðilega ólíkar hver annarri og meðferðarhópar innan prófunar skulu ekki vera tölfræðilega ólíkir hver öðrum (byggt á daglegum mælingum á hitastigi og að undanskildum stuttum frávikum).

9. Þó að minni fjölgun kunni að koma fram í hópum sem verða fyrir meiri váhrifum skal fjölgunin vera nægileg í a.m.k. hópnum sem fær þriðja stærsta skammtinn og öllum hópum af F0-kynslóðinni, sem fá minni skammta, til að fylla klakkassana. Enn fremur skal lifun fósturvísu í hópnum sem fær þriðja stærsta skammtinn og hópum af F1-kynslóðinni, sem fá minni skammta, vera nægileg til að unnt sé að meta endapunktana við sýnatöku úr svo til fullvöxnum fiskum (sjá 36. og 38. lið og 9. viðbæti). Þar að auki skal lifun eftir klak a.m.k. ná lágmarkinu ( $\sim 20\%$ ) í þeim hópi af F1-kynslóðinni sem fær næststærsta skammtinn. Þetta eru ekki gildisviðmiðanir sem slíkar heldur ráðleggingar til að unnt sé að reikna út trausta styrkleika sem hafa engin merkjanleg áhrif.

10. Ef frávik frá gildisviðmiðunum prófunarinnar koma fram skal athuga afleiðingarnar í tengslum við áreiðanleika prófunarniðurstaðnanna og þessi frávik og atriði skulu koma fram í prófunarskýrslunni.

#### LÝSING Á AÐFERÐINNI

##### **Búnaður**

11. Venjulegur rannsóknarstofubúnaður og einkum eftirfarandi:

- a) súrefnis- og sýrustigsmælar,
- b) búnaður til að ákvarða hörku vatns og basavirkni,
- c) fullnægjandi tæki til að stýra hita, helst með stöðugri vöktun,
- d) tankar úr efnafræðilega óvirku efni og hæfilega stórir miðað við ráðlagt hleðsluhlutfall og þéttleika (sjá 3. viðbæti),
- e) nægilega nákvæm vog (þ.e. nákvæmni upp á  $\pm 0,5$  mg).

##### **Vatn**

12. Nota má hvers kyns vatn sem prófunarvatn svo fremi prófunartegundin sýni þar nægilega lifun og vöxt til langs tíma. Gæði vatnsins skulu vera stöðug allan prófunartímann. Til að tryggja að þynningarvatnið hafi ekki óæskileg áhrif á niðurstöður prófunarinnar (t.d. með því að mynda efnaflóka með prófunaríðefninu) eða að það hafi ekki skaðleg áhrif á undaneldisstofninn skal taka sýni til greiningar með reglulegu millibili. Mælingar á þungmálmum (t.d. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), helstu plúsjónum og mínusjónum (t.d. Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), varnarefnum, heildarmagni lífræns kolefnis og svifagna skulu t.d. gerðar á sex mánaða fresti ef vitað er að þynningarvatnið er tiltölulega stöðugt að gæðum. Nokkrir efnaeiginleikar viðunandi þynningarvatns eru tilgreindir í 2. viðbæti. pH-gildi vatnsins skal vera á bilinu 6,5– 8,5 en í hverri prófun skal frávik þess ekki vera meira en  $\pm 0,5$  pH-stig.

##### **Váhrifakerfi**

13. Hönnun og efni sem eru notuð í váhrifakerfið eru ekki tilgreind. Nota skal gler, ryðfrítt stál eða annað efnafræðilega óvirkt efni til að smíða prófunarkerfi sem hefur ekki verið mengað í fyrri prófunum. Að því er varðar þessa prófun má hentugt váhrifakerfi samanstanda af kerfi með samfelldu gegnumstreymi (4.–13. heimild).

##### **Prófunarlausnir**

14. Stofnlausn prófunaríðefnisins skal sett í váhrifakerfið með viðeigandi dælu. Kvarða skal streymi stofnlausnarinnar í samræmi við greiningarlega staðfestingu á prófunarlausnunum áður en váhrif hefjast og mæla rúmmál hennar reglulega meðan prófunin stendur yfir. Prófunarlausnin í hverju hólfi er endurnýjuð á fullnægjandi hátt (t.d. að lágmarki 5 rúmmálsendurnýjanir/dag og allt að 16 rúmmálsendurnýjanir/dag eða streymi allt að 20 ml/mín), með hliðsjón af stöðugleika prófunaríðefnisins og vatnsgæðum.



15. Prófunarlausnir af þeim styrkleikum, sem valdir eru hverju sinni, fást með því að þynna stofnlausn. Heppilegast er að tilreiða stofnlausnina með því að prófunaríðefninu sé einfaldlega blandað, eða það sé hrist, saman við þynningarvatnið á vélrænan hátt (t.d. með hræri- og/eða úthljóðsbúnaði). Nota má mettunarsúlur/-kerfi eða hlutlaus skömmtunarkerfi (14. heimild) til að búa til stofnlausn af hæfilegum styrk. Reyna skal eftir megni að forðast leysa eða burðarefni sökum þess að: 1) tilteknir leysar geta sjálfir leitt til eiturrhifa og/eða óæskilegra eða óvæntra viðbragða, 2) prófanir á íðefnum ofan við vatnsleysni þeirra (eins og getur oft gerst með notkun leysa) geta leitt til ónákvæmra ákvarðana á hrifstyrk, 3) notkun á leysum í lengri prófunum getur leitt til verulegrar „örveruþekju“ tengdri örveruvirkni og getur haft áhrif á umhverfisaðstæður sem og getu til að viðhalda váhrifastyrkleikum og 4) ef rannsóknarsöguleg gögn sem sýna fram á að leysirinn hafi ekki áhrif á niðurstöður rannsóknarinnar eru ekki fyrir hendi útheimtir notkun leysa samanburðarmeðferð með leysi sem hefur áhrif á velferð dýra þar eð þörf er á viðbótardýrum til að framkvæma prófunina. Að því er varðar íðefni sem er erfitt að gera prófanir á er hægt að nota leysi sem síðasta úrræði og fletta skal upp í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um prófanir í vatni á eiturrhifum íðefna og blandna, sem erfitt er að gera prófanir á (e. OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures) (15. heimild) til að ákvarða bestu aðferðina. Val á leysi ákvarðast af efnafæðilegum eiginleikum prófunaríðefnisins og tiltækileika rannsóknarsögulegra gagna um notkun leysisins. Ef leysar er notaðir sem burðarefni skal meta viðeigandi samanburðarprófanir með leysi til viðbótar við samanburðarprófanir án leysis (neikvæðar) (einungis þynningarvatn). Ef til þess kemur að ekki er hægt að komast hjá því að nota leysi og örveruvirkni (örveruþekja) verður til er mælt með því að skrá/gefa skýrslu um örveruþekjuna í hverjum tanki (a.m.k. vikulega) í allri prófuninni. Helst ætti að halda styrk leysisins stöðugum í samanburðinum með leysi og öllum prófunarmeðferðunum. Ef styrk leysis er ekki haldið stöðugum skal nota hæsta styrk leysisins í prófunarmeðferðinni í samanburðinum með leysi. Í tilvikum þar sem leysir er notaður sem burðarefni skal hámarksstyrkur leysis ekki fara yfir 100 µl/l eða 100 mg/l (15. heimild) og mælt er með því að halda styrk leysisins eins lágum og unnt er (t.d. <20 µl/l) til að komast hjá hugsanlegum áhrifum leysisins á mældu endapunkta (16. heimild).

### Tilraunadýr

#### *Val á fiskum og eldi fiskanna*

16. Prófunartegundin er japanskur rískarpi, *Oryzias latipes*, vegna þess að lífsferill hans er stuttur og mögulegt er að ákvarða erfðafæðilegt kyn hans. Þó að unnt sé að laga aðrar litlar fisktegundir að svipaðri aðferðarlýsingu prófunar eiga sértækar aðferðir og athugunarendapunktur, sem eru útlustuð í þessari prófunaraðferð, einungis við um japanskan rískarpa. Auðvelt er að fá japanskan rískarpa til að æxlast í haldi; birtar aðferðir eru fyrir hendi varðandi ræktun hans (17.–19. heimild) og gögn eru tiltæk úr prófunum varðandi banvæn áhrif til skamms tíma, prófunum á fyrri stigum lífs og heildarlífsferlisprófunum (5.–6. heimild, 8.–9. heimild og 20. heimild). Öllum fiskum er haldið við ljóslotu með birtu í 16 klst. og myrkur í 8 klst. Fiskurinn er fóðraður á lifandi saltvatnsrækjulirfum, *Artemia* spp., en hægt er að bæta við fóðri í flögum, sem fæst á almennum markaði, ef nauðsyn krefur. Greina skal fóður í flögum, sem fæst á almennum markaði, reglulega m.t.t. aðskotaefna.
17. Svo fremi sem viðeigandi búskaparháttum er fylgt er ekki gerð krafa um sérstaka aðferðarlýsingu ræktunar. Til dæmis er hægt að ala japanskan rískarpa í 2 l tönkum með 240 fiskseiði í hverjum tanki þangað til 4 vikum eftir frjóvgun, þá er hægt að ala þá í 2 l tönkum með 10 fiskum í hverjum tanki þangað til 8 vikum eftir frjóvgun en þá er þeim skipt upp í undaneldispör í 2 l tönkum.

#### *Aðlögun og val á fiskum*

18. Prófunarfiskur skal valinn úr einum rannsóknarstofustofni sem hefur verið aðlagður í a.m.k. tvær vikur fyrir prófunina við skilyrði þar sem gæði vatns og lýsing eru svipuð því sem verður í prófuninni (Ath: þetta aðlögunartímabil er ekki staðbundið tímabil á undan váhrifum). Mælt er með því að prófunarfiskur sé fenginn úr innanhúsræktun því flutningur á fullvöxnum fiskum er streituvaldandi og getur haft áhrif á áreiðanlega hrygningu. Fóðra skal fiskinn tvisvar á dag á saltvatnsrækjulirfum allan eldistímamann og meðan váhrifafasinn stendur yfir og bæta við fóðri í flögum, sem fæst á almennum markaði, ef nauðsyn krefur. Að lágmarki 42 undaneldispör (54 undaneldispör er þörf er á samanburði með leysi, að hluta til vegna skorts á rannsóknarsögulegum gögnum til að stýðja notkun samanburðar án leysis eingöngu) eru talin nauðsynleg til að hefja þessa prófun til að tryggja fullnægjandi samhliða prófun. Þar að auki skal sannprófa að hvert undaneldispar af F0-kynslóðinni sé XX-XY (þ.e. eðlilegur fjöldi kynlitninga hjá hvoru kyni) til að komast hjá því að ekki séu með sjálfsprottnir XX hængar (sjá 39. lið).
19. Meðan aðlögunarfasinn stendur yfir skal skrá dauðsföll fiskum í ræktuninni og beita eftirfarandi viðmiðunum í kjölfar 48 klst. tímabils meðan þeir koma sér fyrir:

— Dánartíðni meiri en 10% af ræktunarstofninum á sjö dögum fyrir flutning í prófunarkerfið: hafna skal allri lotunni.

- Dánartíðni milli 5% og 10% af stofninum á sjö dögum fyrir flutning í prófunarkerfið: aðlögun í sjö daga til viðbótar við tveggja vikna aðlögunartímabilið; ef dánartíðnin er meiri en 5% á næstu sjö dögum: hafna skal allri lotunni.
  - Dánartíðni innan við 5% af stofninum á sjö dögum fyrir flutning í prófunarkerfið: lotan er ásættanleg.
20. Ekki skal meðhöndla fiskinn við sjúkdómum á tveggja vikna aðlögunartímabilinu fyrir prófunina og meðan váhrifatímabilið stendur yfir og komast skal algerlega hjá sjúkdómsmeðferð ef unnt er. Ekki skal nota fisk með klínísk einkenni sjúkdóms í rannsókninni. Viðhalda skal skrá yfir athuganir og hvers konar meðferðir sem varða sjúkdómsvarnir eða sjúkdóma meðan ræktunartímabilið fyrir prófunina stendur yfir.
21. Koma skal váhrifafasanum af stað með fullvöxnum fiskum með kynbundna tvíbreytni og erfðafræðilega kyngreindir úr rannsóknarstofubirgðum af dýrum sem eru kynþroska og ræktuð við  $25 \pm 2$  °C. Fiskarnir skulu auðkenndir sem staðfest kynbótadýr (þ.e. sem hafa eignast lífvænleg afkvæmi) í vikunni fyrir váhrif. Þyngd einstakra fiska af hvoru kyni í öllum hópnum, sem er notaður í prófuninni, skal í upphafi prófunar haldið innan við  $\pm 20\%$  frá meðalþyngd sama kyns. Hlutaúrtak af fiskinum skal vegið fyrir prófunina til að áætla meðalþyngdina. Valinn fiskur skal vera a.m.k. 12 vikna eftir frjóvgun og þyngd hrygnanna skal vera  $\geq 300$  mg og hænganna  $\geq 250$  mg.

#### TILHÖGUN PRÓFUNAR

##### Prófunarstyrkleikar

22. Mælt er með að nota fimm íðefnastyrkleika ásamt samanburði eða samanburðum. Taka skal allar upplýsingaveitur með í reikninginn þegar styrkbil prófunarstyrkleika er valið, þ.m.t. megindleg venzl efnabyggingar og virkni, ályktun út frá byggingarlega hliðstæðum efnum, niðurstöður úr prófunum á fiskum, s.s. greiningar á bráðum eiturrhifum (kafla C.1 í þessum viðauka), skammtíma æxlunarrannsókn á fiskum (kafla C.48 í þessum viðauka) og aðrar prófunaraðferðir, t.d. kaflar C.15, C.37, C.41, C.47 eða C.49 í þessum viðauka (21.–26. heimild) ef þeir liggja fyrir, eða ef nauðsyn krefur, úr skammtastærðaprófun sem getur náð yfir æxlunarfasa. Ef þörf krefur má framkvæma skammtastærðaprófun við svipuð skilyrði (vatnsgæði, prófunarkerfi, hleðsla dýra) og þau sem eru notuð við endanlega prófun. Ef notkun leysis er nauðsynleg og engin rannsóknarsöguleg gögn eru tiltæk er hægt að nota skammtastærðaprófun til að ákvarða hentugleika leysis. Hæsti prófunarstyrkur skal ekki fara yfir vatnsleysnina 10 mg/l eða 1/10 af miðgildisbanastyrk í 96 klst. (LC50) (27. heimild). Lægsti styrkurinn skal vera 10 til 100 sinnum lægri en hæsti styrkurinn. Notkun á fimm styrkleikum í þessari prófun gerir ekki einungis kleift að mæla tengsl milli skammts og svörunar heldur einnig minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC) og styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) sem eru nauðsynlegir fyrir áhættumat í nokkrum reglukerfum eða lögsögum. Almennt er bilstuðullinn milli nafnstyrkleika prófunaríðefnisins milli aðliggjandi meðferðargilda  $\leq 3.2$ .

##### Samhliða prófanir innan meðferðar- og samanburðarhópa

23. Nota skal að lágmarki sex hólf samhliða prófana á hvern prófunarstyrkleika (sjá 7. viðbæti). Meðan æxlunarfásinn stendur yfir (að F0-kynslóðinni undanskilinni) er samsetning samhliða prófunar tvöfölduð til að meta frjósemismátt og í hverri samhliða prófun er einungis eitt undaneldispar (sjá 42. lið).
24. Keyra skal samanburðarprófun með þynningarvatni og, ef þörf krefur, samanburðarprófun með leysi til viðbótar við prófunarstyrkleikana. Nota skal tvöfalt fleiri hólf samhliða prófana fyrir samanburðina til að tryggja viðeigandi tölfræðilegan styrk (þ.e. nota skal a.m.k. 12 samhliða prófanir fyrir samanburðina). Meðan æxlunarfásinn stendur yfir er fjöldi samhliða prófana í samanburðinum tvöfaldaður (þ.e. að lágmarki 24 samhliða prófanir og í hverri samhliða prófun er einungis eitt þörunarpar). Eftir æxlun skulu samhliða prófanir fyrir samanburðina ekki innihalda fleiri en 20 fósturvíska (fiska).

#### VERKFERLI

##### Upphaf prófunar

25. Fullvaxinn, kynþroska fiskur, sem er notaður til að koma F0-kynslóðinni af stað í prófuninni, er valinn á grundvelli tveggja viðmiðana: aldurs (yfirleitt meira en 12 vikum eftir frjóvgun en ekki er mælt með að fara yfir 16 vikur eftir frjóvgun) og þyngdar (skal vera  $\geq 300$  mg fyrir hrygnur og  $\geq 250$  mg fyrir hænga).

26. Þör hrygna og hænga sem uppfylla ofangreindar viðmiðanir eru flutt í stökum pörum í hvern tank samhliða prófunar, þ.e. 12 samhliða prófanir í samanburðum og 6 samhliða prófanir í íðefnameðferðum við upphaf prófunarinnar. Þessum tönkum er ráðað í meðferð af handahófi (t.d. T1-T5 og samanburður) og samhliða prófun (t.d. A-L í samanburði og A-F í meðferð) og síðan komið fyrir í váhrifakerfi með viðeigandi flæði í hverjum tanki.

#### Váhrifaskilyrði

27. Fullfrágengna samantekt á prófunarmælipáttum og skilyrðum er að finna í 3. viðbæti. Með því að fylgja þessum nákvæmu skilgreiningum ættu endapunkturagildi samanburðarfiskanna að vera svipuð þeim sem eru tilgreind í 4. viðbæti.
28. Meðan prófunin stendur yfir skal mæla uppleyst súrefni, sýrustig og hitastig í a.m.k. einu prófunarkeri í hverjum meðferðarhóp og samanburði. Þessar mælingar, að undanskildu hitastigi, skal a.m.k. framkvæma einu sinni í viku allt váhrifatímabilið. Meðalhiti vatns allan tímann meðan rannsóknin stendur yfir skal vera á bilinu 24 til 26 °C í allri prófuninni. Hitastigið skal mælt daglega allt váhrifatímabilið. pH-gildi vatnsins skal vera á bilinu 6,5– 8,5 en í hverri prófun skal frávik þess ekki vera meira en  $\pm 0,5$  pH-stig. Samhliða prófanir innan meðferðar skulu ekki vera tölfræðilega ólíkar hver annari og meðferðarhópar innan prófunar skulu ekki vera tölfræðilega ólíkir hver öðrum (byggt á daglegum mælingum á hitastigi og að undanskildum stuttum frávikum).

#### Tími sem váhrif standa yfir

29. Í prófuninni standa váhrif á kynþroska fiska af F0-kynslóðinni yfir í þrjár vikur. Í viku 4, á u.þ.b. 24. degi, er F1-kynslóðinni komið á fót og undaneldispör af F0-kynslóðinni eru aflífud á mannúðlegan hátt og þyngd og lengd skráð (sjá 34. lið). Þessu er fylgt eftir með því að láta F1-kynslóðina verða fyrir váhrifum í 14 vikur til viðbótar (samtsals 15 vikur hjá F1-kynslóðinni) og F2-kynslóðina í tvær vikur fram að klaki. Heildartímalengd prófunarinnar er yfirleitt 19 vikur (þ.e. fram að klaki F2-kynslóðar). Tímalínur fyrir prófunina koma fram í töflu 2 og eru útskýrðar á ítarlegri hátt í 9. viðbæti.

#### Fóðrunarfyrirkomulag

30. Hægt er að fódra fiskinn að vild á saltvatnsrækjum, *Artemia* spp. (24 klst. gamlar krabballirfur), og bæta við fóðri í flögum, sem fæst á almennum markaði, ef nauðsyn krefur. Fóður í flögum, sem fæst á almennum markaði, skal greint reglulega m.t.t. aðskotaefna, s.s. klórlífrænna varnarefna, fjölhringa, arómatískra vetniskolefna og fjölkloráðra bifenylna (PCB-efni). Forðast skal fóður með hækkuð gildi innkirtlavirkra efna (þ.e. plöntuestrógena) sem gætu teft svörun rannsóknarinnar í tvísýnu. Fjarlægja skal óetið fóður og saurefni úr prófunarkerjunum eins og þörf krefur, t.d. með því að hreinsa botn hvers tanks vandlega með vökvasugu. Einnig skal þrifa hliðar og botn hvers tanks einu sinni eða tvísvar í viku (t.d. með því að skafa með spaða). Dæmi um fóðrunaráætlun er að finna í 5. viðbæti. Fóðurmagn byggist á fjölda fiska í hverri samhliða prófun. Þess vegna er dregið úr magni fóðurs ef dauðsföll verða í samhliða prófun.

#### Magngreiningar og mælingar

31. Áður en váhrifatímabilið hefst skal tryggja að íðefnagjafabúnaður starfi rétt. Allar greiningaraðferðir sem þörf er á skulu staðfestar, þ.m.t. að fullnægjandi þekking sé á efnafræðilegum stöðugleika í prófunarkerfinu. Meðan prófunin stendur yfir er styrkur prófunariðefnisins ákvarðaður með hæfilegu millibili, helst a.m.k. í hverri viku í einni samhliða prófun fyrir hvern meðferðarhóp, og skipt á milli samhliða prófana í sama meðferðarhópnum vikulega.
32. Meðan prófunin stendur yfir skal kanna streymi þynningar- og stofnlausnar með reglulegu millibili til samræmis við það (t.d. að lágmarki þrisvar í viku). Mælt er með því að niðurstöðurnar séu byggðar á mældum styrkleikum. Ef styrk prófunariðefnis í lausn hefur verið haldið á fullnægjandi hátt innan  $\pm 20\%$  af meðaltali mæligilda í allri prófuninni mega niðurstöðurnar þó annaðhvort grundvallast á nafngildum eða mældum gildum. Ef um er að ræða íðefni sem safnast merkjanlega upp í fiski geta prófunarstyrkleikarnir minnkað eftir því sem fiskurinn stækkar. Í slíkum tilvikum er mælt með því að endurnýjunartíðni prófunarlausnarinnar í hverju hólf sé aðlöguð til að halda prófunarstyrkleikum eins stöðugum og unnt er.

### ***Athuganir og mældir endapunktur***

33. Mældir endapunktur eru m.a. frjósemismáttur, frjósemi, klak, vöxtur og lifun til að meta hugsanleg áhrif á stofninn. Einnig skal framkvæma atferlisathuganir daglega og skrá óvenjulegt atferli af öllu tagi. Aðrir endapunktur gangvirkis eru m.a. mRNA vítellógeníns í lifur eða vítellógenínprótingildi (VTG) með ónæmismælingu (28. heimild), svipfarsleg kyneinkenni s.s. einkennandi totumyndun á raufarugga hænga, mat á kyni á grundvelli vefja úr kynkirtlum og vefjafraðilegt mat á nýrum, lifur og kynkirtli (sjá skrá yfir endapunkta í töflu 1). Allir þessir sértæku endapunktur eru metnir í tengslum við ákvörðun á erfðafraðilegu kyni einstaklingsins sem byggist á því hvort genið dmy, sem ákvarðar karlkyn japansks rískarpa, er fyrir hendi eða ekki (sjá 41. lið). Þar að auki er tíminn fram að hrygningu einnig metinn. Að auki er hægt að leiða út einföld svipfarsleg kynjahlutföll með því að nota upplýsingar úr talningu á raufaruggatöfum til að skilgreina svipgerð einstakra japanska rískarpa sem annaðhvort karlkyns eða kvenkyns. Ekki er búist við að þessi prófunaraðferð greini smávægileg frávik frá því kynjahlutfalli sem búist er við vegna þess að tiltölulega fáir fiskar í hverri samhliða prófun koma ekki til með að veita nægan tölfraðilegan styrk. Meðan vefjameinafraðilegt mat stendur yfir er kynkirtillinn einnig metinn og mun öflugri greiningar til að meta svipfar kynkirtilsins í tengslum við erfðafraðilegt kyn eru framkvæmdar.
34. Megintilgangur þessarar prófunaraðferðar er að meta möguleg stofntengd áhrif prófunaríðefnis. Endapunktur gangvirkis (VTG, annars stigs kyneinkenni (SSC) og tiltekin vefjameinafraðileg áhrif á kynkirtla) geta einnig aðstoðað við að ákvarða hvort einhver áhrif af völdum innkirtlatruflandi efna komi fram. Þessir endapunktur gangvirkis geta þó einnig orðið fyrir áhrifum af altækum eiturhrifum og öðrum eiturhrifum. Af þessum sökum má einnig gera nákvæmt vefjameinafraðilegt mat á lifur og nýrum til að stuðla að betri skilningi á hvers konar viðbrögðum í endapunktum gangvirkisins. Ef þetta ítarlega mat er ekki framkvæmt skal þó samt sem áður skrá og gera grein fyrir stórsæjum afbrigðileika sem kemur í ljós meðan vefjameinafraðilegt mat stendur yfir.

### ***Aflifun fiska á mannúðlegan hátt***

35. Þegar váhrifum á F0-kynslóðina og F1-kynslóðina lýkur og þegar tekið er hlutaúttak af svo til fullvöxnum fiskum skal aflífa fiskana með viðeigandi magni af svæfingarlausn (t.d. tríkaínmetansúlfónati, MS-222 (CAS-nr. 886-86-2), jafnað með 300 mg/l af NaHCO<sub>3</sub> (natríumbíkarbónat, CAS-nr. 144-55-8) til að draga úr ertingu í slímhúð. Ef fiskar sýna merki um talsverðar þjáningar (mjög alvarlegar og hægt er að segja með vissu til um dauða þeirra) og eru taldir dauðvona skal svæfa og aflífa dýrin og meðhöndla það sem dánartölur í gagnagreiningunni. Ef fiskur er aflífaður vegna sjúkdómstilviks skal skrá það og gera grein fyrir því. Unnt er að geyma fiska til vefjameinafraðilegrar greiningar (fiskurinn er festur til að vefjameinafraðigreining sé möguleg), háð því hvenær í rannsókninni fiskurinn er aflífaður.

### ***Meðhöndlun hrogna og fiskseiða***

#### *Söfnun hrogna frá undaneldispörum til að rækta næstu kynslóð*

36. Söfnun hrogna fer fram á fyrsta degi (eða á fyrstu tveimur dögum ef þörf krefur) í prófunarviku 4 til að fara úr F0-kynslóðinni í F1-kynslóðina og í prófunarviku 18 til að fara úr F1-kynslóðinni í F2-kynslóðina. Prófunarvika 18 samsvarar F1-kynslóðinni, fullvaxinn fiskur 15 vikum eftir frjóvgun. Mikilvægt er að fjarlægja öll hrogn úr hverjum tanki daginn áður en hrognasöfnun hefst til að tryggja að öll hrogn, sem er safnað frá undaneldispörum, séu úr einni hrygningu. Eftir hrygningu geyma japanskur rískarpahrygnur hrognin stundum nálægt þarfaganginum þangað til unnt er að losa þau á undirlag. Ef ekkert undirlag er fyrir hendi í tanknum eru hrognin annaðhvort áföst hrygnunum eða á botni tanksins. Annaðhvort eru hrognin fjarlægð varlega af hrygnunni eða sogin upp frá botninum, allt eftir staðsetningu þeirra, í prófunarviku 4 hjá F0-kynslóðinni og prófunarviku 18 hjá F1-kynslóðinni. Öll hrogn sem er safnað innan meðferðar eru hópuð áður en þeim er dreift í ræktunarhólf.
37. Fjarlægja skal hrognþræðina (e. *egg filament*) sem halda hrognum í goti saman. Frjóvguðum hrognum (allt að 20) er safnað frá hverju undaneldispari (eitt par í hverri samhliða prófun), þau eru hópuð innan meðferðar og þeim dreift á kerfisbundinn hátt í hentug ræktunarhólf (6. og 7. viðbætur). Með krufningarsmásjá af góðum gæðum er hægt að sjá merki um snemmbúna frjóvgun/þroskun, s.s. að frjóvgunarhimnan (æðabelgurinn) þykknar, áframhaldandi frumuskiptingu eða að kimblaðra myndast. Setja má ræktunarhólfin í aðskilið „ræktunarker“ sem er sett upp fyrir hverja meðferð (í því tilviki verður að mæla vatnsgæðabreytur og styrk prófunaríðefnis í þeim) eða í ker samhliða prófunar þar sem klakin seiði (t.d. kviðpokaseiði) verða geymd. Ef þörf er á öðrum söfnunardegi fyrir hrogn (prófunardagur 23) skal hópa öll hrognin frá báðum dögum og dreifa þeim síðan á kerfisbundinn hátt í hverja samhliða prófun meðferðarinnar.

