II

(Rechtsakte ohne Gesetzescharakter)

VERORDNUNGEN

VERORDNUNG (EU) 2019/1390 DER KOMMISSION

vom 31. Juli 2019

zur Änderung — zwecks Anpassung an den technischen Fortschritt — des Anhangs der Verordnung (EG) Nr. 440/2008 zur Festlegung von Prüfmethoden gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH)

(Text von Bedeutung für den EWR)

DIE EUROPÄISCHE KOMMISSION —

gestützt auf den Vertrag über die Arbeitsweise der Europäischen Union,

gestützt auf die Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Chemikalienagentur, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission [1], insbesondere auf Artikel 13 Absatz 2,

in Erwägung nachstehender Gründe:

(1) In der Verordnung (EG) Nr. 440/2008 der Kommission [2] sind die zum Zwecke der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 anzuwendenden Prüfmethoden zur Bestimmung der physikalisch-chemischen Eigenschaften, der Toxizität und der Ökotoxizität von Chemikalien festgelegt.

(2) Für die Prüfung von Chemikalien zu Regulierungszwecken erarbeitet die Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) harmonisierte und international vereinbarte Prüfrichtlinien. Unter Berücksichtigung des wissenschaftlichen Fortschritts in diesem Bereich veröffentlicht die OECD regelmäßig neue und überarbeitete Prüfrichtlinien.

(3) Um dem technischen Fortschritt Rechnung zu tragen und nach Möglichkeit die Zahl der für Versuchszwecke verwendeten Tiere gemäß Artikel 13 Absatz 2 der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 zu verringern, sollten nach der Annahme der einschlägigen OECD-Prüfrichtlinien zwei neue Prüfmethoden zur Bewertung der Ökotoxizität sowie neun neue Prüfmethoden zur Bestimmung der Toxizität für die menschliche Gesundheit festgelegt und sieben Prüfmethoden aktualisiert werden. Elf dieser Prüfmethoden betreffen In-vitro-Prüfungen auf Reizung/Verätzung der Haut und der Augen, Sensibilisierung der Haut, Genotoxizität und endokrine Effekte. Die Interessenträger wurden zu der vorgeschlagenen Änderung konsultiert.

[1] ABl. L 396 vom 30.12.2006, S. 1.

[2] Verordnung (EG) Nr. 440/2008 der Kommission vom 30. Mai 2008 zur Festlegung von Prüfmethoden gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH) (ABl. L 142 vom 31.5.2008, S. 1).

(4) Die Verordnung (EG) Nr. 440/2008 sollte daher entsprechend geändert werden.

(5) Die in dieser Verordnung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des nach Artikel 133 der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 eingesetzten Ausschusses —

HAT FOLGENDE VERORDNUNG ERLASSEN:

Artikel 1

Der Anhang der Verordnung (EG) Nr. 440/2008 wird nach Maßgabe des Anhangs der vorliegenden Verordnung geändert.

Artikel 2

Diese Verordnung tritt am zwanzigsten Tag nach ihrer Veröffentlichung im *Amtsblatt der Europäischen Union* in Kraft.

Diese Verordnung ist in allen ihren Teilen verbindlich und gilt unmittelbar in jedem Mitgliedstaat.

Brüssel, den 31. Juli 2019.

Für die Kommission
Der Präsident
Jean-Claude JUNCKER

ANHANG

Der Anhang der Verordnung (EG) Nr. 440/2008 wird wie folgt geändert:

(1) In Teil B erhält Kapitel B.4 folgende Fassung:

„B.4 **AKUTE HAUTREIZUNG/-VERÄTZUNG**

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 404 (2015). Die OECD-Richtlinien für die Prüfung von Chemikalien werden regelmäßig überprüft, um sicherzustellen, dass sie auf den besten verfügbaren wissenschaftlichen Erkenntnissen beruhen. Bei der Prüfung der OECD TG 404 wurde besonderes Augenmerk auf mögliche Verbesserungen im Hinblick auf Belange des Tierschutzes und auf die Auswertung aller bereits vorhandenen Angaben über die Chemikalie gelegt, um unnötige Versuche an Labortieren zu vermeiden. Die aktualisierte Fassung der OECD TG 404 (1981 ursprünglich angenommen und 1992, 2002 und 2015 geändert) enthält Verweise auf das IATA-Leitliniendokument (Integrated Approaches to Testing and Assessment = integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze) zu Hautreizungen/-verätzungen (1), in dem ein modularer Ansatz für Prüfungen auf Hautreizungen und -verätzungen vorgeschlagen wird. Die IATA beschreiben mehrere Module, in denen Informationsquellen und Analyseinstrumente zu Gruppen zusammengefasst werden. Sie enthalten i) Leitlinien dazu, wie vorhandene Daten aus Versuchen und aus anderen Quellen integriert und verwendet werden können, um das Hautreizungs- und das Hautverätzungspotenzial von Chemikalien zu bewerten, und ii) einen Vorschlag zur Durchführung ggf. erforderlicher weiterer Versuche (1). Zudem wird in dieser Leitlinie empfohlen, beim *In-vivo*-Vorversuch erforderlichenfalls die drei Mullläppchen, mit denen die Prüfchemikalie aufgetragen wird, nacheinander und nicht gleichzeitig am Körper des Tieres zu fixieren.

2. Definitionen der Begriffe Hautreizung und Hautverätzung sind der Anlage zu dieser Prüfmethode zu entnehmen.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

3. Im Interesse wissenschaftlicher Verlässlichkeit und des Tierschutzes sollten *In-vivo*-Prüfungen erst dann in Erwägung gezogen werden, wenn alle für das Hautverätzungs-/-reizungspotenzial der Prüfchemikalie verfügbaren einschlägigen Daten auf Basis ihrer Beweiskraft (weight-of-evidence, WoE) ausgewertet worden sind, wie