*Eldi hrogna að klaki*

38. Frjónvguð hrogn eru hrist stöðugt, t.d. í hrognaræktunarkassanum, með loftbólum eða með því að láta hann sveiflast lóðrétt. Dánartíðni hjá frjónvguðum hrognum (fósturvísunum) er athuguð og skráð daglega. Dauð hrogn eru fjarlægð úr ræktunarkössunum (9. viðbætur). Á 7. degi eftir frjónvgun er hristingunni hætt eða dregið úr henni þannig að frjónvguðu hrognin setjast á botninn í ræktunarkassanum. Þetta ýtir undir klak, yfirleitt á næstu einum til tveimur dögum. Nýklakin hrogn (ungseiði; kviðpokaseiði) eru talin (á grundvelli hópaðra samhliða prófana) fyrir hverja meðferð og samanburð. Frjónvguð hrogn sem hafa ekki klakist út þegar tvöfalt lengri tími en miðgildisdagurinn er liðinn í samanburðarhópnum (yfirleitt 16 eða 18 vikum eftir frjónvgun) teljast ólífvænleg og er fleygt.
39. Tólf nýklakin hrogn eru flutt í hvern tank samhliða prófunar. Nýklöktu hrognin úr ræktunarkassanum eru hópuð og þeim dreift á kerfisbundinn hátt í tanka samhliða prófana (7. viðbætur). Þetta er hægt að gera með því að velja nýklakin hrogn af handahófi úr hópnum fyrir meðferð og setja þau raðbundið og tilviljanakennt í ker samhliða prófana. Hver tankur skal innihalda sama fjölda ( $n=12$ ) af klöktum seiðum (að hámarki 20 seiði í hverjum). Ef nýklöktu hrognin eru ekki nógu mörg til að fylla allar samhliða prófanir fyrir meðferð er mælt með að tryggja að eins margar samhliða prófanir og unnt er innihaldi 12 nýklakin hrogn. Hægt er að meðhöndla nýklakin hrogn á öruggan hátt með glerpípettum með stóru opi. Öll nýklakin viðbótarhrogn eru aflífuð á mannúðlegan hátt með svæfingarlyfi. Á þessum fáu vikum áður en undaneldispörin eru sett saman skal skrá þann dag þegar fyrsta hrygningin á sér stað í hverri samhliða prófun.

**Undaneldispör sett saman***Uggaklipping og ákvörðun á arfgerðarlegu kyni*

40. Ákvörðun á arfgerðarlegu kyni með uggaklippingum er gerð 9–10 vikum eftir frjónvgun (þ.e. í prófunarviku 12–13 hjá F1-kynslóðinni). Allir fiskar í einum tanki eru aflífaðir (með því að nota viðurkenndar aðferðir, t.d. IACUC) og lítið vefjasýni tekið úr enda sporðuggans, annaðhvort baklægt eða kviðlægt, á hverjum fiski til að ákvarða arfgerðarlegt kyn einstaklingsins (29. heimild). Hægt er að halda fiskum úr samhliða prófun í litlum búrum, einum í hverju búi ef unnt er, í tanki samhliða prófunar. Að öðrum kosti er hægt að halda tveimur fiskum í hverju búi ef það er unnt að þekkja þá í sundur. Ein aðferð gengur út á að skera sporðuggann á mismunandi hátt (t.d. endann baklægt eða endann kviðlægt) þegar vefjasýnið er tekið.
41. Arfgerðarlegt kyn japansks rískarpa er ákvarðað með sanngreindu og raðgreindu geni (dmy-gen) sem er staðsett á Y-litningnum. Ef dmy-gen er fyrir hendi bendir það til XY-einstaklings, óháð svipfari, en ef dmy-gen er ekki fyrir hendi bendir það til XX-einstaklings, óháð svipfari (30. og 31. heimild). Deoxýríbósakjarnsýra (DNA) er dregin út úr hverri uggaafklippu og hægt er að ákvarða hvort dmy-gen er fyrir hendi eða ekki með kjarnsýrumögnunaraðferðum (flettið upp í 9. viðbæti í kafla C.41 í þessum viðauka eða í 3. og 4. viðbæti í (29. heimild)).

*Undaneldispörum komið upp*

42. Upplýsingar um arfgerðarlegt kyn eru notaðar til að koma upp XX-XY-undaneldispörum, óháð ytra svipfari sem getur breyst vegna váhrifa frá prófunaríðefni. Daginn eftir að arfgerðarlegt kyn hvers fisks er ákvarðað eru tveir XX-fiskar og tveir XY-fiskar valdir af handahófi úr hverri samhliða prófun og tveimur XX-XY-undaneldispörum komið upp. Ef samhliða prófun inniheldur annaðhvort ekki tvo XX-fiska eða tvo XY-fiska skal sækja viðeigandi fisk úr annari samhliða prófun innan meðferðarinnar. Það er í forgangi að vera með þann fjölda undaneldispara í samhliða prófun sem mælt er með (12. heimild) fyrir hverja meðferð og í samanburðinum. Fiskar með greinilegan afbrigðileika (sundmagavandamál, vanskapaðan hrygg, mjög mikinn breytileika í stærð o.s.frv.) eru undanskildir þegar undaneldispörum er komið upp. Meðan æxlunarfasi F1-kynslóðarinnar stendur yfir skal hver tankur samhliða prófunar einungis innihalda eitt undaneldispar.

**Sýnataka úr svo til fullvöxnum fiskum og mat á endapunktum***Sýnataka úr fiskapörum sem eru ekki undaneldispör*

43. Eftir að undaneldispörin eru sett saman eru fiskar, sem eru ekki valdir til áframhaldandi undaneldis, aflífaðir á mannúðlegan hátt til að mæla endapunkta hjá svo til fullvöxnum fiskum í prófunarviku 12–13 (F1-kynslóðin). Það er afar mikilvægt að fiskarnir séu meðhöndlaðir þannig að arfgerðarlegt kyn, sem var ákvarðað fyrir valið á undaneldispörunum, sé ennþá rekjanlegt til einstakra fiska. Öll gögn sem er safnað eru greind með tilliti til arfgerðarlegs kyns tiltekinnna fiska. Hver fiskur er notaður í ýmsar mælingar á endapunktum, þ.m.t.: til að ákvarða lifunarhlutfall ungfiska/svo til fullvaxinna fiska (prófunarvikur 7–12/13 (F1-kynslóðin)), vöxt á lengdina (mæla má staðallengd ef sporðugginn var stytur vegna

sýnatöku til að greina erfðafraeðilegt kyn. Unnt er að mæla heildarlengdina ef einungis hluti af raufarugganum, baklægt eða kviðlægt, er tekinn til að mæla dmy-gen) og líkamsþyngd (þ.e. blautvig, þerraður), mRNA vítellógeníns í lifur (eða VTG) og raufaruggatotur (sjá töflur 1 og 2). Athygli er vakin á að einnig er gerð krafa um þyngd og lengd undaneldisparanna til að reikna út meðaltal í meðferðarhópi.

#### *Sýnataka úr vef og vítellógenínsmæling*

44. Lifrin er krufin og skal geymd við  $\leq -70$  °C þangað til mRNA vítellógeníns (eða VTG) er mælt. Sporður fisksins, þ.m.t. raufarugginn, er varðveittur í viðeigandi festiefni (t.d. Davidson) eða ljósmyndaður þannig að unnt sé að telja raufaruggatoturnar síðar. Ef þess er óskað má um leið taka sýni úr öðrum vefjum (þ.e. kynkirtlinum) og geyma. Styrkur VTG í lifur skal magngreindur með raðkvæmri ELISA-tækni (sjá verklagið sem mælt er með fyrir japanskan rískarpa í 6. viðbæti við kafla C.48 í þessum viðauka). Að öðrum kosti hafa aðferðir til að magnákvarða mRNA vítellógeníns, þ.e. mRNA útdrátt vtg I gensins úr lifrarsýni og magnákvarða fjölda afrita af vtg I-geninu (á hvert ng af mRNA samtals) með magnbundinni kjarnsýrumögnun, verið fastsettar hjá Umhverfisverndarstofnun Bandaríkjanna (U.S EPA) (29. heimild), Í staðinn fyrir að ákvarða fjölda afrita af vítellógenín-geninu í samanburðar- og meðferðarhópunum þarf færri úrræði við þá aðferð að ákvarða hlutfallslega breytingu (margfeldisbreytingu) á tjáningu vtg I-gensins úr samanburðar- og meðferðarhópunum og hún er ekki eins tæknilega erfið.

#### *Annars stigs kyneinkenni*

45. Við eðlilegar aðstæður eru einungis kynþroska japanskir rískarpahængar með totur, sem vaxa á liðflötum geisla raufaruggans sem annars stigs kyneinkenni, sem gefa hugsanleg lífmerki fyrir innkirtlatruflandi áhrif. Aðferð til að telja raufaruggatotur (fjöldi liðflata með totur) er tilgreind í 8. viðbæti. Fjöldi raufaruggatota á hverjum einstaklingi er líka notuð til að flokka viðkomandi einstakling eftir ytra svipfari sem hæng eða hrygnu í þeim tilgangi að reikna út einfalt kynjahlutfall í hverri samhliða prófun. Japanskur rískarpi með fleiri raufaruggatotur en 0 er skilgreindur sem hængur, japanskur rískarpi með 0 raufaruggatotur er skilgreindur sem hrygna.

#### **Frjósemismáttur og mat á frjósemi**

46. Frjósemismáttur og frjósemi eru metin í prófunarvikum 1 til 3 hjá F0-kynslóðinni og í prófunarvikum 15 til 17 hjá F1-kynslóðinni. Hrognum er safnað daglega frá hverju undaneldispari í 21 dag samfelld. Hrognin eru fjarlægð varlega frá hrygnum í neti og/eða sogin upp af botninum á kerinu á hverjum morgni. Bæði frjósemismáttur og frjósemi eru skráð daglega hjá hverju undaneldispari í samhliða prófun. Frjósemismáttur er skilgreindur sem fjöldi hrogna sem er gotið og frjósemi er skilgreind á virkan hátt sem fjöldi frjóvgaðra og lífvænlegra hrogna þegar talið er. Talning skal gerð eins fljótt og unnt er eftir að hrognunum er safnað.
47. Frjósemismáttur í samhliða prófunum er skráður daglega sem fjöldi hrogna á hvert undaneldispar og greining gerð með tölfraeðiaðferðum, sem mælt er með, með því að nota meðaltalið úr samhliða prófununum. Frjósemismáttur í samhliða prófunum er summan af fjölda frjórna hrogna, sem undaneldispar framleiðir, deilt með summu hrognafjöldans sem þetta par framleiðir. Tölfraeðileg frjósemi er greind sem hlutfall í hverri samhliða prófun. Klakgeta í samhliða prófun er fjöldi nýklakinna hrogna deilt með fjölda hlaðinna fósturvísa (yfirleitt 20). Tölfraeðilega séð er klakgetan greind sem hlutfall í hverri samhliða prófun.

#### **Sýnataka úr fullvöxnum fiskum og mat á endapunktum**

##### *Sýnataka úr undaneldisparum fiska*

48. Eftir prófunarviku 17 (þ.e. eftir að F2-kynslóðin er komin af stað á árangursríkan hátt) eru fullvaxnir fiskar af F1-kynslóðinni aflífaðir á mannúðlegan hátt og mismunandi endapunktur metnir (sjá töflur 1 og 2). Tekin er mynd af raufarugganum til að meta raufaruggatotur (sjá 8. viðbæti) og hann eða sporðurinn, rétt aftan við þarfagang, er fjarlægður og festur til að telja toturnar síðar. Taka má sýni úr hluta af sporðugganum þegar þarna er komið sögu og geyma hann til að sannprófa erfðafraeðilegt kyn (dmy-gen) ef óskað er. Ef þörf krefur er hægt að taka vefjasýni til að endurtaka greininguna á dmy-geninu til að sannprófa erfðafraeðilegt kyn tiltekens fisks. Líkamsholið er opnað til að gegnflæði viðeigandi festiefnis sé mögulegt (t.d. Davidson) áður en allur skrokkurinn er settur á kaf í festiefnið. Ef viðeigandi gegndræpisþrep er framkvæmt fyrir festingu þarf ekki að opna líkamsholið.

*Vefjameinafræðileg rannsókn*

49. Hver fiskur er metinn á vefjafræðilegan hátt m.t.t. sjúkdóma í kynkirtlavef (30. og 29. heimild). Eins og um getur í 33. lið geta aðrir endapunktur gangvirkis, sem eru metnir í þessari rannsókn (t.d. VTG, annars stigs kyneinkenni (SSC) og tiltekin vefjameinafræðileg áhrif á kynkirtla), orðið fyrir áhrifum af altækum eiturrhifum eða annars konar eiturrhifum. Af þessum sökum má einnig gera nákvæmt vefjameinafræðilegt mat á lifur og nýrum til að stuðla að betri skilningi á hvers konar viðbrögðum í endapunktum gangvirkisins. Ef þetta ítarlega mat er ekki framkvæmt skal þó samt sem áður skrá og gera grein fyrir stórsæjum afbrigðileika sem kemur í ljós meðan vefjameinafræðilegt mat stendur yfir. Það kemur til greina að „lesa niður“ frá meðferðarhópnum sem fékk hæsta styrkleikann (borið saman við samanburðinn) að meðferðarhóp án áhrifa en þó er mælt með að fletta upp í vefjameinafræðilegum leiðbeiningum (29. heimild). Yfirleitt eru öll sýnin unnin/sneidd og síðan les meinafræðingurinn úr þeim. Ef aðferðin „lesa niður“ er notuð skal bent á að í verkferli RSCABS-prófs (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) er þess vænst að eftir því sem skammtastærðir verða stærri aukist einnig líffræðilegu (meinafræðilegu) áhrifin. Þess vegna glatast styrkur ef einungis einn hár skammtur án nokkurra milliskammta er skoðaður. Ef tölfræðileg greining er ekki nauðsynleg til að ákvarða að hár skammtur hafi engin áhrif getur þessi aðferð verið ásættanleg. Svipfar kynkirtils er einnig leitt út frá þessu mati.

*Aðrar athuganir*

50. Framlengd einnar kynslóðar æxlunarprófun á japönskum rískarpa (MEOGRT) gefur af sér gögn sem hægt er að nota (t.d. í greiningu á vægi rökstuddra vísbendinga) til að meta samtímis a.m.k. tvær almennar tegundir af ferli neikvæðra afleiðinga sem enda með skerðingu á æxlun: a) innkirtlatruflandi ferla sem fela í sér truflun á undirstúku-, heiladinguls- og kynkirtlaöxli; og b) ferla sem valda minnkandi lifun, vexti (lengd og þyngd) og æxlun með eiturrhifum sem hafa ekki áhrif á innkirtla. Endapunktur sem eru yfirleitt mældir í prófunum á langvinnum eiturrhifum, s.s. prófun á öllum lífsferlinum og prófun snemma á lífsferlinum, eru líka teknir með í þessa prófun og hægt er að nota þá til að meta hættu sem stafar frá bæði verkunarháttum eiturrhifaferla sem hafa ekki áhrif á innkirtla og innkirtlatruflandi eiturrhifaferlum. Meðan prófunin stendur yfir skal framkvæma atferlisathuganir daglega og óvenjulegt atferli af öllu tagi skal skráð. Þar að auki skal skrá öll dauðsföll og reikna út lifun fram til aflífunar fiska (prófunarvika 6/7), lifun eftir aflífunina fram til sýnatöku úr svo til fullvöxnum fiskum (9–10 vikum eftir frjóvgun) og lifun frá þörun fram til sýnatöku úr fullvöxnum fiskum.

*Tafla 1***Yfirlit yfir endapunkta í framlengdri einnar kynslóðar æxlunarprófun á japönskum rískarpa (MEOGRT) (\*)**

Lífsstig	Endapunktur	Kynslóð
Fósturvísir (2 vikum eftir frjóvgun)	Klak (% og tími fram að klaki)	F1, F2
Ungfiskur (4 vikum eftir frjóvgun)	Lifun	F1
Svo til fullvaxinn (9 eða 10 vikum eftir frjóvgun)	Lifun	F1
	Vöxtur (lengd og þyngd)	
	Vítellógenín (mRNA eða prótín)	
	Annars stigs kyneinkenni (raufaruggatotur)	
	Ytra kynjahlutfall	
	Tími fram að fyrstu hrygningu	
Fullvaxinn (12–14 vikum eftir frjóvgun)	Æxlun (frjósemismáttur og frjósemi)	F0, F1
Fullvaxinn (15 vikum eftir frjóvgun)	Lifun	F1
	Vöxtur (lengd og þyngd)	
	Annars stigs kyneinkenni (raufaruggatotur)	
	Vefjameinafræðileg rannsókn (kynkirtill, lifur, nýru)	

(\*) Þessa endapunkta skal greina tölfræðilega

TÍMALÍNA

51. Tímalína fyrir framlengda einnar kynslóðar æxlunarprófun á japönskum rískarpa (MEOGRT), sem er útlustuð í töflu 2, sýnir prófunina. Framlengd einnar kynslóðar æxlunarprófun á japönskum rískarpa (MEOGRT) tekur til váhrifa í 4 vikur á fullvaxna fiska af F0-kynslóðinni og váhrifa í 15 vikur á F1-kynslóðina og váhrifatímabils á F2-kynslóðina fram að klaki (2 vikum eftir frjóvgun). Starfsemi meðan framlengd einnar kynslóðar æxlunarprófun á japönskum rískarpa (MEOGRT) stendur yfir er tekin saman í 9. viðbæti.

Tafla 2

**Tímalínur fyrir váhrif og mælingar á endapunktum í framlengdri einnar kynslóðar æxlunarprófun á japönskum rískarpa (MEOGRT)**

Tímalína fyrir váhrif og endapunkta í framlengdri einnar kynslóðar æxlunarprófun á japönskum rískarpa (MEOGRT)																								
F0	1	2	3	4																				
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15						
F2																	1	2						
Prófunarvika	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19					
Lífsstigslykill					Fósturvísir			Seiði			Ungfiskur			Svo til fullvaxinn		Fullvaxinn								
Endapunktur																								
Frjósemismáttur	F <sub>0</sub>															F <sub>1</sub>			<ul style="list-style-type: none"> <li>Tilhögun tilraunar inniheldur 7 hópa samhlíða prófana                             <ul style="list-style-type: none"> <li>5 fyrir meðferð með prófunariðefni</li> <li>2 fyrir samhlíða samanburðarhópa (4 ef leysir er notaður)</li> </ul> </li> <li>Tilhögun innan hóps                             <ul style="list-style-type: none"> <li>12 samhlíða prófanir fyrir æxlun, meinafræðileg rannsókn á fullvöxnum fiskum og annars stigs kyneinkenni (SSC) (v 10. til 18. eftir frjóvgun)</li> <li>6 samhlíða prófanir fyrir klak, lifun, Vtg; og annars stigs kyneinkenni (SSC) hjá svo til fullvöxnum fiski og vöxtur (v 1 til 9)</li> </ul> </li> </ul> SSC: annars stigs kyneinkenni v: vikur Vtg: vítellógenín					
Frjósemi	F <sub>0</sub>															F <sub>1</sub>								
Klak					F <sub>1</sub>															F <sub>2</sub>				
Lifun					F <sub>1</sub>			F <sub>1</sub>														F <sub>1</sub>		
Vöxtur					F <sub>0</sub>															F <sub>1</sub>				
Vítellógenín																F <sub>1</sub>								
Annars stigs kyneinkenni																F <sub>1</sub>								
Vefjameinafræðileg rannsókn																F <sub>1</sub>								
Prófunarvika	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19					

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

**Tölfræðileg greining**

52. Þar eð arfgerðarlegt kyn er ákvarðað fyrir alla prófunarfiska skal greina gögnin aðskilið m.t.t. hvors arfgerðarlegs kyns fyrir sig (þ.e. XY-hængar og XX-hrygnur). Sé það ekki gert kemur það til með að draga verulega úr tölfræðilegum styrk sérhvarrar greiningar. Æskilegast er að tölfræðilegar greiningar á gögnunum séu samkvæmt aðferðum sem lýst er í skjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“ (32. heimild). Í 10. viðbæti eru frekari leiðbeiningar um tölfræðilega greiningu.
53. Tilhögun prófunar og val á tölfræðilegri prófun skulu veita nægilegan styrk til að greina breytingar á endapunktum sem hafa líffræðilega þýðingu ef gera skal grein fyrir styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif (32. heimild). Skýrslugjöf um viðeigandi hrifstyrk og breytur getur verið háð regluramma. Tilgreina skal hundradshlutfall breytinga á hverjum endapunkti sem er mikilvægt að greina eða áætla. Tilhögun tilraunar skal sniðin þannig að slíkt sé unnt. Ekki er líklegt að sama breyting á hundradshlutfalli eigi við um alla endapunkta né heldur er líklegt að unnt sé að hanna framkvæmanlega tilraun sem uppfyllir þessar viðmiðanir fyrir alla endapunkta og því er brýnt, þegar tilraunin er hönnuð, að leggja áherslu á endapunkta sem skipta máli fyrir viðkomandi tilraun. Tölfræðileg flæðirit og leiðbeiningar er að finna í 10. viðbæti til að hjálpa til við meðferð gagna og við val á heppilegasta tölfræðipróf eða líkaninu til að nota. Nota má aðrar tölfræðilegar aðferðir, að því tilskildu að þær séu vísindalega rökstuddar.



54. Nauðsynlegt er að greina breytileika innan hvernar samstæðu samhliða prófana með dreifnigreiningu eða aðferð með tengslatöflum og nota fullnægjandi, viðeigandi aðferðir til tölfræðilegra greininga á grundvelli þessarar greiningar. Til að gera margfaldan samanburð milli niðurstaðna fyrir hvern styrk og fyrir samanburðina er mælt með prófi með stiglækkun (t.d. Jonckheere-Terpstra-prófi) fyrir stöðuga svörum. Ef gögn eru ekki í samræmi við einhalla styrkháða svörum skal nota Dunnett- eða Dunn-próf (eftir fullnægjandi vörpun gagna, ef nauðsyn krefur).
55. Að því er varðar frjöseismátt eru hrognin talin daglega en þau má greina sem samanlagðan fjölda hroгна eða sem endurteknar mælingar. Í 10. viðbæti er að finna nánari upplýsingar um hvernig á að greina þennan endapunkt. Að því er varðar vefjameinafræðileg gögn sem eru í formi alvarleikastigafjölda er búið að þróa nýtt tölfræðipróf, RSCABS-próf (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) (33. heimild).
56. Gera skal grein fyrir öllum endapunktum, sem koma í ljós í íðefnameðferðum, sem eru verulega frábrugðnir samsvarandi samanburðarprófunum.

### Atriði varðandi gagnagreiningu

#### *Notkun á ótryggum meðhöndlunarstigum*

57. Tekið er tillit til margra þátta við ákvörðun á því hvort samhliða prófun eða heil meðhöndlun sýna augljós eiturrhif og skuli tekin úr greiningunni. Augljós eiturrhif eru skilgreind sem  $>4$  dauðsföll í sérhverri samhliða prófun á bilinu 3 vikum eftir frjógvun til 9 vikum eftir frjógvun sem ekki er hægt að útskýra sem tæknilega villu. Önnur augljós merki eiturrhifa eru m.a. blæðing, óeðlilegt atferli, óeðlileg sundmynstur, lystarleysi og öll önnur klínísk einkenni sjúkdóms. Að því er varðar merki um næstum banvæn eiturrhif getur eigindlegt mat reynst nauðsynlegt og skal alltaf gert í tengslum við samanburðarhóp með þynningarvatni (einungis hreinu vatni). Ef augljós eiturrhif koma fram í meðferð(um) með hæsta styrkleikann/hæstu styrkleikana er mælt með því að þessar meðferðir séu felldar brott úr greiningunni.

#### *Samanburður með leysi*

58. Einungis skal líta á notkun leysis sem síðasta úrræði þegar allir aðrir íðefnagjafarmöguleikar hafa verið teknir til athugunar. Ef leysir er notaður skal samtímis keyra samanburð með þynningarvatni. Við lok prófunarinnar skal framkvæma mat á hugsanlegum áhrifum leysisins. Þetta er gert með tölfræðilegum samanburði á samanburðarhópnum með leysinum og samanburðarhópnum með þynningarvatninu. Mikilvægustu endapunktarnir til athugunar í þessari greiningu eru vaxtarákvörðunarþættir (þyngd) þar eð almenn eiturrhif geta haft áhrif á þá. Ef tölfræðilega marktækur munur kemur fram milli þessara endapunkta í samanburðarhópnum með þynningarvatni og samanburðarhópnum með leysi skal nota besta sérfræðiálit til að ákvarða hvort gildi prófunarinnar er teflt í tvísýnu. Ef það er munur á samanburðarhópnum tveimur skal bera meðferðina sem varð fyrir váhrifum af íðefninu saman við samanburðarhópinn með leysi nema vitað sé að samanburður við samanburðarhóp með þynningarvatni sé ákjósanlegri. Ef enginn tölfræðilega marktækur munur er milli samanburðarhópna tveggja er mælt með því að meðferðir, sem verða fyrir váhrifum af prófunaríðefninu, séu bornar saman við hópuð sýni (samanburðarhópar með leysi og samanburðarhópar með þynningarvatni) nema vitað sé að samanburður við annaðhvort samanburðarhópinn með leysi eða samanburðarhópinn með þynningarvatni sé ákjósanlegri.

### Prófunarskýrsla

59. Eftirtalið skal vera í prófunarskýrslunni:

Prófunaríðefni: eðlisástand og, þar sem við á, eðlisefnafræðilegir eiginleikar

— Efnafræðileg sanngreiningargögn.

Efni með einum efnisþætti:

— útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,

— efnafræðileg sanngreining, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv., (þ.m.t. innihald lífræns kolefnis, ef við á).

Fjölpáttæfni, UVCB-efni og blöndur:

- Lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.

*Prófunartegund:*

- Vísindaheiti, stofn ef hann liggur fyrir, uppruni frjónvuguðu hrognanna og aðferð við að taka þau og meðhöndlun eftir það.

*Prófunarskilyrði:*

- Ljóslofa eða ljóslofur.
- Tilhögun prófunar (t.d. stærð hólfs, efni og rúmmál vatns, fjöldi prófunarhólfa og hólfa samhliða prófunar, fjöldi nýklaktra hrognanna í hverri samhliða prófun).
- Aðferð við tilreiðslu stofnlausna og hve oft endurnýjun á sér stað (tilgreina skal uppleysandi efnið og styrk þess ef það er notað).
- Aðferð við skömmun prófunaríðefnis (t.d. dælur, þynningarkerfi).
- Endurheimtunargeta aðferðarinnar og nafnstyrkleikar í prófuninni, magngreiningarmörk, meðaltal mældra gilda og staðalfrávik þeirra í prófunarkerjunum og sú aðferð, sem er notuð til að fá þessi gildi, og gögn sem sýna að mælingarnar vísi til styrkleika prófunaríðefnisins í eiginlegu lausninni.
- Eiginleikar þynningarvatnsins: sýrustig, harka, hiti, styrkur uppleysts súrefnis, styrkur klórleifa (ef hann er mældur), heildarmagn lífræns kolefnis (ef það er mælt), svifagnir (ef þær eru mældar), selta prófunarmiðilsins (ef hún er mæld) og allar aðrar mælingar sem gerðar eru.
- Nafnstyrkleikar í prófuninni, meðaltal mæligilda og staðalfrávik þeirra.
- Gæði vatns í prófunarkerjum, sýrustig, hitastig (daglega) og styrkur uppleysts súrefnis.
- Nákvæmar upplýsingar um fóðrun (t.d. tegund fóðurs, uppruna, magn sem er gefið og hve oft er gefið).

*Niðurstöður:*

- Sannanir fyrir því að samanburðir uppfylli gildisviðmiðanir í heild sinni.
- Gögn um samanburðinn (ásamt samanburði með leysi þegar hann er notaður) og meðferðarhópana sem hér segir, klak (klakgeta og tími fram að klaki) fyrir F1-kynslóðina og F2-kynslóðina, lifun eftir klak fyrir F1-kynslóðina, vöxtur (lengd og líkamsþyngd) fyrir F1-kynslóðina, arfgerðarlegt kyn og kynjaaðgreining (t.d. annars stigs kyneinkenni byggt á raufaruggatotum og vefjameinafræðilegu mati á kynkirtlum) fyrir F1-kynslóðina, svipfarslegt kyn fyrir F1-kynslóðina, annars stigs kyneinkenni (raufaruggatotur) fyrir F1-kynslóðina, mRNA vítellógeníns (eða VTG-prótín) fyrir F1-kynslóðina, vefjafræðilegt mat (kynkirtill, lifur og nýru) fyrir F1-kynslóðina og æxlun (frjósemismáttur og frjósemi) fyrir F0-kynslóðina og F1-kynslóðina (sjá töflur 1 og 2).
- Aðferð við tölfræðilega greiningu (aðhvarfsgreining eða dreifnigreining) og meðhöndlun gagna (tölfræðipróf og líkön sem eru notuð).
- Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) fyrir hverja svörun sem metin er.

- Minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC) fyrir hverja svörun sem er metin (við  $p = 0,05$ ); EC<sub>x</sub> fyrir hverja svörun sem metin er, ef við á, og öryggisbil (t.d. 90% eða 95%) og línurit aðlagða líkansins sem er notað við útreikningana, ferli styrkháðrar svörunar, formúla aðhvarfslíkans, áætlaðar líkanbreytur og staðalskekkjur þeirra.
  - Öll frávik frá þessari prófunaraðferð og frávik frá samþykktarviðmiðunum og atriði sem varða mögulegar afleiðingar á niðurstöðu prófunarinnar.
60. Að því er varðar niðurstöður mælinga á endapunktum skal leggja fram meðalgildi og staðalfrávik þeirra (bæði á grundvelli samhliða prófana og styrks, ef unnt er).

#### HEIMILDIR

- 1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 2) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. *Current Protocols in Toxicology* 39: 1-36.
- 3) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 4) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. *Water Research* 16: 457-464.
- 5) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1925-1930.
- 6) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2552-2560.
- 7) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17-Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Chemosphere* 47: 71-80.
- 8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1692-1698.
- 9) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-Tert-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1487-1496.
- 10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. *Aquatic Toxicology* 79: 288-295.
- 11) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. *Aquatic Toxicology* 77: 78-86.

- 12) Nakamura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Journal of Applied Toxicology* 35:11-23.
- 13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Aðgengilegt á: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html>.
- 14) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. *Chemosphere* 86: 593-599.
- 15) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 16) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Review. Aquatic Toxicology* 76: 69–92.
- 17) Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
- 18) Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Biology of Reproduction* 61: 1287-1293.
- 19) Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). *Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols*, Wiley- Blackwell.
- 20) Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 330-338.
- 21) Kafli C.15 í þessum viðauka, Fiskur, prófun á skammvinnnum eiturhrifum á fósturvísis- og kviðpokastigi.
- 22) Kafli C.37 í þessum viðauka, Rannsókn á fiskum í 21 dag: skammtímaskimun fyrir estrógen- og andrógenvirkni og arómatasahömlun.
- 23) Kafli C.41 í þessum viðauka, Prófun á kynþroska fiska.
- 24) Kafli C.48 í þessum viðauka, Skammtíma æxlunarrannsókn á fiskum.
- 25) Kafli C.47 í þessum viðauka, Eiturhrifaþrófun á fiskum á fyrri stigum lífs.

- 26) Kafli C.49 í þessum viðauka, Prófun á bráðum eiturhrifum á fósturvísa fiska.
- 27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish In Vivo Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067-1076.
- 28) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50: 301-308.
- 29) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Schartl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. *Genetics* 163: 245–251.
- 31) Shinomiya, A, Otake H, Togashi K, Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, *Zoological Science* 21: 613-619.
- 32) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.
- 33) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108-1116.

*1. viðbætur*

## SKILGREININGAR

**Íðefni:** Efni eða blanda.

**ELISA:** ELISA-prófun.

**Frjósemismáttur** = fjöldi hroga

**Frjósemi** = fjöldi lífvænlegra hroga/frjósemismáttur

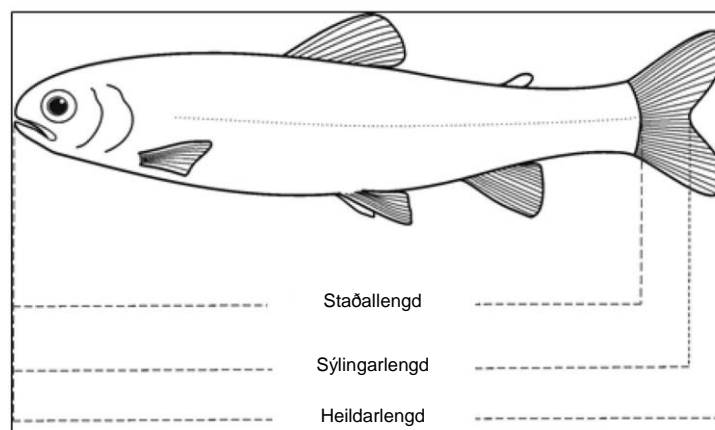
**Sýlingarlengd:** lengd frá fremsta enda trjónu að enda miðuggageislanna í sporðinum og er notuð fyrir fiska þar sem erfitt er að sjá hvar hryggjarsúlan endar ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org))

**Klakgeta** = nýklakin hrogn/fjöldi fósturvísa sem var hlaðið í ræktunarkassa

**IACUC:** Institutional Animal Care and Use Committee

**Staðallengd:** lengd fisks sem er mæld frá fremsta enda trjónu að aftari enda síðasta hryggjarliðar eða aftari enda miðhluta sporðplötunnar. Í stuttu máli er lengd sporðuggans ekki tekin með í þessari mælingu. ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org))

**Heildarlengd:** lengd frá fremsta enda trjónu að fremsta enda lengri blöðkuhelmings sporðuggans, við mælingu eru blöðkuhelmingarnir lagðir þétt saman um miðlínuna. Mælt er í beinni línu, ekki eftir sveigju skrokks ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org))

*Mynd 1***Lýsing á mismunandi lengdum sem notaðar eru**

**Mynd 1:** Lýsing á mismunandi lengdum sem notaðar eru

**ECx:** (Hrífstyrkur sem hefur x% áhrif) er sá styrkur sem hefur x% áhrif á prófunarlífverur innan tiltekins váhrifatímabils í samanburði við samanburðarprófun. Til dæmis er EC50 sá styrkur sem metið er að hafi, við prófunarendapunkt, áhrif á 50% af þýði sem er látið verða fyrir váhrifum yfir tilgreint váhrifatímabil.

**Prófun með samfelldu streymi** er prófun með samfelldu streymi prófunarlausna gegnum prófunarkerfið meðan váhrif standa yfir.

**UHK-öxull (e. *HPG axis*):** Undirstúku-, heiladinguls- og kynkirtlaöxull.

**IUPAC:** Alþjóðasamtök um hreina og hagnýta efnafræði.

**Hleðsluhlutfall:** Blautvigt fiska miðað við rúmmál vatns.

**Minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC):** minnsti styrkur prófunaríðefnis þar sem efnið reynist hafa tölfraðilega marktæk áhrif (við  $p < 0,05$ ) miðað við samanburðinn. Allur prófunarstyrkur sem er yfir minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif skal þó að valda jafnmiklum eða meiri skaðlegum áhrifum en fram koma við minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif. Ef ekki er hægt að uppfylla þessi tvö skilyrði skal skýra til fulls hvernig staðið var að vali á minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif (og þar með vali á styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif). Leiðbeiningar eru settar fram í 5. og 6. viðbæti.

**Miðgildisbanastyrkur (LC50):** Styrkur prófunaríðefnis sem talinn er banvænn fyrir 50% prófunarlífveranna meðan prófunin stendur yfir.

**Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC):** sá prófunarstyrkur sem er minni en minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif og hefur engin tölfraðilega marktæk áhrif ( $p < 0,05$ ) miðað við samanburðinn innan tilgreinds váhrifatímabils.

**SMILES:** SMILES-kerfið.

**Þéttleiki:** Fjöldi fiska miðað við rúmmál vatns.

**Prófunaríðefni:** Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

**UVCB-efni:** Efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffraðileg efni.

**Vítellógenín (VTG):** Vítellógenín er fosfólípóglýkóprótínforefni eggjarauðupróteíns sem er yfirleitt fyrir hendi í kynþroska kvendýrum af öllum eggbærum tegundum.

**WPF:** Vikur eftir frjóvgun (Weeks post fertilisation).

## 2. viðbætur

## NOKKRIR EFNAFRÆÐILEGIR EIGINLEIKAR VIÐUNANDI ÞYNNINGARVATNS

Efni	Styrkmörk
Efnisagnir	5 mg/l
Heildarmagn lífræns kolefnis	2 mg/l
Ójónað ammoníak	1 µg/l
Klórleifar	10 µg/l
Heildarmagn fosfórlífrænna varnarefna	50 ng/l
Heildarstyrkur klórlífrænna varnarefna ásamt fjöklóruðum bífenýlum	50 ng/l
Heildarstyrkur lífræns klórs	25 ng/l
Ál	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Króm	1 µg/l
Kóbalt	1 µg/l
Kopar	1 µg/l
Járn	1 µg/l
Blý	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Sink	1 µg/l
Kadmíum	100 ng/l
Kvikasilfur	100 ng/l
Silfur	100 ng/l



## 3. viðbætur

PRÓFUNARSKILYRÐI FYRIR FRAMLENGDA EINNAR KYNSLÓÐAR ÆXLUNARPRÓFUN Á JAPÖNSKUM RÍSKARPA  
(MEOGRT)

1. Ráðlögð tegund Japanskur rískarpi (*Oryzias latipes*)
2. Tegund prófunar Samfellt gegnumstreymi
3. Vatnshitastig Nafnprófunarhitastig er 25 °C. Meðalhitastig í hverjum tanki meðan prófunin stendur yfir er 24–26 °C.
4. Lýsing Flúrperur (breitt róf og ~150 lúmen/m<sup>2</sup>)(~150 lúx).
5. Ljósloka Birta í 16 klst., myrkur í 8 klst.
6. Hleðsluhlutfall F0-kynslóðin: 2 fullvaxnir/samhliða prófun; F1-kynslóð komið af stað með að hámarki 20 hrognum (fósturvísar)/samhliða prófun, fækkað í 12 fósturvísar/samhliða prófun við klak, síðan 2 fullvaxnir (XX-XY undaneldispar) 9–10 vikum eftir frjóvgun fyrir æxlunarfásann.
7. Minnsta nothæfa rúmmál prófunarhólfs 1,8 l (t.d. stærð prófunarhólfs: 18x9x15 cm)
8. Rúmmálsútskipti prófunarlausna Að lágmarki 5 rúmmálsendurnýjanir/dag og allt að 16 rúmmálsendurnýjanir/dag (eða streymi 20 ml/mín).
9. Aldur prófunarlífvera við upphaf F0-kynslóðin: > 12 vikum eftir frjóvgun en mælt er með að þær fari ekki yfir 16 vikur eftir frjóvgun.
10. Fjöldi lífvera í hverri samhliða prófun F0-kynslóðin: 2 fiskar (par með hæng og hrygnu); F1-kynslóðin að hámarki 20 fiskar (hrogn)/samhliða prófun (koma frá undaneldisparum af F0-kynslóðinni og F1-kynslóðinni).
11. Fjöldi meðferða 5 prófunariðefnameðferðir auk viðeigandi samhliða prófunar eða prófana.
12. Fjöldi samhliða prófana á hverja meðferð Að minnsta kosti 6 samhliða prófanir á hverja prófunariðefnameðferð og a.m.k. 12 samhliða prófanir fyrir samanburð og fyrir samanburð með leysi, ef hann er notaður (fjöldi samhliða prófana er tvöfaldaður innan æxlunarfásans hjá F1-kynslóðinni).
13. Fjöldi lífvera á hverja prófun Að minnsta kosti 84 fiskar í F0-kynslóðinni og 504 í F1-kynslóðinni (Ef samanburður með leysi er notaður verða það 108 fiskar í F0-kynslóðinni og 648 fiskar í F1-kynslóðinni). Einingin, sem er talin, eru seiðin eftir kviðpokastigið.
14. Fóðrunarfyrirkomulag Fiskurinn er fóðraður að vild á saltvatnsrækjum, *Artemia* spp. (24 klst. gamlar krabballirfur), og bætt við fóðri í flögum, sem fæst á almennum markaði, ef nauðsyn krefur (dæmi um fóðrunaráætlun til að tryggja fullnægjandi vöxt og þroskun til að styðja kröftuga æxlun er að finna í 5. viðbæti).
15. Loftun Engin nema uppleyst súrefni nálgist <60% af metnunargildi lofts.
16. Þynningarvatn Hreint yfirborðsvatn, brunnavatn eða endurgert vatn eða afklórað kranavatn.

17. Váhrifatímabil  
Alla jafna 19 vikur (frá F0-kynslóð þangað til F2-kynslóðin klekst út).
18. Líffræðilegir endapunktur (aðal)  
Klakgeta (F1-kynslóðin og F2-kynslóðin); lifun (F1-kynslóðin, frá klaki til 4 vikum eftir frjóvgun (endir seiðastigs/upphaf ungfiskastigs), 4 til 9 (eða 10) vikum eftir frjóvgun (upphaf ungfiskastigs fram að svo til fullvaxinn) og 9 til 15 vikum eftir frjóvgun (svo til fullvaxinn fram að aflifun fullvaxinna); vöxtur (F1-kynslóðin, lengd og þyngd 9 og 15 vikum eftir frjóvgun); annars stigs kyneinkenni (F1-kynslóðin, raufaruggatotur 9 og 15 vikum eftir frjóvgun); vítellógenín (F1-kynslóðin, mRNA vítellógeníns eða VTG-prótín 15 vikum eftir frjóvgun); svipfarslegt kyn (F1-kynslóðin með vefjafræðilegu mati á kynkirtlum 15 vikum eftir frjóvgun); æxlun (F0-kynslóðin og F1-kynslóðin, frjósemismáttur og frjósemi í 21 dag); tími fram að hrygningu (F1-kynslóðin) og vefjameinafræðileg rannsókn (F1-kynslóðin, kynkirtill, lifur og nýru 15 vikum eftir frjóvgun).
19. Gildisviðmiðanir prófunar  
Uppleyst súrefni  $\geq 60\%$  mettnargildi lofts; meðalvatnshitastig 24–26 °C meðan prófunin stendur yfir; æxlunarárangur  $\geq 65\%$  hjá hrygnum í samanburðarhóp(um); meðaltal daglegs frjósemismáttar  $\geq 20$  hrogn í samanburðarhóp(um); klakgeta  $\geq 80\%$  (meðaltal) í samanburðum (í hvorum um sig af F1-kynslóðinni og F2-kynslóðinni); lifun eftir klak þangað til 3 vikum eftir frjóvgun  $\geq 80\%$  (meðaltal) og frá 3 vikum eftir frjóvgun þangað til kynslóðin hefur verið aflífuð  $\geq 90\%$  (meðaltal) í samanburðarhópunum (F1-kynslóðin), styrkleika prófunaríðefnis í lausn skal viðhaldið á fullnægjandi hátt innan  $\pm 20\%$  af meðaltali mæligildanna.

#### 4. viðbætur

##### LEIÐBEININGAR UM DÆMIGERÐ SAMANBURÐARGILDI

Það skal bent á að þessi samanburðargildi byggjast á takmörkuðum fjölda fullgildingarrannsókna og kunna að taka breytingum í ljósi frekari reynslu.

##### *Vöxtur*

Lengdar- og þyngdarmælingar eru gerðar á öllum fiskum sem sýni eru tekin úr 9 (eða 10) og 15 vikum eftir frjóvgun. Ef þessari aðferðarlýsingu er fylgt má vænta þess að blautvigt 9 vikum eftir frjóvgun sé 85–145 mg hjá hængum og 95–150 mg hjá hrygnum. Sú þyngd sem vænst er 15 vikum eftir frjóvgun er 250–330 mg hjá hængum og 280–350 mg hjá hrygnum. Þó að það geti verið veruleg frávik frá þessum bilum hjá einstaka fiskum bendir meðalþyngd í samanburði, sem er verulega langt frá þessum bilum, einkum ef hún er minni, til vandkvæða við fóðrun, hitastýringu, vatnsgæði, sjúkdóma eða hvers konar samsetningu þessara þátta.

##### *Klak*

Árangur í klaki í samanburðum er yfirleitt í kringum 90% en þó eru gildi alveg niður í 80% ekki óalgeng. Árangur í klaki sem fer undir 75% getur bent til ófullnægjandi hristings á hrognum í þroskun eða ónógrar varkárni við meðhöndlun hrognanna, s.s. að dauð hrogn hafi ekki verið fjarlægð tímanlega sem leiddi til sveppasýkingar.

##### *Lifun*

Lifunarhlutfall fram að 3 vikum eftir frjóvgun frá klaki og eftir 3 vikur eftir frjóvgun er yfirleitt 90% eða meiri í samanburðarhópum en allt niður í 80% lifunarhlutfall í samanburðarhópum snemma á lífsferlinum er ekki áhyggjuefni. Innan við 80% lifunarhlutfall í samanburðarhópum gæti gefið tilefni til áhyggna og getur bent til ófullnægjandi hreinsunar kersins sem leiðir til þess að fiskseiði tapast vegna sjúkdóms eða kafna vegna lítils hlutfalls af uppleystu súrefni. Dauðsföll geta líka orðið í tengslum við meiðsli þegar tankurinn er hreinsaður og ef fiskseiði tapast ofan í niðurfallskerfi tanksins.

##### *Vítellógenín-gen*

Þó að raungildi vítellógenín-gensins (vtg), gefið upp sem afrit/ng af mRNA samtals, geti verið mjög mismunandi milli rannsóknarstofa vegna verkferla eða tækjabúnaðar sem er notaður skal hlutfall vítellógeníns vera u.þ.b. 200-falt meira í hrygnum í samanburðarhóp en hjá hængum í samanburðarhóp. Það er ekki óalgengt að þetta hlutfall sé allt að 1000 til 2000, þó eru hlutföll sem eru undir 200 grunsamleg og geta bent til vandkvæða í tengslum við mengun sýnis eða vandkvæða varðandi verkferli og/eða prófefni sem eru notuð.

##### *Annars stigs kyneinkenni*

Að því er varðar hænga er eðlilegt bil milli annars stigs kyneinkenna, skilgreint sem heildarfjöldi hluta í geislunum á raufarugganum sem eru með totur, 40–80 hlutar 9–10 vikum eftir frjóvgun. Um 15 vikum eftir frjóvgun skal bilið hjá hængum í samanburðarhópnum vera u.þ.b. 80–120 og 0 hjá hrygnum. Í sjaldgæfum tilvikum eru af óútskýrðum ástæðum engar totur á sumum hængum 9 vikum eftir frjóvgun en þar eð totur vaxa á öllum hængum í samanburðarhópum eigi síðar en 15 vikum eftir frjóvgun stafar þetta líklega af seinkaðri þroskun. Ef hrygnur í samanburðarhóp eru með totur bendir það til þess að XX-hængar séu í stofninum.

*XX-hængar*

Eðlileg bakgrunnstíðni XX-hænga í rækt virðist vera u.þ.b. 4% eða minna við 25 °C en tíðnin eykst við hækkandi hitastig. Gera skal ráðstafanir til að lágmarka hlutfall XX-hænga í stofninum. Þar eð tíðni XX-hænga virðist hafa erfðafræðilegan þátt og er því arfgeng er það áhrifarík leið til að draga úr tíðni XX-hænga í stofninum að vakta ræktunarstofninn og tryggja að XX-hængar séu ekki notaðir til að fjölga í ræktunarstofninum.

*Hrygningarvirkni*

Hrygningarvirkni í samhliða prófunum fyrir samanburðina skal vöktuð daglega áður en mat á frjósemismætti er innt af hendi. Hægt er að gera eigindlegt sjónrænt mat á samanburðarpörunum til að sjá merki um hrygningarvirkni. Flest pör í samanburðinum ættu að hrygna 12–14 vikum eftir frjóvgun. Ef pör sem hrygna eru fá á þessum tímapunkti bendir það til mögulegra vandkvæða í tengslum við heilbrigði, þroskun eða velferð fiskanna.

*Frjósemismáttur*

Heilbrigður, vel fóðraður japanskur rískarpi 12–14 vikum eftir frjóvgun hrygnir alla jafna daglega og framleiðir á bilinu 15 til 50 hrogn á dag. Hrognaframleiðsla hjá 16 af þeim 24 undaneldispörum í samanburðinum sem mælt er með (> 65%) skal vera meiri en 20 hrogn á dag og má fara í allt að 40 hrogn á dag. Minna magn en þetta getur bent til óþroskaðra, vannærðra eða óheilbrigðra hrygningarpara.

*Frjósemi*

Hundraðshluti frjórra hrogn hjá hrygningarpörum í samanburðinum er yfirleitt í kringum 90% og gildi sem eru 95% og hærri eru ekki óalgeng. Frjósemishlutfall hrogn í samanburðarhópnum sem er undir 80% er grunsamlegt og getur annaðhvort bent til óheilbrigðra einstaklinga eða að skilyrðin í ræktuninni séu ekki eins og best er á kosið.

## 5. viðbætur

## DÆMI UM FÓÐRUNARÁÆTLUN

Dæmi um fóðrunaráætlun til að tryggja fullnægjandi vöxt og þroskun til að styðja kröftuga æxlun er að finna í töflu 1. Frávik frá þessari fóðrunaráætlun geta verið ásættanleg en mælt er með að gerðar séu prófanir á þeim til að sannreyna að hægt sé að sjá ásættanlegan vöxt og æxlun. Í því skyni að fylgja tillagðri fóðrunaráætlun þarf að ákvarða þurrvigt saltvatnsrækju miðað við rúmmál fljótandi saltvatnsrækjulausnar áður en prófunin hefst. Þetta er hægt að gera með því að veða skilgreint rúmmál fljótandi saltvatnsrækjulausnar sem hefur verið þurrkuð í 24 klst. við 60 °C í forvigtuðum skálum. Til að gera ráð fyrir þyngd saltsins í fljótandi lausninni skal einnig þurrka og vigta sama magn af sömu saltlausn og notuð er í fljótandi lausninni og draga það frá þyngd þurrkaðrar fljótandi saltvatnsrækjulausnar. Að öðrum kosti er hægt að sía saltvatnsrækjuna og hreinsa hana með eimuðu vatni fyrir þurrkun og útiloka þar með þörfina á að vigta þyngd „saltblanka“. Þessar upplýsingar eru notaðar til að umreikna upplýsingarnar í töflunni úr þurrvigt saltvatnsrækju yfir í rúmmál fljótandi saltvatnsrækjulausnar, sem á að fóðra fiskana á, á hvern fisk. Að auki er mælt með því að deiliskammtar af fljótandi saltvatnsrækjulausninni séu vigtaðir vikulega til að sannreyna að fóðrad sé með réttu þurrvigt saltvatnsrækjunnar.

Tafla 1

## Dæmi um fóðrunaráætlun

Tími (eftir klak)	Saltvatnsrækja (mg þurrvigt/fiskur/dag)
Dagur 1	0,5
Dagur 2	0,5
Dagur 3	0,6
Dagur 4	0,7
Dagur 5	0,8
Dagur 6	1,0
Dagur 7	1,3
Dagur 8	1,7
Dagur 9	2,2
Dagur 10	2,8
Dagur 11	3,5
Dagur 12	4,2
Dagur 13	4,5

Tími (eftir klak)	Saltvatnsrækja (mg þurrvig/fiskur/dag)
Dagur 14	4,8
Dagur 15	5,2
Dagur 16–21	5,6
Vika 4	7,7
Vika 5	9,0
Vika 6	11,0
Vika 7	13,5
Vika 8–aflifunar	22,5

## 6. viðbætur

## DÆMI UM HROGNARÆKTUNARHÓLF

## Dæmi A



Þessi ræktunarkassi samanstendur af þverskornu skilvinduglassi úr gleri, tengd með slíf úr ryðfríu stáli og haldið á sínum stað með skrúfuðum tappa skilvinduglassins. Litlu röri úr gleri eða ryðfríu stáli er stungið gegnum tappann og staðsett nálægt hvelfdum botninum, úr því er lofti blásið varlega til að halda hrognunum á floti og þannig dregið úr því að rotverusveppasýking flytjist milli hrognanna ásamt því að íðefnaskiptin milli ræktunarkassans og eldistanksins verða auðveldari.

## Dæmi B





Þessi ræktunarkassi samanstendur af glersívalningi (5 cm að þvermáli og 10 cm á hæð) og ryðfríu vírneti (0.25  $\phi$  og 32 möskvar) sem er fest við botninn á sívalningnum með hring úr pólýtetraflúoretýleni. Ræktunarkassarnir hanga neðan úr lyftislá (e. *lifting bar*) á tönkunum og eru hristir lóðrétt (u.þ.b. 5 cm sveifluvídd) í viðeigandi lotu (u.þ.b. á 4 sekúndna fresti) að því er varðar hrogn úr japönskum rískarpa.

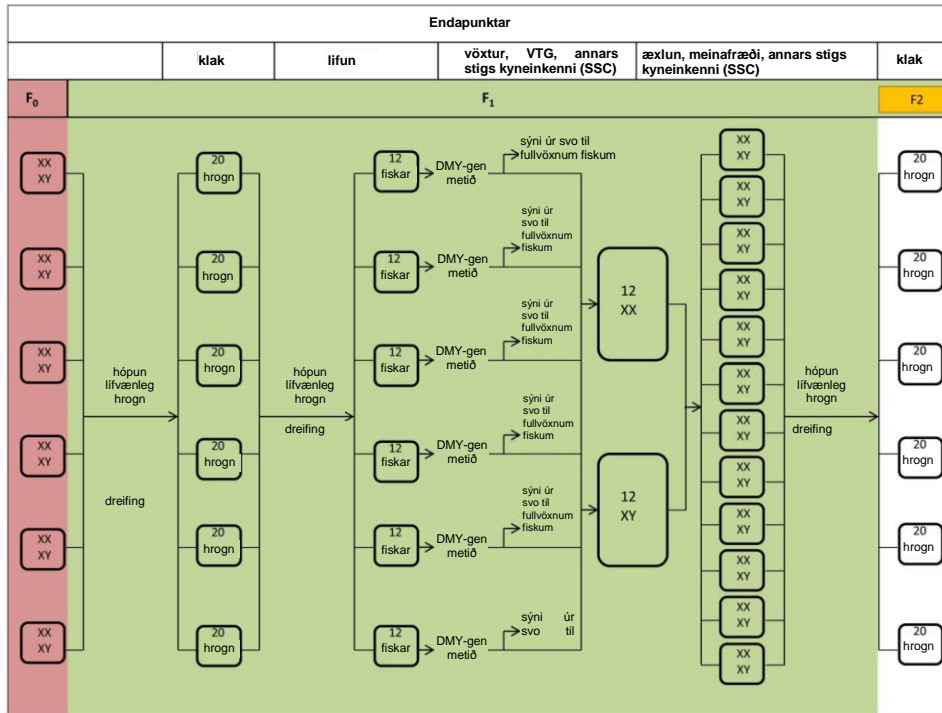


7. viðbætur

SKÝRINGARMYND YFIR HÓPUN OG SKIPTINGU Í SAMHLIÐA PRÓFANIR Í ALLRI FRAMLENGDU EINNAR KYNSLÓÐAR ÆXLUNARPRÓFUNINNI Á JAPÖNSKUM RÍSKARPA (MEOGRT)

Mynd 1

**Hópun og endurskipting í samhliða prófanir í allri framlengdu einnar kynslóðar æxlunarprófuninni á japönskum rískarpa (MEOGRT). Myndin sýnir eina meðferð eða 1/2 samanburðarhóp. Vegna hópunar er auðkenni samhliða prófunar ekki það sama í allri prófuninni. Veita skal því athygli að hugtakið „hrogn“ á við um lífvænleg, frjónuguð hrogn (jafngildi fósturvísa).**



**Meðferðir og samhliða prófun.**

Í prófunaraðferðinni er mælt með 5 prófunariðefnameðferðum þar sem notað er efni af tæknilegum hreinleika og neikvæður samanburður. Fjöldi samhliða prófana í hverri meðferð helst ekki stöðugur í allri framlengdu einnar kynslóðar æxlunarprófuninni á japönskum rískarpa (MEOGRT) og fjöldi samhliða prófana í samanburðarmeðferðinni er tvöfalt fleiri en í einni prófunariðefnameðferð. Að því er varðar F0-kynslóðina eru 6 samhliða prófanir í hverri prófunariðefnameðferð en í neikvæðu samanburðarmeðferðinni eru 12 samhliða prófanir. Eindregið er ráðið frá því að nota leysi og ef hann er notaður skal rökstuðningur fyrir notkun leysisins og fyrir vali á leysi koma fram í skýrslunni um framlengdu einnar kynslóðar æxlunarprófunina á japönskum rískarpa (MEOGRT). Ef leysir er notaður er einnig nauðsynlegt að nota tvenns konar samanburð: a) samanburð með leysi og b) neikvæðan samanburð. Hvor þessara samanburðarhópa um sig skal samstanda af heilu setti af samhliða prófunum á öllum stigum innan framlengdu einnar kynslóðar æxlunarprófunarinnar á japönskum rískarpa (MEOGRT). Meðan prófunarlífverur í F1-kynslóðinni þroskast (og í F2-kynslóðinni fram að klaki) helst þessi samhliða prófunaruppbygging eins. Á fullvaxna stiginu, þegar undaneldispör af F1-kynslóðinni eru sett saman, er þó ákjósanlegt að tvöfalda fjölda undaneldispara í samhliða prófunum í hverri meðferð; þess vegna eru allt að 12 pör samhliða prófunar í hverri prófunariðefnameðferð og 24 pör samhliða prófunar í samanburðarhópnum (og önnur 24 pör samhliða prófunar í samanburði með leysi, ef þörf krefur). Klak fósturvísa, sem pör af F1-kynslóðinni hafa gótið, er rannsakað með sömu samhliða prófunaruppbyggingu og var notuð fyrir fósturvísana sem F0-kynslóðin gaut sem þýðir að í upphafi eru 6 samhliða prófanir á hverja prófunariðefnameðferð og 12 samhliða prófanir í samanburðarhópnum eða -hópnum.

## 8. viðbætur

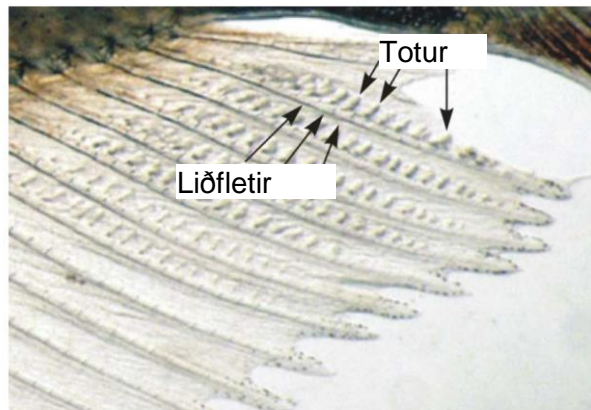
## TALNING Á RAUFARUGGATOTUM

**Helstu tæki og prófefni**

- Krufningarsmásjá (með áfastri myndavél ef þess er óskað)
- Festiefni (t.d. Davidson (ekki er mælt með Bouin)) ef ekki er talið á mynd

**Verkferli**

Eftir krufningu skal taka mynd af raufarugganum til að auðvelt sé að telja raufaruggatoturnar. Þó að myndataka sé sú aðferð sem mælt er með er hægt að festa raufaruggann með Davidson-festiefni eða öðru viðeigandi festiefni í u.þ.b. 1 mínútu. Mikilvægt er að raufarugginn liggi flatur meðan hann er festur til að það sé auðveldara að telja raufaruggatoturnar. Hægt er að geyma skrokkinn með raufarugganum í Davidson-festiefni eða öðru viðeigandi festiefni fram að greiningu. Teljið fjölda liðflata (sjá **mynd 1**) með totur sem standa upp af aftari brún liðflatarins.

*Mynd 1***Raufaruggatotur**

### 9. viðbætur

NÁKVÆM TÍMALÍNA FYRIR FRAMLENGDA EINNAR KYNSLÓÐAR ÆXLUNARPRÓFUN Á JAPÖNSKUM RÍSKARPA (MEOGRT)

#### Prófunarvikur 1–3 (F0-kynslóðin)

Hrygningarpör af F0-kynslóðinni, sem hafa uppfyllt valviðmiðanirnar (sjá 16.–20. lið), eru látin verða fyrir váhrifum í þrjár vikur til að kynfrumur og kynkirtlavefur, sem eru að þroskast, verði fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu. Hver tankur samhliða prófunar hefur að geyma eitt undaneldispar (XX-hrygna XY-hængur undaneldispar). Hrognum í goti er safnað saman, þau talin og metin m.t.t. frjósemi í 21 dag samfellt sem hefst á prófunardegi 1.

#### Prófunarvika 4 (F0-kynslóðin og F1-kynslóðin)

Ákjósanlegt er að frjóvguðum og lífvænlegum hrognum (fósturvísium) sé safnað á einum degi; ef fósturvísar eru ekki nógu margir má þó safna þeim á tveimur dögum. Ef söfnunin stendur í tvo daga eru allir fósturvísar innan meðferða, sem var safnað fyrri daginn, hópaðir með þeim sem var safnað seinni daginn. Síðan er öllum hópuðu fósturvísunum í hverri meðferð dreift af handahófi í hvern ræktunarkassa samhliða prófunar með 20 fósturvísa í hverjum ræktunarkassa. Dánartíðni hjá frjóvguðum hrognum (fósturvísium) er athuguð og skráð daglega. Dauð hrogn eru fjarlægð úr ræktunarkössunum (dauði frjóvgðra hrogn getur, einkum á fyrstu stigum, markast af greinileg minnkun á gagnsæi og litarbreytingu, einkum á fyrstu stigum, sem orsakast af kekkjun og/eða útfellingu prótína og veldur því að þau verða hvít og ógagnsæ OECD 2010).

Athugasemd: Ef annan söfnunardag þarf fyrir eina meðferð þarf að fylgja þessu verklagi í öllum meðferðum (þ.m.t. samanburðarprófanir). Ef ekki eru nógu margir fósturvísar innan meðferðar eftir annan söfnunardaginn til að hver ræktunarkassi sé hlaðinn með 20 fósturvísium skal fækka fjölda fósturvísa, sem er hlaðið innan þeirrar tilteknu meðferðar, niður í 15 fósturvísa í hvern ræktunarkassa. Ef ekki eru nógu margir fósturvísar til að hlaða hvern ræktunarkassa með 15 fósturvísium skal fækka fjölda ræktunarkassa sameiginlegra prófana þangað til fósturvísarnir duga til að setja 15 í hvern ræktunarkassa. Að auki er hægt að bæta fleiri undaneldisþörum í hverja meðferð og samanburði í F0-kynslóðinni til að framleiða fleiri hrogn til að ná 20 í hverja samhliða prófun eins og mælt er með.

Á prófunardegi 24 eru undaneldisþör af F0-kynslóðinni aflífuð á mannúðlegan hátt og þyngd og lengd skráð. Ef nauðsyn krefur má e.t.v. halda undaneldisþörum af F0-kynslóðinni í 1–2 daga til viðbótar til að koma F1-kynslóðinni af stað aftur.

#### Prófunarvika 5–6 (F1-kynslóðin)

Einum til tveimur dögum áður en búist er við að klak hefjist skal hætta hristingi hrognanna í ræktuninni eða draga úr honum til að flýta fyrir klaki. Eftir því sem fósturvísarnir klekjast út daglega eru nýklakin hrogn hópuð eftir meðferð og dreift á kerfisbundinn hátt í hvern seiðatank samhliða prófunar innan tiltekinnar meðferðar með að hámarki 12 nýklakin hrogn í hverjum. Þetta er gert með því að velja nýklakin hrogn af handahófi og setja eitt hrogn í einu tilviljanakennt í hvern hóp samhliða prófunar og fara eftir röð samhliða prófunaríláta þangað til komin eru 12 nýklakin hrogn í hverja samhliða prófun innan meðferðar. Ef það eru ekki nógu mörg nýklakin hrogn til að fylla allar samhliða prófanir skal tryggja að það séu 12 nýklakin hrogn í eins mörgum samhliða prófunum og unnt er til að koma F1-kynslóðarfasanum af stað.

Hrogn sem hafa ekki klakist út þegar tvöfalt lengri tími en miðgildisdagurinn í samanburðarhópnum er liðinn teljast ólífvænleg og er fleygt. Fjöldi nýklakinna hrogn er skráður og árangur í klaki (klakgeta) reiknaður út í hverri samhliða prófun.

#### Prófunarvikur 7–11 (F1-kynslóðin)

Lifun fiskseiða er athuguð og skráð daglega í öllum samhliða prófunum. Á prófunardegi 43 er fjöldi lifandi fiska í hverri samhliða prófun skráður sem og upphaflegur fjöldi nýklakinna hrogn sem voru sett í samhliða prófunina (að lágmarki 12). Þetta gerir það kleift að reikna út hundraðshlutfall lifunar frá klaki að því stigi þegar fiskurinn er svo til fullvaxinn.

**Prófunarvika 12 (F1-kynslóðin)**

Á prófunardegi 78–85 er tekið lítið sýni úr sporðugganum á hverjum fiski til að ákvarða arfgerðarlegt kyn einstaklingsins (þ.e. uggaklipping) að því er varðar hvern fisk. Þessar upplýsingar eru notaðar til að koma á undaneldispörum.

Innan þriggja daga frá því að arfgerðarlegt kyn hvers fisks er ákvarðað eru 12 undaneldispör í hverri meðferð og 24 pör í hverjum samanburði sett saman af handahófi. Tveir XX- og XY-fiskar úr hverri samhliða prófun eru valdir af handahófi og síðan hópaðir eftir kyni, þar næst valdir af handahófi til að koma á undaneldispörum (þ.e. XX-XY pari). Að lágmarki 12 samhliða prófunum á hverja íðefnameðferð og a.m.k. 24 samhliða prófunum fyrir samanburðinn er komið á með eitt undaneldispar í hverri samhliða prófun. Ef samhliða prófun inniheldur ekki annaðhvort tvo XX-fiska eða tvo XY-fiska, sem eru tiltækir til hópunar, skal fá fisk af viðeigandi arfgerðarkyni úr öðrum samhliða prófunum innan meðferðarinnar.

Fiskarnir sem eftir eru (að hámarki 8 fiskar í hverri samhliða prófun) eru aflífaðir á mannúðlegan hátt og tekin sýni til að meta mismunandi endapunkta svo til fullvaxinna fiska. Gögn um dmy-gen (XX eða XY) fyrir öll sýni úr svo til fullvöxnum fiskum eru geymd til að tryggja að hægt sé að tengja öll endapunkturagögn við erfðafræðilegt kyn hvers fisks fyrir sig.

**Prófunarvikur 13–14 (F1-kynslóðin)**

Váhrifin halda áfram meðan svo til fullvaxin undaneldispör þroskast og verða fullvaxin. Á prófunardegi 98 (þ.e. daginn áður en söfnun hrognna hefst) eru hrognin fjarlægð, bæði úr kerinu og af hrygnunum.

**Prófunarvikur 15–17 (F1-kynslóðin)**

Hrognum í goti er safnað saman í 21 dag samfelld í hverri samhliða prófun og metin m.t.t. frjósemismáttar og frjósemi.

**Prófunarvika 18 (prófunarvika 4 endurtekin) (F1-kynslóðin og F2-kynslóðin)**

Að morgni prófunardags 120 er hrognum safnað í hverjum tanki samhliða prófunar. Hrogn sem er safnað eru metin og frjóvguð hrogn (hrognþræðir fjarlægðir) frá hverju undaneldispari fyrir sig eru hópuð eftir meðferð og dreift á kerfisbundinn hátt í hrognaræktunarkólfin með 20 frjóvguð hrogn í hverjum ræktunarkassa. Setja má ræktunarkassana í aðskilda „ræktunartanka“ sem eru settir upp fyrir hverja meðferð, eða í tank samhliða prófunar sem kemur til með að innihalda klöktu seiðin eftir hrygningu. Ákjósanlegt er að fósturvísunum sé safnað á einum degi; ef fósturvísarnir eru ekki nógu margir má þó safna þeim á tveimur dögum. Ef söfnunin stendur í tvo daga eru allir fósturvísar innan meðferða, sem var safnað fyrri daginn, hópaðir með þeim sem var safnað seinni daginn. Síðan er öllum hópuðu fósturvísunum í hverri meðferð dreift af handahófi í hvern ræktunarkassa samhliða prófunar með 20 fósturvísar í hverjum ræktunarkassa. Athugasemd: Ef annan söfnunardag þarf fyrir eina meðferð þarf að fylgja þessu verklagi í öllum meðferðum (þ.m.t. samanburðarprófanir). Ef ekki eru nógu margir fósturvísar innan meðferðar eftir annan söfnunardaginn til að hver ræktunarkassi sé hlaðinn með 20 fósturvísarum skal fækka fjölda fósturvísar, sem er hlaðið innan þeirrar tilteknu meðferðar, niður í 15 fósturvísar í hvern ræktunarkassa. Ef ekki eru nógu margir fósturvísar til að hlaða hvern ræktunarkassa með 15 fósturvísarum skal fækka fjölda ræktunarkassa sameiginlegra prófana þangað til fósturvísarnir duga til að setja 15 í hvern ræktunarkassa.

Á prófunardegi 121 (eða prófunardegi 122 til að tryggja að F2-kynslóðinni hafi verið komið vel af stað) eru undaneldispör af F1-kynslóðinni aflífuð á mannúðlegan hátt og greining gerð m.t.t. endapunkta fullvaxinna fiska. Ef nauðsyn krefur má e.t.v. halda undaneldispörum af F1-kynslóðinni í 1–2 daga til viðbótar til að koma F2-kynslóðinni aftur af stað.

**Prófunarvikur 19–20 (F2-kynslóðin)**

Einum til tveimur dögum áður en búist er við að klak hefst skal hætta hristingi hrognanna í ræktuninni eða draga úr honum til að flýta fyrir klaki. Ef prófuninni er hætt af því að klaki F2-kynslóðarinnar lýkur eru nýklöktu hrognin talin daglega og þeim fleygt. (Fósturvísar sem hafa ekki klakist eftir framlengdan ræktunartíma, skilgreindur sem tvöfalt lengri tími en miðgildisdagurinn í samanburðarhópnum, teljast ólífvænlegir).

*10. viðbætur*

## TÖLFRÆÐILEG GREINING

Þær tegundir líffræðilega gagna sem verða til í framlengdri einnar kynslóðar æxlunarprófun á japönskum rískarpa (MEOGRT) eru ekki einkvæmar fyrir hana og margar viðeigandi tölfraðilegar aðferðir hafa verið þróaðar, nema fyrir meinafræðileg gögn, til að greina svipuð gögn á tilhlýðilegan hátt með hliðsjón af eiginleikum gagnanna, þ.m.t. normleiki, einsleitni dreifni, hvort hönnun rannsóknar opnar möguleika á tilgátuprófun eða aðhvarfsgreiningu, stikabundin próf eða óstikabundin próf o.s.frv. Almenn meginregla er sú að tillagða tölfraðilega greiningin fylgi ráðleggingum Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir vísiteturhrifagögn (OECD 2006) og hægt er að sjá flæðirit til hjálpar við ákvörðun á framlengdu einnar kynslóðar æxlunarprófuninni á japönskum rískarpa (MEOGRT) á mynd 2.

Gengið er út frá því að gagnamengin sýni yfirleitt einhalla svananir. Að auki skal íhuga hvort nota skuli einhliða tölfraðipróf eða tvíhliða tölfraðipróf. Lagt er til að einhliða próf séu notuð nema það séu líffræðileg rök sem gera einhliða próf óhentug. Í eftirfarandi hluta er mælt með tilteknum tölfraðiprófum en ef tölfraðilegar aðferðir, sem eiga betur við og/eða eru með meiri styrk, eru þróaðar til notkunar á þau sértæku gögn sem verða til í framlengdri einnar kynslóðar æxlunarprófun á japönskum rískarpa (MEOGRT) skal nota þau tölfraðipróf til að nýta þessa kosti.

Greina skal gögn úr framlengdri einnar kynslóðar æxlunarprófun á japönskum rískarpa (MEOGRT) aðskilið fyrir hvort arfgerðarlegt kyn. Það eru tvær aðferðir til að greina gögn um kynskipta fiska (annaðhvort XX-hængar eða XY-hrygnur). 1) Öll gögn um kynskipta fiska í allri prófuninni eru felld brott nema um algengi kynskiptingar í hverri samhliða prófun. 2) Gögn um alla kynskipta fiska eru skilin eftir í gagnamenginu og greining gerð á grundvelli arfgerðar.

**Vefjameinafræðileg gögn**

Gert er grein fyrir vefjameinafræðilegum gögnum sem alvarleikastigafjölda sem er metinn með því að nota nýlega þróaða tölfraðiaðferð, RSCABS-próf (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) (Green o.fl., 2014). Í Rao-Scott-aðlöguninni eru upplýsingum um samhliða prófanir haldið eftir; í verkferlinu „í sneiðum“ eru felldar inn þær líffræðilegu væntingar að alvarleikastigafjöldi hafi tilhneigingu til að aukast með auknum meðferðarstyrkleikum. Að því er varðar hverja greiningu er tilgreint í niðurstöðum RSCABS-prófs í hvaða meðferðum er hærra algengi meinafræðilegra tilvika en í samanburðarhópum og tengt alvarleikastig.

**Gögn um frjósemismátt**

Greiningar á gögnum um frjósemismátt samanstanda af Jonckheere-Terpstra með stíglækkun eða Williams-prófi til að ákvarða áhrif meðferðar, að því tilskildu að gögnin séu í samræmi við einhalla styrkháða svörun. Með prófi með stíglækkun er allur samanburður gerður með marktækni sem nemur 0,05 og engin aðlögun er gerð á fjölda samanburða. Búist er við að gögnin séu í samræmi við einhalla styrkháða svörun en þetta er hægt að sannreyna, annaðhvort með sjónrænni skoðun á gögnunum eða með því að gera línulegt og annars stigs samanburðarfall á meðaltali meðferðar eftir staðlaða röðunarvörpun á gögnunum. Gerð er leitniþrófun nema annars stigs samanburðarfallið sé marktækt og línulega samanburðarfallið ómarktækt. Að öðrum kosti er Dunnnett-próf notað til að ákvarða áhrif meðferðar ef gögnin eru normaldreifð með einsleitri dreifni. Ef þessar kröfur eru ekki uppfylltar er notað Dunn-próf með Bonferonni-Holm-aðlögun. Öll tilgreind próf eru gerð óháð öllum F-eða Kruskal-Wallis-prófum. Frekari upplýsingar eru veittar í OECD 2006.

Hægt er að nota staðgönguaðferðir, s.s. almenn línuleg líkön með Poisson-skekkjum, fyrir hrognatalninguna (án vörpunar) ef tölfraðileg rök eru færð fyrir því (Cameron og Trividi, 2013). Mælt er með tölfraðilegri ráðgjöf ef staðgöngukostur er valinn.

### Dagleg hrognatalning í einni kynslóð

Í dreifnigreiningarlíkaninu (ANOVA) er  $Y = \text{tími} * \text{tími} + \text{meðferð} + * \text{meðferð} + \text{tími} * \text{meðferð} + * \text{tími} * \text{meðferð}$ , með handahófskenndum áhrifum á samhliða prófun (kynslóð \* meðferð), og tími \* samhliða prófun (meðferð), sem gerir kleift að vera með ójafna dreifniþætti af báðum tegundum milli kynslóða. Hér á *tími* við um tíðni hrognatalninga (t.d. dagur eða vika). Þetta er greining með endurteknum mælingum þar sem fylgni milli athugana á sömu samhliða prófununum skýrir eðli gagnanna með endurteknum mælingum.

Aðaláhrif *meðferðar* eru prófuð með því að nota Dunnett- (eða Dunnett-Hsu-) próf sem er aðlagð vegna fjölda samanburða. Þörf er á aðlögun vegna aðaláhrifa frá *kynslóð* eða *tíma* vegna þess að það eru engin „samanburðar“ gildi fyrir þessa tvo þætti og hvert par af gildum er samanburður sem getur skipt máli. Að því er varðar þessi tvö aðaláhrif er hægt, ef F-próf fyrir aðaláhrif er marktækt við gildið 0,05, að prófa parasamanburð á þessum þætti þvert á gildin við 0,05 án frekari aðlögunar.

Líkanið inniheldur tveggja og þriggja þátta víxlverkun þannig að aðaláhrif fyrir t.d. *tíma* eru e.t.v. ekki marktæk jafnvel þó að *tími* hafi marktæk áhrif á niðurstöðurnar. Ef tveggja eða þriggja þátta víxlverkun sem felur í sér *tíma* er marktæk við gildið 0,05 er því hægt að samþykkja samanburð á gildum fyrir *tíma* við marktæknina 0,05 án frekari aðlögunar.

Næst koma F-próf fyrir marktækni *meðferðar* innan *tíma*, svokallaðar „sneiðar“ í dreifnigreiningartöflunni. Ef t.d. „sneið“ fyrir *meðferð* í F1-kynslóðinni og *tíma* 12 er marktæk við gildið 0,05 er hægt að samþykkja parasamanburð fyrir *meðferð* í F1-kynslóðinni og *tíma* 12 við gildið 0,05 án frekari aðlögunar. Svipaðar fullyrðingar gilda um próf varðandi *tíma* í F1-kynslóðinni og *meðferð* og fyrir *kynslóð* innan *tíma* og *meðferðar*.

Að lokum, að því er varðar samanburði sem falla ekki undir neinn af framantöldum flokkum, skal aðlaga samanburðina með því að nota Bonferroni-Holm-aðlögun á p-gildin. Frekari upplýsingar um greiningar á slíkum líkönum er að finna í Hocking (1985) og Hochberg og Tamhane (1987).

Að öðrum kosti eru óunnin gögn skráð og lögð fram í rannsóknarskýrslunni sem frjósemismáttur (fjöldi hrogn) í hverri samhliða prófun/dag. Reikna skal út meðaltal óunninna gagna í samhliða prófun og beita síðan kvaðratrótarvörpun. Reikna skal út einhliða dreifnigreiningu á vörpuðu meðaltali úr samhliða prófunum og síðan Dunnett-samanburðarfall. Einnig getur komið að gagni að skoða sjónrænt gögn um frjósemismátt fyrir hverja meðferð og/eða samhliða prófun með punktariti sem sýnir gögnin yfir tímabilið. Með þessu er hægt að gera óformlegt mat á mögulegum áhrifum yfir tímabilið.

### Öll önnur líffræðileg gögn

Tölfræðilegar greiningar eru byggðar á þeirri undirliggjandi forsendu að með viðeigandi vali á skammti verði gögnin einhalla. Þannig er gengið út frá því að gögn séu einhalla og þau eru formlega metin m.t.t. einhalla með því að nota línulegt samanburðarfall og annars stigs samanburðarfall. Ef gögnin eru einhalla er mælt með Jonckheere-Terpstra leitniþrófi á miðgildi samhliða prófunar (eins og ráðlagt er í OECD 2006). Ef annars stigs samanburðarfallið er marktækt en línulega samanburðarfallið ómarktækt teljast gögnin ekki vera einhalla.

Ef gögnin eru ekki einhalla, einkum vegna minni svörunar einna eða tveggja meðferða með hæsta styrkinn, skal taka til athugunar að fella gagnamengið brott þannig að greiningin sé framkvæmd án þessara meðferða. Þessa ákvörðun verður að taka samkvæmt sérfræðiáliti og öllum tiltækum gögnum, einkum gögnum sem benda til augljósra eiturrhifa á þessum meðferðarstigum.

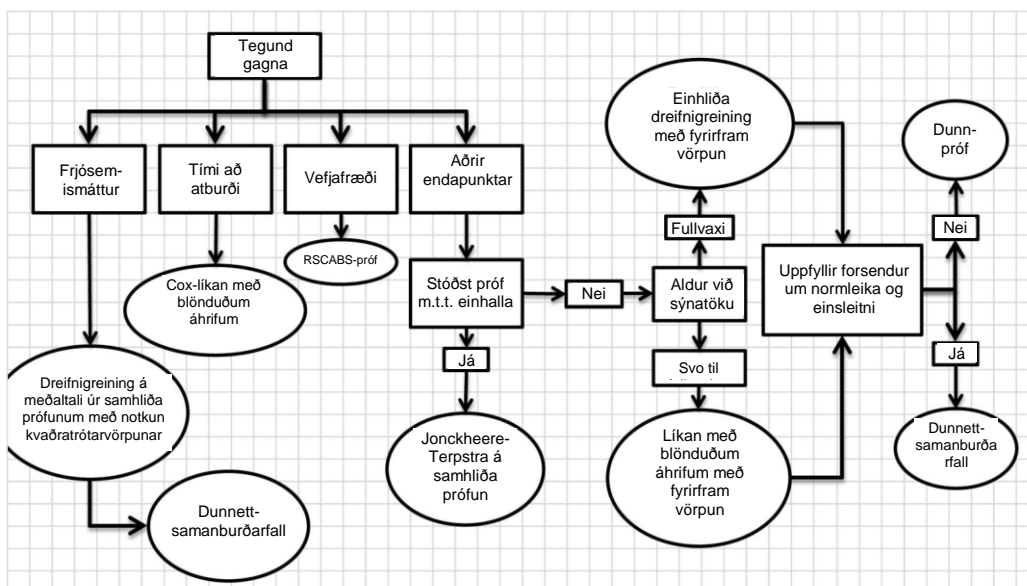
Að því er varðar þyngd og lengd er ekki mælt með vörpun þó að slíkt kunni e.t.v. stundum að vera nauðsynlegt. Þó ert mælt með lograðri vörpun fyrir vítellógeníngögnin; mælt er með kvaðratrótarvörpun fyrir gögn um annars stigs kyneinkenni (SSC) (raufaruggatotur); mælt er með arcsine-kvaðratrótarvörpun fyrir gögn um hlutfall klaks, hundraðshlutfall lifunar, kynjahlutfall og hundraðshlutfall frjórna hrogn. Tími fram að klaki og tími fram að fyrstu hrygningu skal meðhöndlaður sem „tími að atburði“ (e. *time to event data*) þar sem einstakir fósturvísar, sem klekjast ekki á skilgreindu tímabili, eða samhliða prófanir, þar sem engin hrygning verður, eru meðhöndluð sem hægristýfð gögn. Tími fram að klaki skal reiknaður út frá miðgildisdegi klaks í hverri samhliða prófun. Þessa endapunkta skal greina með því að nota líkan Cox fyrir hlutfallslega áhættu með blönduðum áhrifum (e. *mixed-effects Cox proportional hazard model*).

Í líffræðilegum gögnum um sýni úr fullvöxnum fiskum er ein mæling úr hverri samhliða prófun, þ.e. það er einn XX-fiskur og einn XY-fiskur í hverju kerfi samhliða prófunar. Þess vegna er mælt með því að gera einhliða dreifnigreiningu á meðaltali úr samhliða prófunum. Ef forsendur dreifnigreiningarinnar (normleiki og einsleitni dreifni eins og þau eru metin á leifum dreifnigreiningarinnar með Shapiro-Wilks-prófi og Levene-prófi, eftir því sem við á) eru uppfylltar skal nota Dunnetsamanburðarfall til að ákvarða þær meðferðir sem voru frábrugðnar samanburðinum. Á hinn bóginn skal, ef forsendur dreifnigreiningarinnar eru ekki uppfylltar, gera Dunn-próf til að ákvarða hvaða meðferðir voru frábrugðnar samanburðinum. Mælt er með svipuðu verklagi fyrir gögn sem eru gefin upp sem hundraðshluti (frjósemi, klak og lifun).

Líffræðileg gögn um sýni úr svo til fullvöxnum fiskum eru með 1 til 8 mælingar á hverja samhliða prófun, þ.e. það getur verið breytilegur fjöldi einstaklinga sem leggja sitt af mörkum í meðaltal úr samhliða prófun fyrir hvert arfgerðarlegt kyn. Þess vegna er mælt með því að nota dreifnigreiningarlíkan með blönduðum áhrifum og því næst Dunnetsamanburðarfall ef forsendur um normleika og einsleitni dreifni voru uppfylltar (á leifum dreifnigreiningar með blönduðum áhrifum). Ef þær voru ekki uppfylltar skal gera Dunn-próf til að ákvarða hvaða meðferðir voru frábrugðnar samanburðinum.

Mynd 2

**Flæðirit yfir þær tölfræðiaðferðir sem mælt er með fyrir greiningu gagna úr framlengdri einnar kynslóðar æxlunarprófun á japönskum rískarpa (MEOGRT)**



**HEIMILDIR**

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

**C.53 GREINING Á VEXTI OG ÞROSKA FROSKDÝRALIRFA (LAGDA)**

## INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 241 um prófanir (2015). Þörfin til að þróa og fullgilda greiningu sem getur fundið skaðlegar afleiðingar váhrifa frá eitruðum íðefnum á froskdýr og lýst þeim sprettur af áhyggjum af því að magn íðefna í umhverfinu geti valdið skaðlegum áhrifum, bæði á menn og villtar lífverur. Í viðmiðunarreglu OECD um prófanir „Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA)“ (greining á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA)) er lýst eiturhrifaprófun á froskdýrategundum þar sem vöxtur og þroski er athugaður frá frjóvgun og gegnum snemmstig ungvíðistímabilsins. Þetta er greining (yfirleitt 16 vikna) þar sem þroskun á fyrstu stigum, myndbreyting, lifun, vöxtur og æxlunarþroski, að hluta til, eru metin. Hún gerir það einnig kleift að mæla samstæðu annarra endapunkta sem gefa færi á að gera greiningarmat á innkirtlatruflandi íðefnum sem grunur er um eða öðrum tegundum efna sem hafa eiturhrif á þroskun og æxlun. Aðferðin sem lýst er í þessari prófunaraðferð er leidd út af vinnu Umhverfisverndarstofnunar Bandaríkjanna (U.S. EPA) við fullgildingu með afrískum klófroskum (*Xenopus laevis*) með stuðningsvinnu frá Japan (1. heimild). Þó að unnt sé að laga aðrar froskdýrategundir að aðferðarlýsingu prófunar fyrir vöxt og þroskun, þar sem getan til að ákvarða erfðafraeðilegt kyn er mikilvægur þáttur, eiga sértækar aðferðir og athugunarendapunktur, sem eru útlistuð í þessari prófunaraðferð, einungis við um *Xenopus laevis*.
2. Greiningin á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) er prófun á froskdýrum á hærra aðferðarþrepi til að safna heildstæðari upplýsingum um tengsl milli styrks og svörunar varðandi neikvæð áhrif sem henta til notkunar við hættugreiningu og lýsingu á eiginleikum og við vistfræðilegt áhættumat. Greiningin passar á 4. stig „OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals“ (hugtakarammi Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir prófun og mat á innkirtlatruflandi íðefnum) þar sem prófanir í lífi veita einnig upplýsingar um skaðleg áhrif í tengslum við endapunkta sem skipta máli vegna innkirtla (2. heimild). Almenna tilraunahönnunin felur í sér að fósturvísar af tegundinni *X. laevis* á 8.–10. NF-stigi (Nieuwkoop og Faber) (3. heimild) eru látnir verða fyrir váhrifum frá a.m.k. fjórum mismunandi styrkleikum prófunaríðefnis (alla jafna er styrkmunur ekki minni en sem svarar hálfu log-vörpuðu bili) og samanburði, þangað til 10 vikum eftir miðgildistímann til 62. NF-stigs í samanburðarsýninu, með einu undirsýni teknu meðan á greiningunni stendur á 62. NF-stigi ( $\leq 45$  eftir frjóvgun; alla jafna u.þ.b. 45 dagar (def)). Það eru fjórar samhlíða prófanir af hverjum prófunarstyrkleika og átta samhlíða prófanir í samanburðarhópnum. Endapunktur sem eru metnir meðan váhrifin standa yfir (með undirsýninu teknu meðan á greiningunni stendur og lokasýninu þegar prófun lýkur) eru m.a. þeir sem gefa vísbendingu um almenn eiturhrif: dánartala, óeðlilegt atferli og ákvarðanir á vexti (lengd og þyngd) sem og endapunktur sem eru til þess ætlaðir að lýsa sértækum verkunarháttum eiturhrifa á innkirtla sem beinast að estrógen-, andrógen- eða skjaldkirtilsbundnum lífeðlisfræðilegum ferlum. Í aðferðinni er aðaláherslan lögð á möguleg stofntengd áhrif (þ.e.a.s. neikvæð áhrif á lifun, þroskun, vöxt og þroskun æxlunarfæra) til að reikna út styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) eða hrifstyrk sem veldur  $x$  % breytingu (EC $x$ ) á endapunktinum sem er mældur. Þó skal bent á að EC $x$ -nálganir henta sjaldan fyrir stórar rannsóknir af þessu tagi þar sem það getur verið óhagkvæmt að fjölga prófunarstyrkleikum til að unnt sé að ákvarða tilætlað EC $x$ . Einnig skal bent á að aðferðin nær ekki yfir æxlunarfásann sjálfan. Skilgreiningar sem eru notaðar í þessari prófunaraðferð er að finna í 1. viðbæti.



## ATRÍÐI, SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI, OG TAKMARKANIR

3. Vegna takmarkaðs fjölda prófaðra íðefna og rannsóknarstofa sem taka þátt í fullgildingu á þessari frekar flóknu greiningu, einkum hefur samanburðarnákvæmni milli rannsóknarstofa ekki verið skjalfest með tilraunagögnum fram að þessu, er fyrirsjáanlegt að þegar fullnægjandi fjöldi rannsókna liggur fyrir til að ganga úr skugga um áhrif þessarar nýju rannsóknarhönnunar verði OECD-viðmiðunarregla um prófanir nr. 241 rýnd og, ef nauðsyn krefur, endurskoðuð í ljósi þeirrar reynslu sem fengist hefur. Greiningin á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) er mikilvæg greining til að fjalla um mögulega þætti sem stuðla að hnignun froskdýrastofna með því að meta áhrif váhrifa frá íðefnum meðan viðkvæmt lírfustig stendur yfir þar sem áhrif á lifun og þroskun, þ.m.t. eðlileg þroskun æxlunarfæra, kunna að hafa neikvæð áhrif á stofna.
4. Prófunin er hönnuð til að greina afgerandi endapunkt(a) sem stafa(r) bæði af gangvirkjum innkirtlastarfsemi og starfsemi sem er ekki innkirtlastarfsemi og tekur til greiningarendapunkta sem eru að hluta til sértækir fyrir mikilvæg innkirtlakerfi. Það skal bent á að þar til greiningin á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) var þróuð var ekki til nein fullgilt greining fyrir froskdýr sem þjónaði þessum tilgangi.
5. Áður en greiningin hefst er mikilvægt að hafa upplýsingar um eðlisefnafræðilega eiginleika prófunaríðefnisins, einkum til að unnt sé að framleiða stöðugar íðefnalausnir. Einnig er nauðsynlegt að vera með greiningaraðferð með nægilegu næmi til að sannreyna styrkleika prófunaríðefnis. Á u.þ.b. 16 vikna tímabili útheimtir greiningin samtals 480 dýr, þ.e. fósturvísa af tegundinni *X. laevis* (eða 640 fósturvísa ef samanburður með leysi er notaður) til að tryggja að styrkur prófunarinnar sé nægur til að meta endapunkta sem skipta máli fyrir þýðið, s.s. vöxt, þroskun og æxlunarþroska.
6. Áður en þessi aðferð til prófunar á blöndu er notuð í eftirlitsskyni skal skoða hvort hún gæti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi. Enn fremur er frjóssemi ekki metin beint með þessari greiningu svo e.t.v. á hún ekki við til notkunar á herra stigi en því 4. í „OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals“ (hugtakaramma Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir prófun og mat á innkirtlatruflandi íðefnum).

## VÍSINDALEGUR GRUNDVÖLLUR FYRIR PRÓFUNARAÐFERÐINNI

7. Stór hluti af núverandi þekkingu okkar á líffræði froskdýra er fenginn með því að nota tegundina *X. laevis* sem tilraunadýr á rannsóknarstofum. Þessa tegund er unnt að rækta að staðaldri á rannsóknarstofunni, hægt er að framkalla egglos með því að nota æðabelgskynhormónavaka manna (hCG) og greiður aðgangur er að birgðum af dýrum hjá atvinnuræktendum.
8. Líkt og hjá öllum hryggdýrum er æxlun froskdýra stjórnað af undirstúku-, heiladinguls- og kynkirtlaöxli. (4. heimild). Estrógen og andrógen eru milliliðir í þessu innkirtlakerfi sem stjórna þroskun og líffæðisfræði í vefjum kynbundinnar tvíbreytni. Þessi öxull er sérlega virkur í þremur aðgreindum fösum í lífsferli froskdýra: 1) sérhæfingu kynkirtla meðan þroskun lírfanna stendur yfir, 2) þroskun annars stigs kyneinkenna og kynkirtlaþroskun meðan ungvíðisfasinn stendur yfir og 3) virkri æxlun hjá fullorðnum dýrum. Sérhver þessara þriggja þroskunarkosta er að öllum líkindum næmur fyrir innkirtlatruflun af völdum tiltekinna efna, s.s. estrógens og andrógens, sem leiðir að lokum til þess að lífverurnar tapa æxlunarþæfni.
9. Þroskun kynkirtla hefst á 43. NF-stigi þegar þroskunarlega tvíræð (e. *bipotential*) kynkirtlafelling þroskast fyrst. Sérhæfing kynkirtlanna hefst á 52. NF-stigi þegar frumkímfrumur berast annaðhvort yfir í mergvefnum (karldýr) eða halda sig á barkarsvæði (kvendýr) kynkirtlanna sem eru að þroskast (3. heimild). Á sjötta áratugnum var fyrst greint frá því að þetta ferli kynjaaðgreiningar kynkirtlanna í *Xenopus* væri næmt fyrir efnafræðilegum breytingum. (5. og 6. heimild). Váhrif af völdum estradíóls á halakörtur á þessu tímabili kynkirtlasérhæfingar leiðir til þess að karldýr skipta um kyn og þegar þau ná fullorðinsaldri verða þau fullvirk kvendýr (7.–8. heimild). Virk kynskipti kvendýra yfir í karldýr eru einnig möguleg og greint hefur verið frá slíku í kjölfar ígræðslu á eistnavef í halakörtur (9. heimild). Jafnvel þótt váhrif frá arómatasa-hemli valdi einnig virkum kynskiptum hjá *X. tropicalis* (10. heimild) hefur ekki verið sýnt fram á þetta hjá *X. laevis*. Rannsóknarsögulega séð hafa áhrif eiturfena á sérhæfingu kynkirtla verið metin með vefjafræðilegri rannsókn á kynkirtlunum við myndbreytingu og einungis var hægt að ákvarða kynskipti með greiningu á kynjahlutföllum. Þangað til

nýlega voru ekki til leiðir til að ákvarða beint erfðafræðilegt kyn *Xenopus*. Nýleg staðfesting á kynbundnum merkjum í *X. laevis* gerir það þó kleift að ákvarða erfðafræðilegt kyn og unnt að bera kennsl á kynskipt dýr.

10. Hjá karldýrum er þroski ungvíðis í takt við hærri gildi testósteróns í blóðinu sem samsvarar þróuninni á annars stigs kyneinkennum sem og þroskun eistna. Hjá kvendýrum framleiða eggjastokkarnir estradíól sem leiðir til þess að vítellógenín kemur fram í blóðvökvanum, eggfrumur með gulumyndun í eggjastokknum og eggjaleiðarar þroskast. Eggjaleiðarar eru annars stigs kyneinkenni kvendýra sem eru virk í eggfrumuþroska meðan æxlun stendur yfir. Hlaupkenndur hjúpur myndast utan um eggfrumurnar þegar þær fara gegnum eggjaleiðarann og safnast saman í eggjapokanum (e. *ovisac*), tilbúin til frjóvgunar. Þroskun eggjaleiðara virðist stýrt af estrógeni því það er fylgni milli þroskunar og estradíólgilda í blóði *X. laevis* (13. heimild) og *X. tropicalis* (12. heimild). Greint hefur verið frá þroskun eggjaleiðara í karldýrum eftir váhrif frá fjöklóruðum bifénylsamböndum (14. heimild) og 4-tert-oktylfenóli (15. heimild).

#### MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

11. Tilhögun prófunarinnar felur í sér að fósturvísar af tegundinni *X. laevis* á 8.–10. NF-stigi eru látnir verða fyrir váhrifum í vatni frá fjórum mismunandi styrkleikum prófunaríðefnis, sem og samanburði, þangað til 10 vikum eftir miðgildistímann til 62. NF-stigs í samanburðarsýninu, með einu undirsýni teknu meðan á greiningunni stendur á 62. NF-stigi. Þó að það sé e.t.v. einnig mögulegt að gefa mjög vatnsfælin íðefni með fóðri hefur lítil reynsla fengist fram að þessu af því að nota þessa váhrifaleið í þessari greiningu. Það eru fjórar samhliða prófanir af hverjum prófunarstyrkleika og átta samhliða prófanir fyrir hvern samanburðarhóp sem er notaður. Endapunktur sem eru metnir meðan váhrifin standa yfir eru m.a. þeir sem gefa vísbendingu um almenn eiturhrif (þ.e. dánartala, óeðlilegt atferli og ákvörðun á vexti (lengd og þyngd)) sem og endapunktur sem eru til þess ætlaðir að lýsa sértækum verkunarháttum eiturhrifa á innkirtla sem beinast að estrógen-, andrógen- eða skjaldkirtilsbundnum lífeðlisfræðilegum ferlum (þ.e. vefjameinafræðileg rannsókn skjaldkirtilsins, vefjameinafræðileg rannsókn kynkirtla og kynkirtlarásar (e. *gonad duct*), óeðlileg þroskun, vítellógenín í blóðvökva (valkvætt) og arfgerðarleg/svipfarsleg kynjahlutföll).

#### GILDISVIÐMIÐANIR PRÓFUNAR

12. Eftirfarandi viðmiðanir eiga við fyrir gildisviðmiðanir prófunar:

- styrkur uppleysts súrefnis skal vera  $\geq 40\%$  af metnunargildi lofts í allri prófuninni,
- vatnshitastig skal vera á bilinu  $21 \pm 1$  °C og munur milli tanka samhliða prófana/meðferðartanka skal ekki fara yfir 1,0 °C,
- pH-gildi prófunarlausnar skal haldið á bilinu 6,5 til 8,5 og munur milli tanka samhliða prófana/meðferðartanka skal ekki fara yfir 0,5,
- gögn skulu liggja fyrir til að sýna fram á að styrkleikum prófunaríðefnisins í lausn hafi verið viðhaldið á fullnægjandi hátt innan  $\pm 20\%$  af meðaltali mæligilda,
- dánarhlutfall á váhrifatímabilinu skal vera  $\leq 20\%$  í hverri samhliða prófun í samanburðarhópnum,

- $\geq 70\%$  lífvænleiki í gotinu sem er valið til að hefja rannsóknina,
  - miðgildistíminn til 62. NF-stigs í samanburðarhópunum skal vera  $\leq 45$  dagar,
  - meðalþyngd prófunarlífvera á 62. NF-stigi og við lok greiningarinnar, í samanburðarhópum og samanburði með leysi (ef hann er notaður), skal ná  $1,0 \pm 0,2$  annars vegar og  $11,5 \pm 3$  g hins vegar.
13. Mælt er með því að a.m.k. þrjú meðferðarstig með þremur samhliða prófunum, sem ekki eru ótryggar, séu tiltæk til greiningar en þetta er ekki gildisviðmiðun. Afbrigðilegar dánartölur sem gerir meðferðarprófun ótrygga eru skilgreint sem  $> 4$  dauðsföll ( $> 20\%$ ) í tveimur eða fleiri samhliða prófunum sem ekki er unnt að skýra með tæknilegri villu. Að minnsta kosti þrjú meðferðarstig án augljósra eiturrhifa skulu vera tiltæk til greiningar. Augljós merki eiturrhifa geta falið í sér, en takmarkast ekki við, að fljóta á yfirborðinu, liggja á botni tanksins, öfugar eða skrykkjótta sundhreyfingar, fara ekki upp á yfirborðið og sýna engin viðbrögð við áreiti, formfræðilegan afbrigðileika (t.d. vanskapaðir útlímir), blæðandi vefjaskemmdir og bjúg á kvið.
14. Ef frávik frá gildisviðmiðunum prófunarinnar koma fram skal athuga afleiðingarnar í tengslum við áreiðanleika prófunarniðurstaðnanna og þessi frávik og atriði skulu koma fram í prófunarskýrslunni.

#### LÝSING Á AÐFERÐUM

#### **Búnaður**

15. Venjulegur rannsóknarstofubúnaður og einkum eftirfarandi:
- a) hitastýringartæki (t.d. hitarar eða kælar stillanlegir að  $21 \pm 1$  °C),
  - b) hitamælir,
  - c) tvísæissmásjá til krufningar og krufningaráhöld,
  - d) stafræn myndavél með a.m.k. 4 megapixla upplausn og míkrostillingu (ef þörf krefur),
  - e) fínvog sem getur mælt niður í 0,001 mg eða 1 µg,
  - f) mælir fyrir uppleyst súrefni og sýrustigsmælir,
  - g) ljósstyrksmælir sem getur mælt í lúx-einingum.

## Vatn

### Uppruni og gæði

16. Hægt er að nota allt þýnningarvatn sem er tiltækt á staðnum (t.d. lindarvatn eða viðarkolasíað kranavatn) og gerir halakörtum af tegundinni *X. laevis* kleift að vaxa og þroskast eðlilega og sannanir fyrir eðlilegum vexti í þessu vatni skulu að vera tiltækar. Sökum þess að gæði staðarvatns geta verið mjög breytileg milli svæða skal takast á hendur greiningu á vatnsgæðum, einkum ef rannsóknarsöguleg gögn um notkun vatnsins til að ala froskdýralirfur eru ekki tiltæk. Mælingar á þungmálum (*t.d. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni*), helstu plúsjónum og mínusjónum (*t.d. Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>*), varnarefnum, heildarmagni lífræns kolefnis og svifagna skulu gerðar áður en prófun hefst og/eða t.d. á sex mánaða fresti ef vitað er að þýnningarvatnið er tiltölulega stöðugt að gæðum. Nokkrir efnaeiginleikar viðunandi þýnningarvatns eru tilgreindir í 2. viðbæti.

### Jodíðstyrkur í prófunarvatni

17. Til þess að skjaldkirtillinn myndi skjaldkirtilshormóna til að styðja eðlilega myndbreytingu þarf nægilegt magn af jodíði að vera tiltækt fyrir lírfurnar með samblandi af vatns- og fódurgjöfum. Sem stendur eru ekki til viðmiðunarreglur, fengnar á grundvelli reynslu, um lágmarksstyrk jodíðs í fódri eða vatni til að tryggja viðeigandi þroskun. Tiltækileiki jodíðs getur þó haft áhrif á svörunargetu skjaldkirtilskerfisins gagnvart skjaldkirtilsvirkum efnum og þekkt er að það stillir grunnstarfsemi skjaldkirtilsins sem verðskuldar athygli þegar niðurstöðurnar úr vefjameinafræðilegri rannsókn á skjaldkirtlinum eru túlkaðar. Sýnt hefur verið fram á, á grundvelli fyrri starfs, að greiningin reynist vel þegar styrkur jodíðs (I-) í þýnningarvatninu er á bilinu 0,5–10 µg/l. Helst ætti lágmarksstyrkleiki jodíðs í þýnningarvatninu að vera 0,5 µg/l í allri prófuninni (bætt við sem natríum- eða kalúmsalt). Ef prófunarvatnið er endurgert úr afjönuðu vatni skal bæta við jodíði í styrk að lágmarki 0,5 µg/l. Greina skal frá mældum styrk jodíðs í prófunarvatninu (þ.e. þýnningarvatni) og ef jodíði eða öðrum söltum (ef þau eru notuð) er bætt í prófunarvatnið. Einnig má mæla jodíðihald í fódri, til viðbótar við prófunarvatnið.

## Váhrifakerfi

18. Prófunin var þróuð með notkun þýnningarkerfis með gegnumstreymi. Þeir íhlutir kerfisins sem komast í snertingu við vatn skulu vera úr gleri, ryðfríu stáli og/eða öðrum efnafræðilega óvirkum efnum. Váhrifatankar skulu vera ker úr gleri eða ryðfríu stáli og rúmmál tanksins skal vera á bilinu u.þ.b. 4,0–10,0 l (vatnsdýpt að lágmarki 10–15 cm). Kerfið skal vera fært um að bera alla váhrifastyrkleika, samanburð og samanburð með leysi, ef nauðsyn krefur, með fjórar samhliða prófanir á hverja meðferð og átta í samanburðarhópnum. Streymi í hvern tank skal vera stöðugt, bæði að því er varðar að viðhalda líffræðilegu ástandi og íðefnaváhrifum. Mælt er með því að streymið sé viðeigandi (t.d. að minnsta kosti 5 vatnsskipti í tanknum á dag) til að komast hjá því að styrkur íðefna minnki vegna efnaskipta af völdum bæði prófunarlífvera og lagarörvera sem eru til staðar í kerinu eða niðurbrots sem á sér stað án tilstillis lífvera (vatnsrof, ljósrof) eða eyðingar (uppgufun, sog). Raða skal meðferðartönkunum af handahófi í váhrifakerfið til að draga úr hugsanlegum áhrifum af völdum staðsetningar, þ.m.t. lítils háttar frávikum í hitastigi, ljósstyrk o.s.frv. Frekari upplýsingar um uppsetningu á váhrifakerfum með gegnumstreymi er unnt að fá í „ASTM Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians“ (16. heimild).

## Íðefnagjöf: undirbúningur prófunarlausnanna

19. Til þess að gera prófunarlausnir í váhrifakerfinu skal skammta stofnlausn prófunaríðefnisins í váhrifakerfið með viðeigandi dælu eða öðrum búnaði. Kvarða skal streymi stofnlausnarinnar í samræmi við greiningarlega staðfestingu á prófunarlausnunum áður en váhrif hefjast og mæla rúmmál hennar reglulega meðan prófunin stendur yfir. Prófunarlausnin í hverju keru skal endurnýjuð með að lágmarki 5 rúmmálsendurnýjunum/dag.

20. Aðferðin sem notuð er til að setja íðefnið í kerfið getur verið breytileg, háð eðlisefnafræðilegum eiginleikum þess. Af þeim sökum skal útvega grunnupplýsingar um íðefnið, áður en prófun hefst, sem skipta máli við að ákvarða prófunarhæfni þess. Gagnlegar upplýsingar um prófunaríðefnasértæka eiginleika eru m.a. byggingarformúla, sameindapýngd, hreinleiki, stöðugleiki í vatni og birtu, pKa og Kow, vatnsleysni (helst í prófunarmiðlinum) og gufuþrýstingur sem og niðurstöður úr prófun á auðlífbrjótanleika (prófunaraðferð C.4 (17. heimild) eða prófunaraðferð C.29 (18. heimild)). Leysni og gufuþrýstingur má nota til að reikna út fasta samkvæmt lögmáli Henrys sem sýnir hvort umtalsvert tap geti orðið á prófunaríðefninu vegna uppgufunar meðan á prófuninni stendur. Ef upplýsingarnar sem eru tilgreindar hér að framan liggja ekki fyrir skal gaumgæfa vandlega hvort framkvæma eigi prófunina sökum þess að hönnun rannsóknarinnar er háð eðlisefnafræðilegum eiginleikum prófunaríðefnisins og án þessara gagna getur verið erfitt eða þýðingarlaust að túlka prófunarniðurstöðurnar. Fyrir skal liggja áreiðanleg greiningaraðferð til að mæla magn prófunaríðefnisins í prófunarlausnunum með þekktri og skráðri nákvæmni og greiningarmörkum. Hægt er að leysa vatnsleysanleg prófunaríðefni upp í deiliskömmtum af þynningarvatni í styrk sem gefur markprófunarstyrkinn í gegnumstreymiskerfi. Að því er varðar íðefni sem eru fljótandi eða föst efni við stofuhita og í meðallagi uppleysanleg í vatni getur þurft að nota mettara fyrir vökva:vökva eða vökva:fast efni (t.d. súlur með glerull) (19. heimild). Þó að það sé e.t.v. einnig mögulegt að gefa mjög vatnsfælin prófunaríðefni með fódri hefur lítil reynsla fengist af því að nota þessa váhrifaleið í þessari greiningu.
21. Prófunarlausnir af þeim styrkleikum, sem valdir eru hverju sinni, fást með því að þynna stofnlausn. Heppilegast er að tilreiða stofnlausnina með því að prófunaríðefninu sé einfaldlega blandað, eða það sé hrist, saman við þynningarvatnið á vélrænan hátt (t.d. með hræri- og/eða úthljóðsbúnaði). Nota má mettunarsúlur/-kerfi eða hlutlaus skömmunarkerfi (20. heimild) til að búa til stofnlausn af hæfilegum styrk. Ákjósanlegast er að nota prófunarkerfi án meðleysis; þó búa mismunandi prófunaríðefni yfir breytilegum eðlisefnafræðilegum eiginleikum sem munu líklega krefjast mismunandi aðferða við tilreiðslu á vatni fyrir íðefnaváhrif. Reyna skal eftir megni að forðast leysa eða burðarefni sökum þess að: 1) tilteknir leysar geta sjálfir leitt til eiturhrifa og/eða óæskilegra eða óvæntra viðbragða, 2) prófanir á íðefnum ofan við vatnsleysni þeirra (eins og getur oft gerst með notkun leysa) geta leitt til ónákvæmra ákvarðana á hriststyrk, 3) notkun á leysum í lengri prófunum getur leitt til verulegrar „örveruþekju“ tengdri örveruvirkni og getur haft áhrif á umhverfisaðstæður sem og getu til að viðhalda váhrifastyrkleikum og 4) ef rannsóknarsöguleg gögn sem sýna fram á að leysirinn hafi ekki áhrif á niðurstöður rannsóknarinnar eru ekki fyrir hendi útheimtir notkun leysa samanburðar meðferð með leysi sem hefur veruleg áhrif á velferð dýra þar eð þörf er á viðbótardýrum til að framkvæma prófunina. Að því er varðar íðefni sem er erfitt að gera prófanir á er hægt að nota leysi sem síðasta úrræði og fletta skal upp í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um prófanir í vatni á eiturhrifum íðefna og blandna, sem erfitt er að gera prófanir á (e. OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures) (21. heimild) til að ákvarða bestu aðferðina. Val á leysi ákvarðast af efnafræðilegum eiginleikum prófunaríðefnisins og tiltækileika rannsóknarsögulegra samanburðargagna um leysinn. Ef rannsóknarsöguleg gögn eru ekki til skal ákvarða hentugleika leysis áður en endanlega rannsóknin er framkvæmd. Ef til þess kemur að ekki er hægt að komast hjá því að nota leysi og örveruvirkni (örveruþekja) verður til er mælt með því að skrá/gefa skýrslu um örveruþekjuna í hverjum tanki (a.m.k. vikulega) í allri prófuninni. Helst ætti að halda styrk leysisins stöðugum í samanburðinum með leysi og öllum prófunar meðferðunum. Ef styrk leysis er ekki haldið stöðugum skal nota hæsta styrk leysisins í prófunar meðferðinni í samanburðinum með leysi. Í tilvikum þar sem leysir er notaður sem burðarefni skal hámarksstyrkur leysis ekki fara yfir 100 µl/l eða 100 mg/l (21. heimild) og mælt er með því að halda styrk leysisins eins lágum og unnt er (t.d. ≤20 µl/l) til að komast hjá hugsanlegum áhrifum leysisins á mælda endapunkta (22. heimild).

## Tilraunadýr

### Prófunartegund

22. Prófunartegundin er *X. laevis* vegna þess að hún er: 1) almennt ræktuð á rannsóknarstofum á heimsvísu, 2) hún er auðfáanleg frá sölubirgjum og 3) unnt er að ákvarða erfðafræðilegt kyn hennar.

### Umönnun og undaneldi fullvaxinna dýra

23. Viðeigandi umönnun og undaneldi *X. laevis* er lýst í stöðluðum leiðbeiningum (23. heimild). Read (24. heimild) lýsir einnig hýsingu og umönnun *X. laevis*. Til að framkalla æxlu er æðabelgskynhormónavaka manna sprautuð í kviðarhol þriggja til fimm para af fullvöxnum kven- og karldýrum. Tilraunakvendýr og -karldýr eru sprautuð, annars vegar með u.þ.b. 800–1000 IU og hins vegar með 500–800 IU, með æðabelgskynhormónavaka manna sem er uppleystur í 0,6–0,9% saltlausn (eða Ringer-lausn fyrir froska, jafnþrýstin saltlausn til notkunar fyrir froskdýr). Innsprautunarmagn skal vera

u.þ.b. 10 µl/g líkamsþyngdar (~1 000 µl). Eftir það eru undaneldispör höfð í stórum tönkum, ótrufluð og í kyrrstöðu, til að hvetja til mökunarfaðmags. Í hverjum undaneldistanki skal vera falskur botn úr ryðfríum stálmöskvum (t.d. 1,25 cm op) þannig að egginn geti fallið til botns í tanknum. Froskar sem eru sprautaðir með æðabelgskynhormónavaka manna síðla dags losa yfirleitt flest sín egg fyrir miðjan morgun næsta dag. Eftir að nægilegt magn af eggjum hefur verið losað og þau frjóvguð skal fjarlægja fullvaxin dýr úr undaneldistönkunum. Síðan er eggjunum safnað saman og hlaupkenndi hjúpurinn fjarlægður með L-systeínmeðferð (23. heimild). Tilreiða skal 2% L-systeínlausn og stilla pH-gildið að 8.1 með 1 M af NaOH. Þessari 21 °C lausn er síðan bætt í 500 ml keilufloösku sem inniheldur egg úr einu goti og hringsnúð varlega í eina til tvær mínútur og síðan skoluð vandlega 6–8 sinnum með 21 °C ræktunarvatni. Egginn er síðan flutt í kristöllumarskál og ákvörðuð sem > 70% lífvænleg með hverfandi afbrigðileika hjá fósturvísnum sem sýna frumuskiptingu.

#### TILHÖGUN PRÓFUNAR

##### Prófunarstyrkleikar

24. Mælt er með því að nota a.m.k. fjóra styrkleika íðefna og viðeigandi samanburð (þ.m.t. samanburður með leysi, ef nauðsyn krefur). Almennt er mælt með að bilin milli styrkleika (bilstuðull) fari ekki yfir 3.2.
25. Að því er varðar þessa prófun skal nota niðurstöður sem til eru úr rannsóknum á froskdýrum, að því marki sem mögulegt er, við að ákvarða hæsta prófunarstyrk til þess að komast hjá styrkleika sem er greinilega eittraður. Upplýsingar úr t.d. meginðlegum venslum efnabyggingar og virkni, ályktun út frá byggingarlega hliðstæðum efnum og gögnum úr rannsóknum sem til eru á froskdýrum, s.s. prófunaraðferð C.38: greining á myndbreytingu hjá froskdýrum (25. heimild) og „Frog Embryo Teratogenesis Assay - Xenopus“ (23. heimild) og/eða prófunum á fiskum, s.s. prófunaraðferðir C.48, C.41 og C.49 (26.–28. heimild), geta stuðlað að því að ákvarða þennan styrkleika. Áður en rannsókn á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) er keyrð má framkvæma tilraun til að ákvarða skammtastærð. Mælt er með því að váhrifin til að ákvarða skammtastærð hefjist innan sólarhrings eftir frjóvgun og þeim haldið áfram í 7–14 daga (eða lengur, ef þörf krefur) og að prófunarstyrkleikarnir séu fastsettir þannig að bilið milli prófunarstyrkleikanna sé ekki stærra en sem nemur tugþrepamillibili. Niðurstöður úr tilrauninni til að ákvarða skammtastærð ættu að þjóna þeim tilgangi að fastsetja hæsta prófunarstyrk í rannsókninni á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA). Athygli er vakin á því að ef nota þarf leysi er hægt að ákvarða hentugleika leysisins (þ.e. hvort hann kann að hafa áhrif á niðurstöðu rannsóknarinnar) sem hluta af tilrauninni til að ákvarða skammtastærð.

##### Samhliða prófanir innan meðferðar- og samanburðarhópa

26. Nota skal a.m.k. fjóra tanka samhliða prófana fyrir hvern prófunarstyrk og a.m.k. átta samhliða prófanir fyrir samanburðinn (og samanburð með leysi, ef þörf krefur) (þ.e. fjöldi samhliða prófana í samanburðinum og sérhverjum samanburði með leysi skal vera tvöfalt meiri en fjöldi samhliða prófana í hverjum meðferðarhóp til að tryggja viðeigandi tölfræðilegan styrk). Hver samhliða prófun skal ekki innihalda fleiri en 20 dýr. Lágmarksfjöldi dýra sem er unnið með er 15 (5 fyrir undirsýni á 62. NF-stigi og 10 ungvíði). Viðbótardýrum er þó bætt í hverja samhliða prófun til að gera ráð fyrir að þrátt fyrir dánartölu viðhaldist þessi nauðsynlegi 15 dýra fjöldi.

#### VERKFERLI

##### Yfirlit greiningar

27. Greiningin er hafin með nýlega gotnum fósturvísnum (8.–10. NF-stig) og heldur áfram inn í ungvíðisþroska. Skoðað er daglega hvort dýr séu dauð eða sýni merki um afbrigðilegt atferli Á 62. NF-stigi er tekið undirsýni úr lirfunum (allt að 5 dýr í hverri samhliða prófun) og mismunandi endapunktur rannsakaðir (tafla 1). Eftir að öll dýrin hafa náð 66. NF-stiginu, þ.e. þegar myndbreytingu er lokið (eða eftir 70 dögum frá því að greiningin hófst, hvort sem verður fyrr), er handahófskennd förgun (en án undirsýnatöku) til að fækka dýrunum (10 í hverjum tanki) (sjá 43. lið) og eftirlifandi dýr eru látin verða fyrir váhrifum áfram þangað til 10 vikum eftir miðgildistímam til 62. NF-stigs í samanburðinum. Við lok prófunar (sýnataka úr ungvíði) eru gerðar viðbótarmælingar (tafla 1).

### Váhrifaskilyrði

28. Fullfrágengna samantekt á prófunarmælipáttum er að finna í 3. viðbæti. Meðan váhrifatímabilið stendur yfir skal mæla uppleyst súrefni, hitastig og sýrustig prófunarlausnanna daglega. Eðlisleiðni, basavirkni og harka eru mæld einu sinni í mánuði. Að því er varðar vatnshitastig prófunarlausnanna skal munur milli tanka samhliða prófana/meðferðartanka (á einum degi) ekki fara yfir 1,0 °C. Að því er varðar pH-gildi prófunarlausnanna skal munur milli tanka samhliða prófana/meðferðartanka ekki fara yfir 0,5.
29. Sjúga má daglega úr váhrifatönkunum til að fjarlægja ótíð fóður og úrgangsefni en þess skal gætt að forðast víxlmengun í tönkunum. Þess skal gætt að lágmarka streitu og skaða sem dýrin verða fyrir, einkum við tilflutning, þrif á kerinu og meðhöndlun. Forðast skal streituvaldandi aðstæður/athafnir, s.s. hávær og/eða stöðug hljóð, bank í kerid, titring í tankinum.

### Tímalengd váhrifa frá prófunariðefninu

30. Váhrif eru hafin með nýlega gotnum fósturvísnum (8.–10. NF-stig) og haldið áfram þangað til 10 vikum eftir miðgildistímann til 62. NF-stigs ( $\leq 45$  dögum frá því að greiningin hefst) í samanburðarhópnum. Almennt stendur rannsókn á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) yfir í 16 vikur (að hámarki 17 vikur).

### Upphaf greiningar

31. Undaneldisdýr sem eru notuð til að hefja greininguna skulu áður hafa sýnt að þau geti eignast afkvæmi sem hægt er að kyngreina erfðafræðilega (5. viðbætur). Eftir að fullorðin dýr hafa gotið er fósturvísnum safnað saman, þeir meðhöndlaðir með systeíni til að fjarlægja hlaupkennda hjúpinn og skimaðir fyrir lífvænleika. Systeínmeðhöndlun gerir kleift að meðhöndla fósturvísana meðan skimun fer fram án þess að þeir festist á yfirborðum. Skimun fer fram undir krufningarsmásjá og dropateljari af hentugri stærð er notaður til að fjarlægja ólífvænlega fósturvísna. Ákjósanlegt er að eitt got sem gefur yfir 70% lífvænleika sé notað í prófunina. Fósturvísnum á 8.–10. NF-stigi er dreift af handahófi í tanka fyrir váhrifameðferð sem innihalda víðeigandi rúmmál af þynningarvatni þangað til hver tankur inniheldur 20 fósturvísna. Meðhöndla skal fósturvísana varlega við þennan flutning til að lágmarka streitu vegna meðhöndlunar og til að forðast hvers kyns áverka. Eftir 96 klst. frá frjóvgun ættu halakörturarnar að hafa flutt sig upp vatnssúluna og vera farnar að festa sig á hliðar tanksins.

### Fóðrunarfyrirkomulag

32. Fóður og fóðrunartíðni breytast á mismunandi lífsstigum *X. laevis* og eru mjög mikilvægur þáttur í aðferðarlýsingu rannsókna á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA). Óhóflæg fóðrun á lírfustiginu leiðir yfirleitt til aukinni tíðni og alvarleika hryggsekkju (8. viðbætur) og hana ætti að forðast. Á hinn bóginn leiðir vanfóðrun á lírfustiginu til mjög breytilegs þroskunarhraða í samanburðinum sem getur teft tölfræðilegum styrk í tvísýnu eða ruglað niðurstöður úr prófun. Í 4. viðbæti er að finna fóður sem mælt er með fyrir lírfur og ungvíði og fóðrunarfyrirkomulag fyrir *X. laevis* við gegnumstreymisskilyrði en staðgöngukostir eru heimilaðir að því tilskildu að prófunarlífverurnar vaxi og þroskast á fullnægjandi hátt. Mikilvægt er að taka mið af því að ef innkirtlasértækir endapunktur eru mældir skal fóðrið vera laust við innkirtlavirk efni, s.s. sojamjöl.

### Fóðrun lirfa

33. Fóður sem mælt er með fyrir lírfur samanstendur af upphafsfoðri fyrir silung, *Spirulina* þörungaskífum og gullfiskafóðri (t.d. TetraFin@-flögur, Tetra, Þýskaland), blandað saman í ræktar- (eða þynningar-) vatni. Þessi blanda er gefin þrisvar á dag virka daga og einu sinni á dag um helgar. Halakörtur eru einnig fóðraðar á lifandi saltvatnsrækjum, *Artemia* spp., sólarhringsgömlum krabballirfum, tvísvar á dag virka daga og einu sinni á dag um helgar frá og með 8. degi eftir frjóvgun. Fóðrun lirfanna, sem ætti að vera eins í hverju prófunarkeri, ætti að gera tilraunadýrum kleift að vaxa og þroskast á tilhlýðilegan hátt til þess að tryggja samanburðarnákvæmni greiningarniðurstöðnanna og að hægt sé að yfirfæra þær: 1) miðgildistími til 62. NF-stigs í samanburði skal vera  $\leq 45$  dagar og 2) mælt er með að meðalþyngd sé innan við  $1,0 \pm 0,2$  g á 62. NF-stigi í samanburði.

*Fóðrun ungvíðis*

34. Þegar myndbreytingu er lokið samanstendur fóðrunarfyrirkomulagið af sökkvandi hágæðafóðri fyrir froska, t.d. „Sinking Frog Food -3/32“ (Xenopus Express, FL, Bandaríkin) (4. viðbætur). Að því er varðar ungfroska (snemma í ungvíðisfasanum) eru kögglarnir settir í kaffikvörn eða blandara í stutta stund eða muldir með staut í mortéli til að minnka þá. Þegar ungvíðið er orðið nógu stórt til að éta heila köggla er ekki lengur nauðsynlegt að mala þá eða mylja. Gefa skal dýrunum einu sinni á dag. Fóðrun ungvíðisins ætti að gera lífverunum kleift að vaxa og þroskast á tilhlýðilegan hátt: mælt er með meðalþyngd innan  $11,5 \pm 3$  g hjá samanburðarungvíði við lok greiningarinnar.

**Efnagreining**

35. Áður en greiningin er hafin skal ákvarða stöðugleika prófunaríðefnisins (t.d. leysni, niðurbrotanleika og rokgirni) og allar greiningaraðferðir sem þörf er á, t.d. með því að nota fyrirbyggjandi upplýsingar eða þekkingu. Þegar skammtað er í þynningarvatnið er mælt með því að prófunarlausnir úr hverjum tanki samhliða prófunar séu settar í greiningu áður en rannsóknin hefst til að sannreyna nothæfi kerfisins. Meðan váhrifatímabilið stendur yfir er styrkur prófunaríðefnisins ákvarðaður með hæfilegu millibili, helst í hverri viku í a.m.k. einni samhliða prófun í hverjum meðferðarhópi, og skipt á milli samhliða prófana í sama meðferðarhópnum vikulega. Mælt er með því að niðurstöðurnar séu byggðar á mældum styrkleikum. Ef styrk prófunarefnis í lausn hefur verið haldið á fullnægjandi hátt innan  $\pm 20\%$  af nafnstyrk í allri prófuninni mega niðurstöðurnar þó annaðhvort grundvallast á nafngildum eða mældum gildum. Einnig ætti að halda fráviksstuðli mældu prófunarstyrkleikanna á öllu prófunartímabilinu innan meðhöndlunar við 20% eða minna í hverjum styrkleika. Ef mældu styrkleikarnir haldast ekki innan 80–120% af nafnstyrknum (t.d. við prófun á mjög lífbrjótanlegum eða ásogandi íðefnum) skal ákvarða hrifstyrkina og gefa þá upp í hlutfalli við meðaltalsstyrkleikann fyrir gegnumstreymisprófanir.
36. Streymi þynningarvatns og stofnlausnar skal athugað með viðeigandi millibili (t.d. þrisvar í viku) allan tímann meðan váhrif standa yfir. Ef um er að ræða íðefni sem ekki er hægt að greina við suma eða alla nafnstyrkleikana (t.d. út af hröðu niðurbroti eða ásogi í prófunarkerjunum eða vegna greinilegrar uppsöfnunar íðefna í skrokkum dýra sem verða fyrir váhrifum) er mælt með því að endurnýjunartíðni prófunarlausnarinnar í hverju kerfi sé aðlöguð til að halda prófunarstyrkleikum eins stöðugum og unnt er.

**Athuganir og endapunktamælingar**

37. Endapunktur sem eru metnir meðan váhrifin standa yfir eru þeir sem gefa vísbendingu um eiturrhif, þ.m.t. dánartala, óeðlilegt atferli, s.s. klínísk einkenni um sjúkdóm og/eða almenn eiturrhif, og ákvörðun á vexti (lengd og þyngd) sem og meinafræðilegir endapunktur sem gætu verið svar við bæði almennum eiturrhifum og verkunarhætti innkirtla sem beinist að estrógen-, andrógen- eða skjaldkirtilsbundnum ferlum. Þar að auki má mæla vítellógenínstyrk í blóðvökva valkvætt við lok greiningarinnar. Mæling á vítellógeníni getur verið gagnleg til að skilja rannsóknarniðurstöður í tengslum við gangvirki innkirtlastarfsemi þegar grunur er um etýlendíklóríð (EDC). Endapunktur og tímasetning mælinga er tekin saman í töflu 1.



Tafla 1

## Yfirlit yfir endapunkta í rannsókn á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA)

Endapunktur (*)	Daglega	Sýnataka meðan á greiningunni stendur (sýnataka úr lirfum)	Lok prófunar (sýnataka úr ungviði)
Dánartala og afbrigðileiki	X		
Á tímabilinu til 62. NF-stigs		X	
Vefja(meina)fræði (skjaldkirtill)		X	
Formmælingar (aukning í þyngd og lengd)		X	X
Lifrar-/líkamsstuðull (e. <i>liver-somatic index</i> (LSI))			X
Erfðafræðileg/svipfarsleg kynjahlutföll			X
Vefjameinafræðileg rannsókn (kynkirtlar, kynrásir, nýru og lifur)			X
Vítellógenín (valkvætt)			X

(\*) Allir endapunktar eru greindir á tölfræðilegan hátt.

## Dánartala og daglegar athuganir

38. Leitað skal að dauðum dýrum daglega í öllum prófunartönkum og skrá dánartölu fyrir hvern tank. Fjarlægja skal dauð dýr úr prófunartönkum um leið og eftir þeim er tekið. Þroskastig dauðu dýranna skal flokkað sem fyrir 58. NF-stig (áður en framfætur koma fram), 58. NF-stig til 62. NF-stigs, 63. NF-stig til 66. NF-stigs (á milli 62. NF-stigs og algerrar halarýrnunar) eða eftir 66. NF-stig (eftir lirfustigið). Dánarhlutfall yfir 20% getur bent til þess að prófunarskilyrði séu óviðeigandi eða til augljósra eiturrhifa prófunariðefnisins. Dýrunum hættir til að vera viðkvæmust fyrir atvikum sem valda dauða án íðefna á fyrstu dögum þroskunar eftir got og meðan myndbreyting stendur sem hæst. Viðmiðungargögnin gætu sýnt fram á slíkar dánartölur.
39. Þar að auki skal skrá ef vart verður við óeðlilegt atferli, vansköpun sem sést mjög greinilega (t.d. hryggskekkju) eða vefjaskemmdir. Telja skal hversu oft hryggskekkja kemur fyrir (tíðni) og flokka m.t.t. alvarleika (t.d. ekki áberandi – EÁ, hverfandi – 1, í meðallagi – 2, alvarleg – 3; 8. viðbætur). Reynt skal að tryggja að algengi hryggskekkju í meðallagi og alvarlegrar hryggskekkju sé takmarkað (t.d. undir 10% í samanburðarhópum) í allri rannsókninni þó að hærra algengi afbrigðileika í samanburðarhópum sé ekki endilega ástæða til að stöðva prófunina. Eðlilegt atferli dýra á lirfustigi einkennist af því að þau haldast á floti í vatnssúlunni með halann ofar hausnum, slá halaugganum taktfast til, koma reglulega upp á yfirborðið til að anda og bregðast við áreiti. Óeðlilegt atferli tekur m.a. til þess að fljóta á yfirborðinu, liggja á botni tanksins, öfugar eða skrykkjóttar sundhreyfingar, fara ekki upp á yfirborðið og sýna engin viðbrögð við áreiti. Til viðbótar við framangreint óeðlilegt atferli skal skrá mikinn mun á fóðuráti milli meðferðarhópa hjá dýrum eftir myndbreytingu. Mikil vansköpun og vefjaskemmdir geta tekið til formfræðilegs afbrigðileika (t.d. vanskapaðir útlimir), blæðandi vefjaskemmda, bjúgs á kvið og bakteríu- eða sveppasýkingar, svo að eitthvað sé nefnt. Vefjaskemmdir sem koma fram á haus ungviðis, rétt fyrir aftan nasirnar, geta verið merki um að rakastig sé ófullnægjandi. Þessar greiningar eru eigindlegar og líta skal svo á að þær svari til klínískra einkenna um sjúkdóm/streitu og þær skulu gerðar með samanburði við samanburðardýrin. Ef þetta kemur oftar fyrir í váhrifatönkum en í samanburðartönkum skal líta á það sem sannanir fyrir augljósum eiturrhifum.

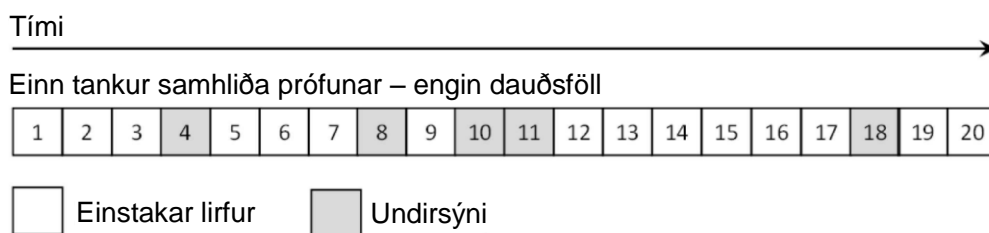
### Taka undirsýna úr lirfum

*Yfirlit yfir töku undirsýna úr lirfum:*

40. Fjarlægja skal halakörtur sem hafa náð 62. NF-stigi úr tönkunum og annaðhvort taka sýni úr þeim eða flytja þær yfir í næsta hluta váhrifanna í nýjum tanki eða aðskilja þær með skilrúmi algerlega frá öðrum halakörtum sem eftir eru í sama tanki. Halakörtur eru athugaðar daglega og rannsóknardagurinn, þegar einstakar halakörtur ná 62. NF-stigi, er skráður. Sá einkennandi eiginleiki sem notaður er í þessu mati er lögum höfuðsins. Þegar stærð höfuðsins hefur minnkað þannig að það er sjónrænt séð u.þ.b. af sömu breidd og bolur halakörtunnar og framfæturnir eru til móts við miðju hjartans telst sá einstaklingur hafa náð 62. NF-stiginu.
41. Markmiðið er að taka sýni úr samtals fimm halakörtum á 62. NF-stigi í hverjum tanki samhliða prófunar. Þetta skal gert algerlega af handahófi en ákvörðunin um það tekin fyrir fram. Tilbúið dæmi um tank samhliða prófunar er sýnt á mynd 1. Ef 20 lifandi halakörtur eru í tilteknum tanki þegar fyrsti einstaklingurinn nær 62. NF-stigi skal velja fimm tölur af handahófi á bilinu 1–20. Halakarta #1 er fyrsti einstaklingurinn til að ná 62. NF-stigi og halakarta #20 er síðasti einstaklingurinn í tanknum til að ná 62. NF-stigi. Ef 18 lifandi lirfur eru í tanki skal á sama hátt velja fimm tölur af handahófi af bilinu 1–18. Þetta skal framkvæmt fyrir hvern tank samhliða prófunar þegar fyrsti einstaklingurinn í prófuninni nær 62. NF-stigi. Ef dauðsföll verða við sýnatöku á 62. NF-stigi verður að endurdreifa eftirstandandi sýnum af handahófi, byggt á því hversu margar lirfur eru eftir < 62. NF-stigi og hversu mörg sýni til viðbótar þarf til að ná samtals fimm sýnum úr þeirri samhliða prófun. Á þeim degi þegar halakarta nær 62. NF-stigi er flett upp í sýnatökutöflunni sem var gerð til að ákvarða hvort tekið er sýni úr viðkomandi einstaklingi eða hvort hann er algerlega aðskilinn frá halakörtunum sem eftir eru til áframhaldandi váhrifa. Í dæminu sem er gefið (mynd 1) er fyrsti einstaklingurinn sem nær 62. NF-stigi (þ.e. reitur #1) algerlega aðskilinn frá öðrum lirfum, váhrifum er haldið áfram og rannsóknardagurinn þegar viðkomandi einstaklingur nær 62. NF-stiginu er skráður. Því næst eru einstaklingar #2 og #3 meðhöndlaðir á sama hátt og #1 og síðan er tekið sýni úr einstaklingi nr. #4 vegna vaxtar og vefjafræði skjaldkirtils (samkvæmt þessu dæmi). Þessu verkferli er haldið áfram þangað til 20. einstaklingurinn er annaðhvort settur með öðrum einstaklingum eftir 62. NF-stigið eða tekið er sýni úr honum. Handahófsaðferðin, sem er notuð, verður að gefa hverju dýri í prófuninni jafn miklar líkur á að vera valið. Þessu er hægt að ná fram með því að nota hvaða handahófsaðferð sem er en útheimtir einnig að hver halakarta um sig sé veidd í háf á einhverjum punkti á öllu undirsýnatökutímabili 62. NF-stigsins.

*Mynd 1*

#### Tilbúið dæmi um sýnatökuáætlun á 62. NF-stigi í einum tanki samhliða prófunar



42. Endapunktarnir sem fást með töku undirsýna úr lirfum eru: 1) tími til 62. NF-stigs (þ.e. fjöldi daga milli frjóvgunar og 62. NF-stigs), 2) ytri afbrigðileiki, 3) formmælingar (t.d. þyngd og lengd) og 4) vefjafræði skjaldkirtils.

*Aflífur halakarta á mannúðlegan hátt*

43. Halakörtturnar á 62. NF-stigi í undirsýninu (5 einstaklingar í hverri samhliða prófun) skulu aflífaðar með því að hafa halakörtturnar á kafi í 30 mínútur í viðeigandi magni (t.d. 500 ml) af svæfingarlausn (t.d. 0,3% lausn af MS-222, tríkaínmetansúlfónati, CAS.886-86-2). MS-222-lausrin skal jöfnuð með natríumbíkarbónati þannig að pH-gildið verði u.þ.b. 7,0 vegna þess að ójöfnuð MS-222-lausrin er súr og ertir húð froskanna sem leiðir til lélegs ísogs og óþarfa viðbótarstreitu fyrir lífverurnar.
44. Halakarta er tekin úr tilraunakerinu með háf og flutt (sett) í aflífunarlausn. Dýrið er aflífað á tilhlýðilegan hátt og er tilbúið til krufningar þegar það bregst ekki við ytra áreiti, t.d. þegar klipið er í afturfótinn með tóng.

*Formmælingar (þyngd og lengd)*

45. Mælingar á blautvigt (að næsta mg) og lengd frá snoppu að þarfagangi (SVL) (að næsta 0,1 mm) hveggjar halakörtu skulu gerðar tafarlaust eftir að hún hættil að sýna viðbrögð eftir svæfingu (mynd 2a). Nota má myndgreiningarhugbúnað til að mæla lengd frá snoppu að þarfagangi (SVL) á ljósmynd. Halakörtur skulu þerraðar áður en þær eru vigtaðar til að fjarlægja umframvatn sem loðir við þær. Eftir mælingar á skrokkstærð (þyngd og lengd frá snoppu að þarfagangi (SVL)) skal gera grein fyrir eða skrá allan stórsæjan, formfræðilegan afbrigðileika og/eða klínísk einkenni um eiturrhif, s.s. hryggskekkju (sjá 8. viðbæti), depilblæðingu og blæðingu og mælt er með stafrænni skráningu. Athygli er vakin á því að depilblæðing er lítil rauð eða fjólublá blæðing í hárdunum.

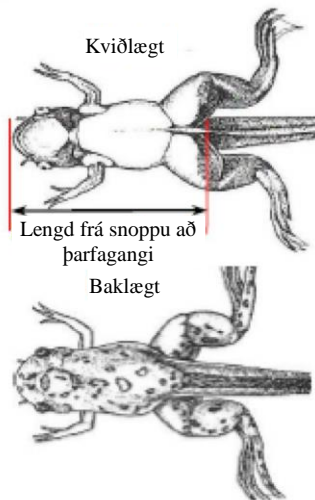
*Vefjasöfnun og festing*

46. Skjaldkirtill lirlanna úr undirsýninu fer í vefjafræðilegt mat. Neðri hluti búksins, aftan við framfætturna, er fjarlægður og honum fleygt. Snyrtur skrokkurinn er festur í Davidson-festiefni. Magn festiefnisins í ílátinu skal vera a.m.k. tífalt meira en áætlað rúmmál vefjanna. Viðeigandi hristingur eða hringrás festiefnisins skal nást til að festa vefina, sem verið er að rannsaka, á fullnægjandi hátt. Allir vefir eru hafðir í Davidson-festiefninu í a.m.k. 48 klst. en ekki lengur en í 96 klst og þá eru þeir skolaðir í afjónuðu vatni og geymdir í 10% formalíni með hlutlausum jafna (1. og 29. heimild).

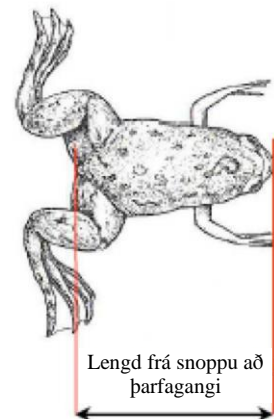
*Vefjafræði skjaldkirtils*

47. Skjaldkirtlar allra undirsýna úr lirlfum (festur vefur) fara í vefjafræðilegt mat, þ.e. sjúkdómsgreiningu og flokkun á alvarleika (29.–30. heimild).

a. Taka undirsýna úr lirlfum (62. NF-stig)



b. Sýnataka úr ungvíði



**Mynd 2** Kennimörk við mælingar á lengd frá snoppu að þarfagangi í rannsókn á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) á 62. NF-stigi a) og ungvíði b). Einkennandi eiginleikar 62. NF-stigs a): hausinn er jafnbreiður og bolurinn, lyktartaugin er styttri en þvermál lyktarklumbunnar (baklægt séð) og framfætturnir eru til móts við miðju hjartans (kviðlægt séð) Myndirnar eru aðlagðar frá Nieuwkoop og Faber (1994).

**Váhrifum á lirlfur lýkur**

48. Miðað við upphaflegan fjölda halakarta er búist við því að lágt hlutfall einstaklinga þroskist ekki eðlilega og ljúki ekki myndbreytingu (66. NF-stigi) innan hæfilegs tíma. Váhrifin í lirlfuhlutanum skulu ekki standa lengur en í 70 daga. Aflífa skal allar halakörtur sem eftir eru við lok þess tímabils (sjá 43. lið), mæla blautvigt þeirra og lengd frá snoppu að þarfagangi (SVL), ákvarða þroskunarstigið samkvæmt Nieuwkoop and Faber, 1994, og skrá allan afbrigðileika í þroska.

**Förgun eftir 66. NF-stigið**

49. Tíu einstaklingar í hverjum tanki skulu halda áfram frá 66. NF-stigi (alger halavísun) til loka váhrifa. Eftir að öll dýrin hafa náð 66. NF-stigi eða eftir 70 daga (hvort sem verður fyrir) skal förgun fara fram. Eftir 66. NF-stigið skal velja dýr af handahófi sem halda ekki áfram að verða fyrir váhrifum.
50. Dýr sem eru ekki valin til áframhaldandi váhrifa eru aflífuð (sjá 43. lið). Mælingar á þroskastigi, blautvigt og lengd frá snoppu að þarfagangi (SVL) (mynd 2b) og stórsæ krufning eru framkvæmdar á hverju dýri. Svipfarslegt kyn (byggt á formi og byggingu kynkirtla) er skráð sem kvendýr, karldýr eða óákveðið.

**Sýnataka úr ungvíði***Yfirlit yfir sýnatöku úr ungvíði*

51. Dýrin sem eru eftir eru látin verða fyrir váhrifum áfram þangað til 10 vikum eftir miðgildistímamann til 62. NF-stigs í þynningarvatninu (og/eða í samanburði með leysi, ef við á) í samanburðinum. Við lok váhrifatímabilsins eru dýrin sem eftir eru (að hámarki 10 froskar í hverri samhliða prófun) aflífuð og mismunandi endapunktur mældir eða metnir og skráðir: 1) formmælingar (þyngd og lengd), 2) svipfarsleg/arfgerðarleg kynjahlutföll, 3) þyngd lifrar (lifrar-/líkamsstuðull (LSI)), 4) vefjameinafræðileg rannsókn (kynkirtlar, kynrásir, lifur og nýru) og valkvætt 5) vítellógenín í blóðvökva.

*Aflífun froska á mannúðlegan hátt*

52. Sýnishornin af ungvíðinu, froskar eftir myndbreytingu, eru aflífuð með því að sprauta svæfingarlyfi í kviðarholið, t.d. 10% MS-222 í viðeigandi fosfatjafnaðri lausn. Taka má sýni úr froskum eftir að þeir eru hættrir að sýna viðbrögð (yfirleitt u.þ.b. 2 mínútum eftir innsprautun ef 10% af MS-222 eru notuð í skammti sem nemur 0,01 ml á hvert g af froski). Þó að hægt væri að setja ungfroska á kaf í svæfingarlyf með hærri styrk (MS-222) hefur reynslan sýnt að það tekur lengri tíma að svæfa þá með því að nota þessa aðferð og tímalengdin er e.t.v. ekki fullnægjandi til að taka megi sýni. Innsprautun hefur í för með sér skilvirka og skjóta aflífun fyrir sýnatöku. Til að tryggja að dýrin séu dauð skal sýnataka ekki hefjast fyrr en staðfest hefur verið að froskarnir sýni engin viðbrögð. Ef froskar sýna merki um talsverðar þjáningar (mjög alvarlegar og hægt er að segja með vissu til um dauða þeirra) og eru taldir dauðvona skal svæfa og aflífa dýrin og meðhöndla það sem dánartölur í gagnagreiningunni. Ef froskur er aflífaður vegna sjúkdómstilviks skal skrá það og gera grein fyrir því. Unnt er að geyma frosk til vefjameinafræðilegrar greiningar (froskurinn er festur til að vefjameinafræðigreining sé möguleg), háð því hvenær í rannsókninni froskurinn er aflífaður.

*Formmælingar (þyngd og lengd)*

53. Mælingar á blautvigt og lengd frá snoppu að þarfagangi (SVL) (mynd 2b) eru nákvæmlega eins og þær sem eru útlistaðar fyrir töku undirsýna úr liffum.

*Vítellógenín í blóðvökva (valkostur)*

54. Vítellógenín er almennt viðurkennt lífmerki sem stafar af váhrifum af völdum estrógenvirkra íðefna. Innan rannsóknarinnar á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) er valkvætt að mæla vítellógenín í blóðvökva úr sýnum úr ungvíði (þetta getur verið sérlega mikilvægt ef grunur leikur á um að íðefnið sé estrógenvirkt).
55. Afturfæturnir á aflífuðu ungvíði eru skornir af og blóðinu safnað með heparínmeðhöndlaðri hárpípu (þó getur annars konar aðferð við blóðsöfnun verið hentug, s.s. stunga í hjartað). Blóðið er flutt yfir í örskilvinduglas (t.d. 1,5 ml að rúmmáli) og skilið í skilvindu til að ná blóðvökvanum. Geyma skal blóðvökvasýnin við -70 °C eða lægra þangað til vítellógenínið er ákvarðað. Hægt er að mæla styrk vítellógeníns í blóðvökva með ELISA-prófunaraðferð (6. viðbætur) eða með staðgönguáðferð, s.s. massagreiningu. Tegundarsértæk mótefni eru ákjósanlegust vegna meira næmis.

*Ákvörðun á erfðafræðilegu kyni*

56. Erfðafræðilegt kyn hvers ungfrosks er metið, byggt á merkjum sem Yoshimoto o.fl. þróðu. (11. heimild). Til að ákvarða erfðafræðilegt kyn er hluti annars afturfótar (eða hann allur) (eða einhverjum öðrum vef) sem er fjarlægður við krufningu tekinn og geymdur í örskilvinduglasi (hægt er að taka sýni úr hvaða vef froska sem er). Hægt er að geyma vef við -20 °C eða lægra þangað til einangrun deoxýríbósakjarnsýru (DNA) fer fram. Hægt er að einangra DNA úr vefjum með settum sem fást á almennum markaði og greining á því hvort merkið er fyrir hendi eða ekki er gerð með kjarnsýrumögnunaraðferð (5. viðbætur). Almennt er samsvörun milli vefjafræðilegs kyns og arfgerðar í öllum samanburðardýrum yfir 95% á þeim tímapunkti þegar sýni eru tekin úr ungvíði í samanburðarhópum.

*Vefjasöfnun og festing fyrir vefjameinafræðilega rannsókn*

57. Kynkirtlar, kynrásir, nýru og lifur eru tekin til vefjafræðilegrar greiningar þegar síðasta sýnataka fer fram. Kviðarholið er opnað og lifrin skorin úr og vigtuð. Næst eru meltingarfærin (t.d. magi, garnir) fjarlægð varlega úr neðra kviðarholinu til að kynkirtlar, nýru og kynrásir komi í ljós. Skrá skal allan stórsæjan, formfræðilegan afbrigðileika kynkirtlanna. Að lokum skal fjarlægja afturfæturna ef þeir hafa ekki verið teknir áður til blóðsöfnunar. Setja skal lifrar sem teknar eru og þá skrokka sem hafa kynkirtlana á sínum stað tafarlaust í Davidson-festiefni. Magn festiefnisins í ílátinu skal vera a.m.k. tífalt meira en áætlað rúmmál vefjanna. Allir vefir eru geymdir í Davidson-festiefninu í a.m.k. 48 klst. en ekki lengur en 96 klst og þá eru þeir skolaðir í afjónuðu vatni og geymdir í 10% formalíni með hlutlausum jafna (1. og 29. heimild).

*Vefjameinafræðileg rannsókn*

58. Hvert sýni úr ungvíði er metið á vefjafræðilegan hátt m.t.t. sjúkdóma í kynkirtla-, kynrása-, nýrna- og lifrarvef, þ.e. sjúkdómsgreining og flokkun á alvarleika (32. heimild). Svipfar kynkirtla er einnig leitt út frá þessu mati (t.d. eggjastokkar, eistu, millikyn) og hægt er að nota þessar athuganir ásamt einstökum mælingum á erfðafræðilegu kyni til að reikna út svipfarsleg/arfgerðarleg kynjahlutföll.

## GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

**Tölfræðileg greining**

59. Rannsókn á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) myndar þrens konar gögn til tölfræðilegrar greiningar. 1) magnbundin samfelld gögn (þyngd, lengd frá snoppu að þarfagangi (SVL), lifrar-/líkamsstuðull (LSI), vítellógenín), 2) lifunargögn (e. *time-to-event data*) fyrir þroskunarhræða (þ.e. dagar frá upphafi greiningar til 62. NF-stigs) og 3) raðgögn í formi alvarleikastigafjölda eða þroskunarstiga frá vefjafræðilegu mati.
60. Mælt er með því að tilhögun prófunarinnar og val á tölfræðilegri prófun veiti nægilegan styrk til að greina breytingar á endapunktum sem hafa líffræðilega þýðingu ef gera skal grein fyrir styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif eða ECx. Æskilegast er að tölfræðilegar greiningar á gögnunum (yfirleitt á grundvelli meðaltals samhliða prófunar) séu samkvæmt aðferðum sem lýst er í skjalinu „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“ (33. heimild). Í 7. viðbæti við þessa prófunaraðferð kemur fram ákvarðanatökturé fyrir ráðlagða tölfræðilega greiningu og leiðbeiningar um meðferð gagna og við val á því tölfræðilegu prófi eða líkani sem á best við til að nota í rannsókninni á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA).
61. Gögnin úr sýnatökunni á ungvíðinu (t.d. vöxtur, lifrar-/líkamsstuðull (LSI)) skulu greind aðskilið fyrir hvert arfgerðarlegt kyn þar eð arfgerðarlegt kyn er ákvarðað fyrir alla froska.

**Atriði varðandi gagnagreiningu***Notkun á ótryggum samhliða prófunum og meðferðum*

62. Samhliða prófanir og meðferðir gera orðið ótryggar vegna afbrigðilegrar dánartíðni af völdum augljósra eiturrifa, sjúkdóms eða tæknilegrar villu. Ef samhliða prófun er ótrygg vegna sjúkdóms eða tæknilegrar villu ættu þrjár tryggar meðferðir með þremur tryggum samhliða prófunum að vera tiltækar til greiningar. Ef augljós eiturrif eiga sér stað í meðferð(um) með háum styrk er ákjósanlegt að a.m.k. þrjár tryggar meðferðir með þremur tryggum samhliða prófunum séu tiltækar til greiningar (í samræmi við nálgun fyrir hámarksþolsstyrk í OECD-viðmiðunarreglum um prófanir (34. heimild). Til viðbótar við dánartölur geta augljós merki eiturrifa falið í sér áhrif á atferli (t.d. að fljóta á yfirborðinu, liggja á botni tanksins, öfugar eða skrykkjóttar sundhreyfingar, fara ekki upp á yfirborðið) formfræðilegar vefjaskemmdir (t.d. blæðandi vefjaskemmdir, bjúgur á kvið) eða hömlun á eðlilegum viðbrögðum við fóðrun í eiginlegum samanburði við samanburðardýr.

*Samanburður með leysi*

63. Við lok prófunarinnar skal framkvæma mat á hugsanlegum áhrifum leysisins (ef hann er notaður). Þetta er gert með tölfræðilegum samanburði á samanburðarhópnum með leysinum og samanburðarhópnum með þynningarvatninu. Mikilvægustu endapunktarnir til athugunar í þessari greiningu eru vaxtarákvörðunarþættir (þyngd og lengd) þar eð almenn eiturrif geta haft áhrif á þá. Ef tölfræðilega marktækur munur kemur fram milli þessara endapunkta í samanburðarhópnum með þynningarvatni og samanburðarhópnum með leysi skal nota besta sérfræðiálit til að ákvarða hvort gildi prófunarinnar er teflt í tvísýnu. Ef það er munur á samanburðarhópnum tveimur skal bera meðferðina sem varð fyrir váhrifum af iðefninu saman við samanburðarhópinn með leysi nema vitað sé að samanburður við samanburðarhóp með þynningarvatni sé ákjósanlegri. Ef enginn tölfræðilega marktækur munur er milli samanburðarhópanna tveggja er mælt með því að meðferðir sem verða fyrir váhrifum af prófunaríðefninu séu bornar saman við hópuð sýni (samanburðarhópar með leysi og samanburðarhópar með þynningarvatni) nema vitað sé að samanburður við annaðhvort samanburðarhópinn með leysi eða samanburðarhópinn með þynningarvatni sé ákjósanlegri.

**Prófunarskýrsla**

64. Eftirtalið skal vera í prófunarskýrslunni:

## Prófunaríðefni:

— Eðlisástand og, þar sem við á, eðlisefnafræðilegir eiginleikar.

— Efni með einum efnisþætti:

útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,

efnafræðileg sanngreining, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv., (þ.m.t. innihald lífræns kolefnis, ef við á).

- Fjölpáttæfni, UVCB-efni og blöndur:

lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.

*Prófunartegund:*

- Vísindaheiti, stofn ef hann liggur fyrir, uppruni frjóvnguðu eggjanna og aðferð við að afla þeirra og meðhöndlun eftir það.
- Tíðni hryggскеkkju í rannsóknarsögulegum samanburði fyrir stofnræktina sem er notuð.

*Prófunarskilyrði:*

- Ljóslofa eða ljóslofur.
- Tilhögun prófunar (t.d. stærð kers, efni og rúmmál vatns, fjöldi prófunarkerja og samhliða prófana, fjöldi prófunarlífvera í hverri samhliða prófun).
- Aðferð við tilreiðslu stofnlausna og hve oft endurnýjun á sér stað (tilgreina skal uppleysandi efnið og styrk þess ef það er notað).
- Aðferð við skömmun prófunaríðfnisins (t.d. dælur, þynningarkerfi).
- Endurheimtunargeta aðferðarinnar og nafnstyrkleikar í prófuninni, magngreiningarmörk, meðaltal mældra gilda og staðalfrávik þeirra í prófunarkerjunum og sú aðferð, sem er notuð til að fá þessi gildi, og gögn sem sýna að mælingarnar vísi til styrkleika prófunaríðfnisins í eiginlegu lausninni.
- Eiginleikar þynningarvatnsins: sýrustig, harka, hiti, styrkur uppleysts súrefnis, styrkur klórleifa (ef hann er mældur), heildarmagn jöðs, heildarmagn lífræns kolefnis (ef það er mælt), svifagnir (ef þær eru mældar), selta prófunarmiðilsins (ef hún er mæld) og allar aðrar mælingar sem gerðar eru.

- Nafnstyrkleikar í prófuninni, meðaltal mæligilda og staðalfrávik þeirra.
- Gæði vatns í prófunarlátum, sýrustig, hitastig (daglega) og styrkur uppleysts súrefnis.
- Nákvæmar upplýsingar um fóðrun (t.d. tegund fóðurs, uppruna, magn sem er gefið og hve oft er gefið).

#### Niðurstöður:

- Sannanir fyrir því að samanburðir uppfylli gildisviðmiðanir.
  - Gögn fyrir samanburðinn (að viðbættum samanburði með leysi þegar hann er notaður) og meðferðarhópana sem hér segir: dánartölur og afbrigðileiki sem koma í ljós, tími til 62. NF-stigs, vefjafræðilegt mat á skjaldkirtli (einungis sýni úr lirfum), vöxtur (þyngd og lengd), lifrar-/líkamsstuðull (LSI) (einungis sýni úr ungvíði), erfðafræðileg/svipfarsleg kynjahlutföll (einungis sýni úr ungvíði), niðurstöður úr vefjameinafræðilegu mati á kynkirtlum, kynrásur, nýrum og lifur (einungis sýni úr ungvíði) og vítellógenín í blóðvökva (einungis sýni úr ungvíði, ef það er tekið).
  - Aðferð við tölfræðilega greiningu og meðferð gagna (tölfræðileg prófun eða líkan sem er notað).
  - Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) fyrir hverja svörun sem metin er.
  - Minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC) fyrir hverja svörun sem er metin (við  $\alpha = 0,05$ ); ECx fyrir hverja svörun sem metin er, ef við á, og öryggisbil (t.d. 95%) og línurit aðlagða líkansins sem er notað við útreikningana, ferli styrkháðrar svörunar, formúla aðhvarfslíkans, áætlaðar líkanbreytur og staðalskekkjur þeirra.
  - Öll frávik frá prófunaraðferðinni og frávik frá samþykktarviðmiðunum og atriði sem varða mögulegar afleiðingar á niðurstöðu prófunarinnar.
65. Að því er varðar niðurstöður mælinga á endapunktum skal leggja fram meðalgildi og staðalfrávik þeirra (bæði á grundvelli samhliða prófana og styrks, ef unnt er).
66. Miðgildistími til 62. NF-stigs í samanburðarhópunum skal reiknaður út og settur fram sem meðaltal miðgildis samhliða prófana og staðalfrávik þeirra. Á sama hátt, að því er varðar meðferðir, skal miðgildi meðferðar reiknað út og sett fram sem meðaltal miðgildis samhliða prófana og staðalfrávik þeirra.

#### HEIMILDIR

- 1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.
- 2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.



- 3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.
- 4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. *Journal of Chromatography A* 1130: 16–27.
- 5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. *Journal of the Royal Society of Medicine* 93: 140–144.
- 6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* 237: 1 565.
- 7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. *International Journal of Developmental Biology* 34: 281–285.
- 8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. *Zoological Science* 16: 335–340.
- 9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. *Genetics* 48: 1 411.
- 10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. *Aquatic Toxicology* 91: 143–150.
- 11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2 469–2 474.
- 12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. *General and Comparative Endocrinology* 160: 117–123.
- 13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. *Journal of Neurobiology* 37: 441–448.
- 14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. *Aquatic Toxicology* 84: 321–327.

- 15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-Tert-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. *Aquatic Toxicology* 103: 159–169.
- 16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.
- 17) Kafli C.4 í þessum viðauka, Prófun á auðlífbrjótanleika.
- 18) Kafli C.29 í þessum viðauka, Auðlífbrjótanleiki — koltvísýringur í lokuðum ílátum (kollrúmsprófun).
- 19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. *Chemosphere* 39: 539–551.
- 20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. *Chemosphere*, 86(6): 593–9.
- 21) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. *Aquatic Toxicology* 76: 69–92.
- 23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.
- 24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.
- 25) Kafli C.38 í þessum viðauka, Greining á myndbreytingu hjá froskdýrum.
- 26) Kafli C.48 í þessum viðauka, Skammtíma æxlunarrannsókn á fiskum.

- 27) Kafli C.41 í þessum viðauka, Prófun á kynþroska fiska.
- 28) Kafli C.49 í þessum viðauka, Prófun á bráðum eiturrifum á fósturvíska fiska.
- 29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.
- 31) Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.
- 32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

*1. viðbætur.*

## SKILGREININGAR

**Afgerandi endapunktur:** Veldur áhrifum á stofninn.

**Íðefni:** Efni eða blanda.

**ELISA:** ELISA-prófun.

**EC<sub>x</sub>:** (Hrífstyrkur sem hefur x% áhrif) er sá styrkur sem hefur x% áhrif á prófunarlífverur innan tiltekins váhrifatímabils í samanburði við samanburðarprófun. Til dæmis er EC<sub>50</sub> sá styrkur sem metið er að hafi, við prófunarendapunkt, áhrif á 50% af þýði sem er látið verða fyrir váhrifum yfir tilgreint váhrifatímabil.

**def:** dagar eftir frjóvgun

**Gegnumstreymisprófun:** Prófun með samfelldu streymi prófunarlausna gegnum prófunarkerfið meðan váhrif standa yfir.

**UHK-öxull (e. HPG axis):** Undirstúku-, heiladinguls- og kynkirtlaöxull.

**IUPAC:** Alþjóðasamtök um hreina og hagnýta efnafræði.

**Minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC):** minnsti prófaði styrkur prófunariðefnis þar sem efnið reynist hafa tölfræðilega marktæk áhrif (við  $p < 0,05$ ) miðað við samanburðinn. Allur prófunarstyrkur sem er yfir minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif skal þó valda jafnmiklum eða meiri skaðlegum áhrifum en fram koma við minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif. Ef ekki er hægt að uppfylla þessi tvö skilyrði skal skýra til fulls hvernig staðið var að vali á minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif (og þar með vali á styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif). Leiðbeiningar eru settar fram í 7. viðbæti.

**Miðgildisbanastyrkur (LC<sub>50</sub>):** Styrkur prófunariðefnis sem talinn er banvænn fyrir 50% prófunarlífveranna meðan prófunin stendur yfir.

**Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC):** sá prófunarstyrkur sem er minni en minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif og hefur engin tölfræðilega marktæk áhrif ( $p < 0,05$ ) miðað við samanburðinn innan tilgreinds váhrifatímabils.

**SMILES:** SMILES-kerfið.

**Prófunariðefni:** Sérhvert efni og blanda sem eru prófuð með þessari prófunaraðferð.

**UVCB-efni:** Efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.

**Vítellógenín (VTG):** fosfólípóglykóprótínforefni eggjarauðupróteíns sem er yfirleitt fyrir hendi í kynþroska kvendýrum af öllum eggbærum tegundum.

## 2. viðbætur.

## NOKKRIR EFNAFRÆÐILEGIR EIGINLEIKAR VIÐUNANDI ÞYNNINGARVATNS

Efni	Styrkmörk
Efnisagnir	5 mg/l
Heildarmagn lífræns kolefnis	2 mg/l
Ójónað ammoníak	1 µg/l
Klórleifar	10 µg/l
Heildarmagn fosfórlífrænna varnarefna	50 ng/l
Heildarstyrkur klórlífrænna varnarefna ásamt fjöklóruðum bifenyllum	50 ng/l
Heildarstyrkur lífræns klórs	25 ng/l
Ál	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Króm	1 µg/l
kóbalt	1 µg/l
Kopar	1 µg/l
Járn	1 µg/l
Blý	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Sink	1 µg/l
Kadmíum	100 ng/l
Kvikasilfur	100 ng/l
Silfur	100 ng/l

## 3. viðbætur.

## PRÓFUNARSKILYRÐI FYRIR RANNSÓKN Á VEXTI OG ÞROSKA FROSKDÝRALIRFA (LAGDA)

1. Prófunartegund *Xenopus laevis*
2. Tegund prófunar Samfelld gegnumstreymi.
3. Vatnshitastig Nafnhitastig er 21 °C. Meðalhitastig meðan prófunin stendur yfir er  $21 \pm 1$  C (munur milli tanka samhliða prófana/meðferðartanka skal ekki fara yfir 1,0 °C)
4. Lýsing Flúrperur (breitt róf) 600–2000 lúx (lúmen/m<sup>2</sup>) við vatnsyfirborðið
5. Ljóslofta Birta í 12 klst., myrkur í 12 klst.
6. Rúmmál prófunarlausnar og prófunarker (tankur) 4–10 l (a.m.k. 10–15 cm vatnsdýpt)  
Tankur úr gleri eða ryðfríu stáli
7. Rúmmálsútskipti prófunarlausna Stöðug, bæði að því er varðar að viðhalda líffræðilegu ástandi og íðefnaváhrifum (t.d. 5 rúmmálsendurnýjanir í tanknum á dag)
8. Aldur prófunarlífvera við upphaf Nieuwkoop og Faber (NF-stig) 8.–10.
9. Fjöldi lífvera í hverri samhliða prófun 20 dýr (fósturvísar)/tankur (samhliða prófun) við upphaf váhrifa og 10 dýr (ungviði)/tankur(samhliða prófun) eftir 66. NF-stigið til loka váhrifa.
10. Fjöldi meðferða Að minnsta kosti 4 prófunariðefnameðferðir auk viðeigandi samanburðarprófunar eða -prófana
11. Fjöldi samhliða prófana á hverja meðferð Fjórar samhliða prófanir á hverja meðferð fyrir prófunariðefni og 8 samhliða prófanir fyrir samanburð(i)
12. Fjöldi lífvera á hvern prófunarstyrk Að minnsta kosti 80 dýr á hverja meðferð fyrir prófunariðefni og a.m.k. 160 dýr fyrir samanburð(i)
13. Þynningarvatn Allt vatn sem gerir *X. laevis* kleift að vaxa og þroskast eðlilega (t.d. lindarvatn eða viðarkolasíað kranavatn)
14. Loftun Ekki krafist en loftun tanka kann að vera nauðsynleg ef gildi uppleysts súrefnis fara niður fyrir ráðlögð gildi og streymi prófunarlausnar er í hámarki.
15. Uppleyst súrefni í prófunarlausn Uppleyst súrefni:  $\geq 40\%$  af metnunargildi lofts eða  $\geq 3,5$  mg/l

16. Sýrustig í prófunarlausn 6.5–8.5 (munur milli tanka samhliða prófana og meðhöndlunartanka skal ekki fara yfir 0,5)
17. Harka og basavirkni í prófunarlausn 10–250 mg CaCO<sub>3</sub>/l
18. Fóðrunarfyrirkomulag (Sjá 4. viðbæti)
19. Váhrifatímabil Frá 8.–10. NF-stigi þangað til 10 vikum eftir miðgildistímann til 62. NF-stigs í samanburðarhópi í vatni og/eða með leysi (að hámarki 17 vikur)
20. Líffræðilegir endapunktur Dánartölur (og afbrigðilegt útlit), tími til 62. NF-stigs (sýni úr lirfum), vefjafræðilegt mat á skjaldkirtli (sýni úr lirfum) vöxtur (þyngd og lengd), lifrar-/Ílkamsstuðull (LSI) (sýni úr ungvíði), erfðafræðileg/svipfarsleg kynjahlutföll (sýni úr ungvíði), vefjameinafræðileg rannsókn á kynkirtlum, kynrásur, nýrum og lifur (sýni úr ungvíði) og vítellógenín í blóðvökva (sýni úr ungvíði, valkvætt)
21. Gildisviðmiðanir prófunar Uppleyst súrefni skal vera > 40% af metnunargildi lofts; meðalhitastig vatns skal vera 21 ± 1 C og munur milli tanka samhliða prófana og meðferðartanka skal vera < 1.0 C; pH-gildi prófunarlausnarinnar skal vera á bilinu 6,5 til 8,5; dánarhlutfall í samanburði skal vera ≤ 20% í hverri samhliða prófun og meðaltíminn til 62. NF-stigs í samanburðinum skal vera ≤ 45 dagar; meðalþyngd prófunarlífvera á 62. NF-stigi og við lok greiningarinnar í samanburði og samanburði með leysi (ef hann er notaður) skal ná 1,0 ± 0,2 og 11,5 ± 3 g, eftir því sem við á; gögn skulu liggja fyrir til að sýna fram á að styrkleikum prófunaríðfnisins í lausn hafi verið viðhaldið á fullnægjandi hátt innan ± 20% af meðaltali mæligildanna.

## 4. viðbætur.

## FÓÐRUNARFYRIRKOMULAG

Það skal bent á að þótt þetta fóðrunarfyrirkomulag sé ráðlagt eru aðrir kostir heimilaðir að því tilskildu að prófunarlífverurnar vaxi og þroskist á viðeigandi hraða.

**Fóðrun lirfa***Tilreiðsla á fóðri fyrir lirfur*

A. 1:1 (rúmmálshlutfall) upphafsfoður fyrir silung: þörungar/TetraFin® (eða jafngildi þess)

1. Upphafsfóður fyrir silung: blandið saman 50 g af upphafsfoðri fyrir silung (fingerð korn eða duft) og 300 ml af hentugu síuðu vatni í blandara á hæstu stillingu í 20 sekúndur
2. Blanda af þörungum/TetraFin® (eða jafngildi þess): blandið saman 12 g af *Spirulina* þörungaskífum og 500 ml af síuðu vatni í blandara á hæstu stillingu í 40 sekúndur, blandið 12 g af TetraFin® (eða jafngildi þess) í 500 ml af síuðu vatni og blandið síðan öllu þessu saman til að búa til 1 l af 12 g/l af *Spirulina* þörungum og 12 g/l af TetraFin® (eða jafngildi þess)
3. Blandið saman jafnmiklu magni af blönduðu upphafsfoðri fyrir silung og blöndu af þörungum/TetraFin® (eða jafngildi þess)

B. Saltvatnsrækjur:

15 ml af saltvatnsrækjuhrognum eru látin klekjast út í 1 l af saltvatni (tilreitt með því að bæta 20 ml af NaCl í 1 l af afjónuðu vatni). Eftir loftun í 24 klst. við stofuhita í stöðugri birtu eru saltvatnsrækjurnar teknar. Saltvatnsrækjurnar fá að sökkva til botns í stutta stund, 30 mínútur, með því að loftun er stöðvuð. Himnum sem fljóta upp á yfirborð ílátsins er hellt af og fleygt og rækjunum hellt gegnum viðeigandi síur og fyllt upp að 30 ml með síuðu vatni.

*Aðferðarlýsing fóðrunar*

Í töflu 1 er tilgreind tegund og magn fóðurs sem er notað á lirfustigum váhrifanna. Fóðra skal dýrin þrisvar á dag frá mánudegi til föstudags og einu sinni á dag um helgar.

Tafla 1

**Fóðrunarfyrirkomulag fyrir lirfur af tegundinni *X. laevis* við gegnumstreymiskilyrði**

Tími (*) (Eftir frjóvgun)	Upphafsfóður fyrir silung: þörungar/TetraFin® (eða jafngildi þess)		Saltvatnsrækjur	
	Virkur dagur (þrisvar á dag)	Helgi (einu sinni á dag)	Virkur dagur (tvisvar á dag)	Helgi (einu sinni á dag)
4.–14. dagur (á vikum 0–1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (frá 8. degi til 15. dags)	0,5 ml (frá 8. degi til 15. dags)
(Vika 2)	0,67 ml	2,4 ml	1 ml (frá 16. degi)	1 ml (frá 16. degi)
(Vika 3)	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
(Vika 4)	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml



Tími (*) (Eftir frjóvgun)	Upphafsfóður fyrir silung: þörungur/TetraFin® (eða jafngildi þess)		Saltvatnsrækjur	
	Virkur dagur (þrisvar á dag)	Helgi (einu sinni á dag)	Virkur dagur (tvisvar á dag)	Helgi (einu sinni á dag)
(Vika 5)	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
(Vika 6)	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
(Vika 7)	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
(Vikur 8–10)	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(\*) Dagur 0 er skilgreindur sem sá dagur þegar inndæling æðabelgskynhormónavaka manna er gerð.

### Umskipti í fóðri frá lirlfum yfir í ungvíði

Þegar lirlfur ljúka myndbreytingu skipta þær yfir í fóður fyrir ungvíði og samsetningunni er lýst hér á eftir. Meðan þessi umskipti eiga sér stað skal minnka lirlfufóðrið eftir því sem ungvíðisfóðrið er aukið. Þessu er hægt að ná fram með því að minnka lirlfufóðrið hlutfallslega meðan ungvíðisfóðrið er aukið hlutfallslega eftir því sem hver hópur með fimm halakörtum fer yfir 62. NF-stigið og nálgast það að ljúka myndbreytingunni á 66. NF-stiginu.

### Fóðrun ungvíðis

#### Fóður fyrir ungvíði

Þegar myndbreytingu er lokið (66. stig) breytist fóðrunarfyrirkomulagið yfir í eingöngu sökkvandi fóður, af stærðinni 3/32 tommur, fyrir froska (Xenopus Express™, FL, Bandaríkin) eða jafngildi þess.

Tilreiðsla muldra köggla fyrir umskipti frá lirlfum yfir í ungvíði

Sökkvandi fóðurröggla fyrir froska eru settir í kaffikvörn eða blandara í stutta stund eða muldir með staut í mortéli til að minnka stærð köggla um u.þ.b. 1/3. Ef það er unnið of mikið verður það að dufti og ráðið er frá því.

#### Aðferðarlýsing fóðrunar

Í töflu 2 er tilgreind tegund og magn fóðurs sem er notað á lífsstigum ungvíðis og fullorðinna. Gefa skal dýrunum einu sinni á dag. Það skal bent á að meðan dýrin ganga í gegnum myndbreytingu fá þau áfram skammt af saltvatnsrækjunum þangað til > 95% af dýrunum hafa lokið myndbreytingunni.

Ekki skal fóðra dýrin þann dag sem prófun lýkur til þess að fóðrið trufla ekki þyngdarmælingarnar.

Tafla 2

**Fóðrunarfyrirkomulag fyrir ungvíði af tegundinni *X. laevis* við gegnumstreymisskilyrði Það skal bent á að dýr sem hafa ekki gengið í gegnum myndbreytingu, þ.m.t. dýr með tafða myndbreytingu vegna íðefnameðferðarinnar, geta ekki étið ómulda köggla.**

Tími (*) (Vikur eftir miðgildisdag myndbreytingar)	Muldir köggla (mg á hvern ungfrosk)	Heilir köggla (mg á hvern ungfrosk)
Eftir því sem dýrin ljúka myndbreytingunni	25	0
(Vikur 0–1)	25	28
(Vikur 2–3)	0	110
(Vikur 4–5)	0	165
(Vikur 6–9)	0	220

(\*) Fyrsti dagurinn í viku 0 er miðgildisdagur myndbreytingar hjá samanburðardýrum.

## 5. viðbætur.

## ÁKVÖRÐUN Á ERFÐAFRÆÐILEGU KYNI (ERFÐAFRÆÐILEG KYNGREINING)

Aðferð við erfðafræðilega kyngreiningu *Xenopus laevis* er byggð á Yoshimoto o.fl. 2008. Nákvæmt verkferli við arfgerðargreiningu má finna í þeirri útgáfu, ef þörf krefur. Nota má staðgönguáferðir (t.d. afkastamikla meginlega kjarnsýrumögnun (qPCR) í rauntíma) ef það er talið hentugt.

**Vísar fyrir *X. laevis****DM-W-merki*

Fram: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Bak: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

*Jákvæður samanburður*

Fram: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Bak: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

**DNA-hreinsun**

Hreinsið DNA úr vöðva- eða húðvef með því að nota t.d. „Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit“ (bækl. # 69 506) eða svipaða vöru samkvæmt leiðbeiningum í setti. Hægt er að skola DNA út úr spunasúlunum með minna af jafnalausn til að fá sýni með meiri styrk ef það er talið nauðsynlegt fyrir kjarnsýrumögnun. Athygli er vakin á því að DNA er mjög stöðugt svo þess skal gætt að forðast víxlmengun sem gæti leitt til þess að karldýr séu ranglega greind sem kvendýr eða öfugt.

**Kjarnsýrumögnun (PCR)**

Aðferðalýsing fyrir sýni þar sem notað er JumpStart™Taq frá Sigma er útlistuð í **töflu 1**.

Tafla 1

**Aðferðarlýsing fyrir sýni þar sem notað er JumpStart™Taq frá Sigma**

Aðalblanda	1x (µl)	[Endanleg]
NFW (*)	11	—
10X jafnalausn	2,0	—
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2,0	2,5 mM
dNTP (10mM hver)	0,4	200 µM
Merki framvísir (8 µM)	0,8	0,3 µM
Merki bakvísir (8 µM)	0,8	0,3 µM
Samanburður framvísir (8 µM)	0,8	0,3 µM
Samanburður bakvísir (8 µM)	0,8	0,3 µM

Aðalblanda	1x (µl)	[Endanleg]
JumpStart™Taq	0,4	0,05 einingar/µl
DNA-mót	1,0	~200 pg/µl

(\*) Vatn án nukleasa

Athugasemd: Þegar aðalblöndur eru tilreiddar skal tilreiða ríflega til að gera ráð fyrir hvers konar tapi sem getur átt sér stað þegar píplað er (dæmi: nota skal 25x fyrir einungis 24 efnahvörf).

#### Efnahvarf:

Aðalblanda	19,0 µl
Mót	1,0 µl
Samtals	20,0 µl

#### Lýsing lotuhitara:

1. þrep	94 °C	1 mín
2. þrep	94 °C	30 sek.
3. þrep	60 °C	30 sek.
4. þrep	72 °C	1 mín
5. þrep	Farið á 2. þrep	35 lotur
6. þrep	72 °C	1 mín
7. þrep	4 °C	stopp

Kjarnsýrumögnunaraferðir er hægt að keyra tafarlaust á geli eða geyma þær við 4 °C.

#### Rafdráttur á agarósageli (3%) (aðferðarlýsing fyrir sýni)

##### 50X TAE

Tris	24,2 g
Ísedik	5,71 ml
Na <sub>2</sub> (etýlendíamíntetraasetat)·2H <sub>2</sub> O	3,72 g

Vatni er bætt í 100 ml

##### 1X TAE

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

##### 3:1 agarósi

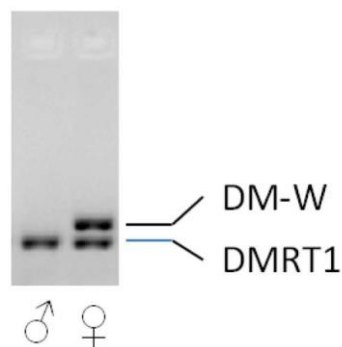
3 hlutar af NuSieve™ GTG™ agarósa

1 hluti af Fisher-agarósa með litlu rafgegnflæði (EEO)

### Aðferð

1. Tilreiðið 3% gel með því að bæta 1,2 g af agaróslöndu í 43 ml af 1X TAE. Hringsnúið til að leysa upp stóra klumpa.
2. Setjið agaróslönduna í örbylgjuofn þangað til hún er alveg uppleyst (forðist að láta hana sjóða upp úr). Látið kólna lítillega.
3. Bætið við 1,0 µL af etidíumbrómíði (10 mg/ml). Hringsnúið flöskunni. Athygli er vakin á því að etidíumbrómíð er stökkbreytandi svo það skal nota staðgönguúðefni, að því marki sem það er tæknilega mögulegt, í þessu skrefi til að lágmarka heilbrigðisáhættu fyrir starfsfólk <sup>(1)</sup>.
4. Hellið gelinu í mót með kambi (e. *mould with comb*). Kælið að fullu.
5. Bætið geli í búnaðinn. Þekið gelið með 1X TAE.
6. Bætið 1 µl af 6x hleðslulit í hver 10 µl af kjarnsýrumögnunarafurð.
7. Þrílið sýnunum í holurnar.
8. Keyrið við stöðug 160 volt í ~20 mínútur.

Agarósagelmynd sem sýnir bandamynstrin sem eru einkennandi fyrir karlkyns og kvenkyns einstaklinga er sýnd á **mynd 1**.



**Mynd 1** Agarósagelmynd sem sýnir bandamynstrin sem eru einkennandi fyrir karlkyns (♂) einstakling (eitt band ~203 bp: DMRT1) og fyrir kvenkyns (♀) einstakling (tvö bönd við ~259 bp: DM-W og 203 bp:DMRT1).

### HEIMILDIR

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2 469-2 474.

<sup>(1)</sup> Í samræmi við 1. mgr. tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2004/37/EB frá 29. apríl 2004 um verndun starfsmanna gegn áhættu vegna áhrifa af krabbameinsvöldum eða stökkbreytivöldum á vinnustað (sjötta sértilskipun í skilningi 1. mgr. 16. gr. tilskipunar 89/391/EEB) (Stjórið. ESB L 158, 30.4.2004, bls. 50).

## 6. viðbætur.

## MÆLING Á VÍTELLÓGENÍNI

Mæling á vítellógeníni (VTG) er gerð með því að nota ELISA-prófunaraðferð sem var upphaflega þróuð fyrir vítellógenín í breiðkollí (Parks o.fl., 1999). Sem stendur eru engin mótefni fyrir *X. laevis*. Fáanleg á almennum markaði. Miðað við allar þær upplýsingar sem til eru um þetta prótín og tiltækileika kostnaðarhagkvæmrar mótefnaframleiðslu á almennum markaði er þó raunhæft að rannsóknarstofur geti auðveldlega þróað ELISA-prófun til að gera þessar mælingar (Olmstead o.fl., 2009). Olmstead o.fl. (2009) gáfu einnig lýsingu á greiningunni eins og hún var aðlöguð fyrir vítellógenín í *X. tropicalis* eins og sýnt er hér á eftir. Í aðferðinni er notað mótefni sem búið var til gegn vítellógeníni í *X. tropicalis* en vitað er að það virkar einnig fyrir vítellógenín úr *X. laevis*. Það skal bent á að einnig er hægt að nota ókeppnar (e. *non-competitive*) ELISA-prófanir og að greiningarmörk þeirra geta verið lægri en aðferðarinnar sem lýst er hér á eftir.

**Efni og prófefni**

- Forásogað (e. *preadsorbed*) sermi fyrir 1. mótefni
- Blandið einn hluta af anti- *X. tropicalis*-vítellógenínsermi fyrir 1. mótefni með 2 hlutum af blóðvökva frá samanburðarkarldýri og skiljið eftir við stofuhita í ~ 75 mínútur, setjið á ís í 30 mín, skiljið í skilvindu > 20K x G í 1 klst. við 4 °C, fjarlægjið flotið, skiptið upp í deiliskammta og geymið við -20 °C.
- 2. mótefni
- Samsett geitar-IgG-HRP gegn kanínu (t.d. Bio-Rad 172-1019).
- Vítellógenínstaðallausn
- Hreinsað vítellógenín úr *X. laevis* við 3,3 mg/ml
- TMB (3,3',5,5' tetrametýlbensidín) (t.d., KPL 50-76-00; eða Sigma T0440)
- Eðlilegt geitasermi (NGS) (t.d., Chemicon® S26–100ml)
- 96 holu EIA míkrotítunarbakkar úr pólýstýreni (e.g., ICN: 6-381-04, Costar: 53590, Fisher: 07-200-35)
- 37 °C blöndunarhitaskápur (eða lofthitakassi sem nær jafnhita hratt) fyrir bakka, vatnsbað fyrir tilraunaglös
- Annar algengur búnaður fyrir rannsóknarstofur, íðefni og birgðir.

**Uppskriftir**

*Jafni sem þekju efni (50 mM karbónatjafnalausn, pH-gildi 9.6):*

NaHCO <sub>3</sub>	1,26 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,68 g
Vatn	428 ml

*10X PBS (0.1 M fosfat, 1,5 M NaCl):*

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0,83 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	20,1 g
NaCl	71 g
Vatn	810 ml

*Þvottajafnalausn (PBST):*

10X PBS	100 ml
Vatn	900 ml

pH-gildið er stillt af við 7,3 með 1 M HCl, síðan er bætt við 0,5 ml af Tween-20

*Greiningarjafnalausn*

Eðlilegt geitasermi (NGS)	3,75 ml
Þvottajafnalausn	146,25 ml

## Sýnataka

Blóð er tekið með heparínmeðhöndlaðri hárpípu og sett á ís. Eftir skiljun í 3 mínútur er gerð rispa í pípu, hún brotin og blóðvökvanum hellt í 0,6 ml örskilvinduglós sem innihalda 0,13 einingar af frostþurrkuðu aprótíníni. (Þessi glös eru undirbúin fyrirfram með því að bæta í þau viðeigandi magni af aprótíníni, frysta þau og frostþurrka í hraðþjappa með lofttæmi (e. *speed-vac*) við lágan hita þar til þau eru þurr.) Blóðvökvi er geymdur við -80 °C fram að greiningu.

## Verkferli fyrir einn bakka

*Þekjuefni borið á bakkann*

Blandið 20 µl af hreinsuðu vítellógeníni með 22 ml af karbónatjafnalausn (lokaniðurstaða 3 µg/ml). Bætið 200 µl í hverja holu í 96 holu bakka. Þekið bakkann með sjálflímandi þéttifilmu og látið standa við 37 °C í 2 klst. (eða 4 °C yfir nótt).

*Blökkun bakkans*

Blökklausn er tilreidd með því að bæta 2 ml af eðlilegu geitasermi (NGS) í 38 ml af karbónatjafnalausn. Fjarlægjið þekjuefnislausnina og hristið þar til hann er þurr. Bætið 350 µl af blökklausninni í hverja holu. Þekið með sjálflímandi þéttifilmu og látið standa við 37 °C í 2 klst. (eða 4 °C yfir nótt).

*Tilreiðsla staðallausna*

Blandið 5.8 µl af hreinsaðri vítellógenínstaðallausn með 1,5 ml af greiningarjafnalausn í 12 x 75 mm einnota tilraunaglassi úr bórsílikatgleri. Þetta gefur 12 760 ng/ml. Síðan er raðþynning framkvæmd með því að bæta 750 µl af fyrri þynningu í 750 µl af greiningarjafnalausn til að gefa lokastyrk sem nemur 12 760, 6380, 3190, 1595, 798, 399, 199, 100 og 50 ng/ml.

### *Undirbúningur sýna*

Byrjið með 1:300 (blandið t.d. 1  $\mu$ l af blóðvökva með 299  $\mu$ l af greiningarjafnalausn) eða 1:30 þynningu á blóðvökva í greiningarjafnalausn. Ef reiknað er með miklu magni af vítellógeníni er e.t.v. þörf á fleiri eða meiri þynningum. Reynið að halda B/B<sub>0</sub> innan styrkbila staðallausnanna. Að því er varðar sýni án merkjanlegs vítellógeníns, t.d. samanburðarkarldýr og -kvendýr (sem eru öll óþroskuð), skal nota 1:30 þynningu. Sýni sem eru þynnt minna en þetta geta sýnt óæskileg áhrif frá efniviði.

Að auki er mælt með því að keyra jákvætt samanburðarsýni á hverjum bakka. Það kemur úr samsettu blóðvökvasýni sem inniheldur há framkölluð vítellógeníngildi. Samsetta sýnið er upphaflega þynnt í eðlilegu geitasermi (NGS), skipt upp í deiliskammta og geymt við -80 C. Að því er varðar hvern bakka er deiliskammtur afþíddur, þynntur enn frekar í greiningarjafnalausn og meðhöndlaður á svipaðan hátt og prófunarsýni.

### *Viðstaða við tiltekin skilyrði með 1. mótefni*

1. mótefni er tilreitt með því að útbúa 1:2000 þynningu á forásoguðu sermi fyrir 1. mótefni í greiningarjafnalausn (t.d. 8  $\mu$ l í 16 ml af greiningarjafnalausn). Blandið 300  $\mu$ l af 1. mótefnalausn saman við 300  $\mu$ l af sýni/staðallausn í tilraunaglas. B<sub>0</sub>-tilraunaglassið er undirbúið á svipaðan hátt með 300  $\mu$ l af greiningarjafnalausn og 300  $\mu$ l af mótefni. Einnig skal undirbúa NSB-tilraunaglas og nota einungis 600  $\mu$ l af greiningarjafnalausn, þ.e. ekkert mótefni. Þekið tilraunaglösin með parafilmu og hringsnúið þeim varlega til blöndunar. Látið standa í vatnsbaði við 37 °C í 1 klst.

### *Bakkinn þveginn*

Þvoið bakkann rétt áður en viðstaðan með 1. mótefni er búin. Þetta er gert með því að hrista innihaldið úr og þerra hann með ídrægum pappír. Fyllið síðan holurnar með 350  $\mu$ l af skolvökva, hellið úr og þerrið. Hér kemur margföld rafpípetta (e. *multi-channel repeater pipette*) eða bakkaþvottavél að góðum notum. Þvottaprepið er endurtekið tvisvar í viðbót, samtals þrjú þvottar.

### *Bakkinn fylltur*

Fjarlægjið tilraunaglösin úr vatnsbaðinu eftir að bakkinn hefur verið þveginn og hringsnúið þeim létt. Bætið 200  $\mu$ l úr hverju sýni, staðallausn, B<sub>0</sub> og NSB-tilraunaglasinu í tvær holur hverju í bakkanum. Þekið bakkann með sjálflímandi þéttifilmu og látið standa við 37 °C í 1 klst.

### *Viðstaða við tiltekin skilyrði með 2. mótefni*

Þegar viðstöðunni í fyrra þrepi lýkur skal þvo bakkann aftur þrisvar sinnum, eins og hér að framan. Þynnta 2. mótefnið er tilreitt með því að blanda 2,5  $\mu$ l af 2. mótefninu með 50 m. af greiningarjafnalausn. Bætið 200  $\mu$ l af þynntu 2. mótefni í hverja holu, lokið eins og hér að framan og látið standa við 37 °C í 1 klst.

### *Undirstöðuefni bætt við*

Þvoið bakkann þrisvar sinnum eins og lýst er hér að framan eftir að viðstöðunni með 2. mótefni er lokið. Bætið síðan 100  $\mu$ l af TMB-undirstöðuefni í hverja holu. Leyfið efnahvarfinu að halda áfram í 10 mínútur, helst ekki í skæru ljósi. Stöðvið efnahvarfið með því að bæta við 100  $\mu$ l af 1 M fosfórsýru. Þetta breytir litnum úr bláum í sterkgulan. Mælið gleypnina við 450 nm og notið bakkalesara.

### *Reiknið út B/B<sub>0</sub>*

Dragið meðaltal NSB-gildisins frá öllum mælingunum. B/B<sub>0</sub> fyrir hvert sýni og staðallausnina er reiknað út með því að deila í gleypnigildið (B) með meðaltalsgleypni B<sub>0</sub>-sýnisins.

### *Staðalferill fenginn og óþekkt magn ákvarðað*

Búið til staðalferil með aðstoð tölvugrafíkhubúnaðar (t.d. Slidewrite™ eða Sigma Plot®) sem framreiknar magnið úr B/ B<sub>0</sub>-gildi sýnisins á grundvelli B/B<sub>0</sub>-gilda staðallausnanna. Alla jafna er magnið teiknað upp á lograkvarða og ferillinn er S-laga. Þó getur hann orðið línulegur þegar styrkbil staðallausnanna er þröngt. Leiðréttið sýnamagnið m.t.t. þynningarstuðulsins og gerið grein fyrir því sem mg af vítellógeníni/ml af blóðvökva.

*Ákvörðun á lögstu greiningarmörkum*

Það er oft ekki ljóst, einkum hjá eðlilegum karldýrum, hvernig á að greina frá niðurstöðum með lágum gildum. Í þeim tilvikum skal nota 95% öryggismörk til að ákvarða hvort gefa skuli gildið upp sem núll eða sem einhverja aðra tölu. Ef niðurstöður úr sýni eru innan öryggisbilsins fyrir núllstaðalinn ( $B_0$ ) skal gefa niðurstöðuna upp sem núll. Lægsti staðallinn sem er stöðugt frábrugðinn núllstaðlinum er hafður sem lágmarksgreiningargildið; þ.e. öryggisbilin tvö skarast ekki. Gefa á upp útreiknaða gildið fyrir sérhverja niðurstöðu úr sýni sem er innan öryggismarka fyrir lágmarksgreiningargildið eða ofan við það. Ef sýni fellur á milli núllstaðalsins og öryggisbilanna fyrir lágmarksgreiningargildið skal gefa upp helminginn af lágmarksgreiningargildinu sem gildi þess sýnis.

**HEIMILDIR**

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. *General and Comparative Endocrinology* 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 123: 113-125.



## 7. viðbætur.

## TÖLFRÆÐILEG GREINING

Rannsókn á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) myndar þrens konar gögn til tölfræðilegrar greiningar. 1) magnbundin samfelld gögn, 2) lifunargögn fyrir þroskunarhraða (tími til 62. NF-stigs) og 3) raðgögn í formi alvarleikastigafjölda eða þroskunarstiga frá vefjafræðilegu mati. Ákvarðanatökutréð fyrir tölfræðilega greiningu sem mælt er með fyrir rannsókn á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) er sýnt á mynd 1. Nokkrar skýringar við texta sem kann að vera þörf á til að framkvæma tölfræðilega greiningu á mælingunum úr rannsókninni á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) koma einnig fram hér á eftir. Að því er varðar ákvarðanatökutréð fyrir greininguna skal greina niðurstöður úr mælingum á dánartölu, vexti (þyngd og lengd) og lifrar-/líkamsstuðul (LSI) samkvæmt greininni „aðrir endapunktur“.

**Samfelld gögn**

Gögn fyrir samfellda endapunkta skal athuga fyrst m.t.t. einhalla með því að röðunarvarpa gögnunum, setja þau upp í dreifnigreiningarlíkan og bera saman línulegt og annars stigs samanburðarfall. Ef gögnin eru einhalla skal framkvæma Jonckheere-Terpstra-leitniþróf með stíglækkun á miðgildi samhliða prófunar og ekki skal beita neinum síðari greiningum. Fyrir gögn sem eru normaldreifð með einsleitri dreifni er annar kostur að nota Williams-próf með stíglækkun. Ef gögnin eru ekki einhalla (annars stigs samanburðarfall er marktækt og línulegt ómarktækt) skal greina þau með því að nota dreifnigreiningarlíkan fyrir blönduð áhrif. Síðan skulu gögnin metin m.t.t. normleika (helst með því að nota Shapiro-Wilk- eða Anderson-Darling-próf) og einsleitni dreifni (helst með því að nota Levene-próf). Bæði prófin eru framkvæmd á leifum úr dreifnigreiningunni fyrir blönduð áhrif. Hægt er að nota sérfræðiálit í stað þessara formlegu prófa á normleika og einsleitni dreifni en formleg próf eru æskileg. Ef gögnin eru normaldreifð með einsleitri dreifni eru forsendur dreifnigreiningarlíkans fyrir blönduð áhrif uppfylltar og marktæk áhrif meðferðar eru ákveðin með Dunnett-prófi. Ef ónormleiki eða misleitni dreifni kemur í ljós eru forsendur Dunnett-prófs ekki uppfylltar og leitast er við að ná vörpun með dreifnistöðgun. Ef engin slík vörpun finnst eru marktæk áhrif meðferðar ákveðin með Dunn-prófi. Alltaf þegar unnt er skal framkvæma einhliða próf en ekki tvíhliða próf en það þarf sérfræðiálit að ákvarða hvað á við fyrir tiltekinn endapunkt.

*Dánartölur*

Greina skal gögn um dánartölur af öllu tímabilinu sem prófunin stóð yfir og þau skulu gefin upp sem dánarhlutfall í tilteknum tanki. Halakörtur sem ljúka ekki myndbreytingu innan tiltekins tímaramma, þær halakörtur sem eru í undirsýninu úr halakörtualdurshópnum, ungfroskar sem er fargað og öll dýr sem drepast vegna mistaka rannsakandans skulu meðhöndluð sem stýfð gögn og ekki tekin með í nefnarann við útreikning á hundradshlutfallinu. Áður en nokkrar tölfræðilegar greiningar eru gerðar skal dánarhlutföllum arcsin-sqrt-umbreytt. Annar kostur er að nota Cochran-Armitage-próf með stíglækkun, hugsanlega með Rao-Scott-aðlögun ef dreifing er of mikil.

*Þyngd og lengd (gögn um vöxt)*

Kynbundin tvíbreytni er ekki fyrir hendi hjá karl- og kvendýrum meðan myndbreyting stendur yfir þannig að gögn um vöxt úr undirsýnum úr lifrum skulu greind óháð kyni. Þó skal greina gögn um vöxt ungvíðis sérstaklega á grundvelli erfðafræðilegs kyns. Það kann að þurfa að log-varpa þessum endapunktum þar eð stærðargögn geta verið log-normleg.

*Lifrar-/líkamsstuðull (LSI)*

Þyngd lifrar skal stöðluð sem hlutfall af allri líkamsþyngdinni (þ.e. lifrar-/líkamsstuðull (LSI)) og greind sérstaklega á grundvelli erfðafræðilegs kyns.

**Tími til 62. NF-stigs**

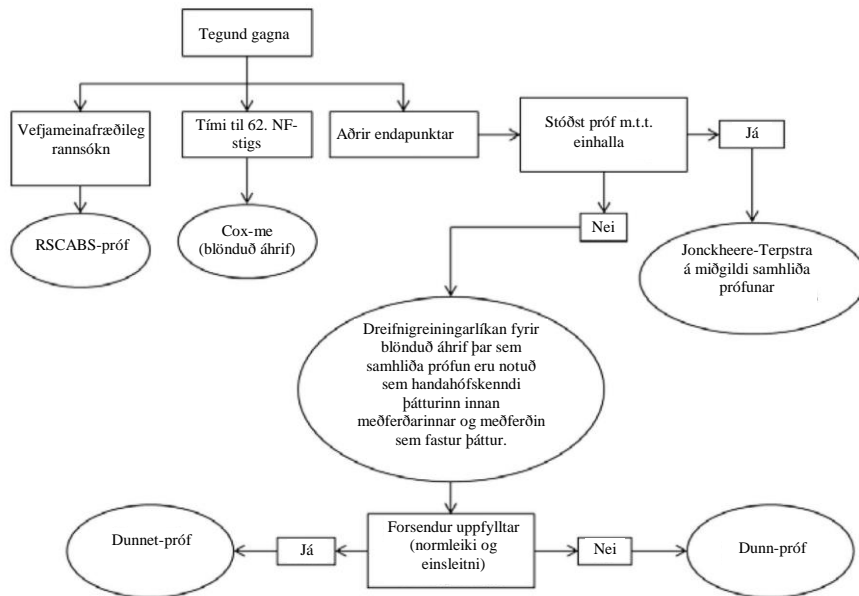
Gögn um tíma að myndbreytingu skulu meðhöndluð sem lifunargögn þar sem öll dauðsföll eða einstaklingar sem ná ekki 62. NF-stigi á 70 dögum eru meðhöndluð sem hægristýfð gögn (e. *right-censored data*) (þ.e. sanngildið er yfir 70 dagar en rannsóknin endar eftir 70 daga áður en dýrin hafa náð 62. NF-stigi). Miðgildistíminn til loka myndbreytingar á 62. NF-stigi í samanburðarprófun með þynningarvatni skal notaður til að ákvarða dagsetningu prófunarloka. Miðgildistímenn þar til myndbreytingu er lokið er hægt að ákvarða með Kaplan-Meier-mati (e. *Kaplan-Meier product-limit estimator*). Þennan endapunkt skal greina með því að nota líkan Cox fyrir hlutfallslega áhættu (e. *Cox proportional hazard model*) með blönduðum áhrifum þar sem tekið er tillit til samhliða uppbyggingar rannsóknarinnar.

**Vefjameinafræðileg gögn (alvarleikastigafjöldi og þroskunarstig)**

Vefjameinafræðileg gögn eru í formi alvarleikastigafjölda eða þroskunarstiga. Í prófi sem nefnt er RSCABS-próf (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) er notuð Rao-Scotts-aðlögun með stíglækkun á Cochran-Armitage-leitniþrófi fyrir hvert alvarleikastig í vefjameinafræðilegu svöruninni (Green o.fl., 2014). Í Rao-Scott-aðlöguninni felst tilraunahönnun sem fellir samhliða kerfið inn í prófunina. Verkferlið „by Slices“ (í sneiðum) felur í sér þá líffræðilegu væntingu að alvarleiki áhrifa hafi tilhneigingu til að aukast með auknum skömmtum eða styrk en viðheldur um leið stigum hvers viðfangsefnis og leiðir í ljóst alvarleika hvers konar áhrifa sem finnast. Verkferli RSCABS-prófsins ákvarðar ekki einungis hvaða meðferðir eru tölfraðilega frábrugðnar samanburðinum (þ.e. þar sem sjúklegt ástand er alvarlegra en í samanburðinum) heldur ákvarðar það einnig við hvaða alvarleikastig mismunurinn á sér stað og skapar þar með þarft samhengi fyrir greininguna. Ef um er að ræða að ákvarða þroskunarstig kynkirtla og kynrásá skulu gögnin meðhöndluð enn frekar vegna þess að forsenda RSCABS-prófs er að alvarleiki áhrifa aukist með skammtinum. Áhrifin sem koma fram geta verið seinkuð eða hröðuð þroskun. Þess vegna skal greina gögn um þroskunarstigsákvörðun eins og þau eru skráð til að koma auga á hraðaða þroskun og síðan umsnúa þeim handvirkt fyrir aðra greiningu til að koma auga á seinkaða þroskun.

Mynd 1

**Ákvarðanatökutré fyrir tölfraðilega greiningu fyrir rannsókn á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA)**



HEIMILDIR

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1 108-1 116.

## 8. viðbætur.

## ATRÍÐI SEM ÞARF AÐ HAFI Á HUGA ÞEGAR FYLGST ER HRYGGSKEKKJU OG HÚN LÁGMÖRKUÐ

Sjálfvakinn hryggskekkja, sem kemur yfirleitt í ljós sem „boginn hali“ á halakörtum af tegundinni *Xenopus laevis*, getur flækt formfræðilegar og atferlistengdar athuganir á prófunarþýðum. Reynt skal að lágmarka eða útrýma tíðni hryggskekkju, bæði í stofni og við prófunarskilyrði. Í endanlegri prófun er mælt með því að algengi hryggskekkju í meðallagi og alvarlegrar hryggskekkju sé undir 10% til að auka tiltrú á því að prófunin geti greint meðferðartengd áhrif á þroskun hjá froskdýralirfum sem eru heilbrigðar að öðru leyti.

Við daglegar athuganir meðan endanleg prófun stendur yfir skal bæði skrá tíðni (einstaklingstalning) og alvarleika hryggskekkju þegar hún er til staðar. Afbrigðileikanum skal lýst að því er varðar staðsetningu (t.d. framan eða aftan við þarfagang) og í hvaða átt sveigjan er (t.d. hliðlæg eða frá baki að kviði). Alvarleika má flokka sem hér segir:

(EÁ) ekki áberandi: engin sveigja til staðar

- 1) Hverfandi: lítil sveigja á aftari hluta hliðlægt að þarfagangi; sést einungis í hvíld
- 2) Í meðallagi: sveigja á aftari hluta hliðlægt að þarfagangi; sést alltaf en hindrar ekki hreyfingu
- 3) Alvarleg: hliðlæg sveigja framan við þarfagang; EÐA hvers konar sveigja sem torveldar hreyfingu; EÐA hvers konar sveigja frá baki að kviði

Vísindaleg ráðgjafanefnd Umhverfisverndarstofnunar Bandaríkjanna (FIFRA SAP 2013) fór yfir samantektargögn um hryggskekkju úr 15 greiningum á myndbreytingu hjá froskdýrum með *X. laevis* (51. NF-stig til 60+ NF-stigs) og veitti almennar ráðleggingar til að draga úr algengi þessa afbrigðileika í prófunarþýðum. Ráðleggingarnar skipta máli fyrir rannsóknina á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) jafnvel þótt þessi rannsókn nái yfir lengri þroskunartímalínu.

**Rannsóknarsöguleg frammistaða við got**

Almennt skal nota heilbrigð fullorðin dýr af miklum gæðum sem undaneldispör; ef fjarlægð eru undaneldispör sem eignast afkvæmi með hryggskekkju gæti það lágmarkað til lengri tíma að hún komi fyrir. Einkum getur verið gagnlegt að lágmarka notkun á veiddum, villtum undaneldisstofnum. Váhrifátímabil rannsóknar á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) hefst með fósturvísnum á 8.–10. NF-stigi og það er ekki gerlegt að ákvarða við upphaf prófunar hvort tilteknir einstaklingar verði með hryggskekkju. Til viðbótar við að fylgjast með tíðni hryggskekkju hjá dýrum sem eru sett í prófun skal því skrá rannsóknarsögulegan árangur klakhópa (þ.m.t. tíðni hryggskekkju í öllum lirfum sem fá að þroskast). Það getur verið gagnlegt að vakta enn frekar hvaða hluti hvers klakhóps er ekki notaður í tiltekinni rannsókn og gera grein fyrir þessum athugunum (FIFRA SAP 2013).

**Vatnsgæði**

Það er mikilvægt að tryggja fullnægjandi vatnsgæði, bæði hjá stofni á rannsóknarstofu og meðan prófunin stendur yfir. Til viðbótar við viðmiðanir fyrir vatnsgæði sem eru metnar reglubundið í eiturhrifaprófunum í vatni getur verið gagnlegt að vakta og leiðrétta hvers konar næringarskort (t.d. skort á C-vítamíni, kalsíumi, fosfór) eða umframgildi selens og kopars sem greint hefur verið frá að valdi hryggskekkju að mismiklu marki hjá dýrum af tegundunum *Rana* sp. og *Xenopus* sp. sem eru alin á rannsóknarstofum (Marshall o.fl. 1980; Leibovitz o.fl. 1992; Martinez o.fl. 1992; eins og greint er frá í FIFRA SAP 2013). Notkun á viðeigandi mataræði (sjá 4. viðbæti) og regluleg hreinsun á tönkum mun að jafnaði almennt bæta vatnsgæði og heilbrigði prófunarsýnanna.

## Fóður

Sérstök ráðgjöf um mataræði sem hefur reynst vel í rannsóknum á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) er skýrð nánar í 4. viðbæti. Mælt er með því að fóðurgjafar séu skimaðir fyrir líffræðilegum eitrefnum, illgresiseyðum og öðrum varnarefnum sem vitað er að valda hryggskekkju í *X. laevis* eða öðrum lagardýrum (Schlenk og Jenkins 2013). Til dæmis hafa váhrif frá tilteknum kólmesterasahömlum verið tengd við hryggskekkju í fiski (Schultz o.fl. 1985) og froskum (Bacchetta o.fl. 2008).

## HEIMILDIR

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

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

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

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 11: 445-453.

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

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

---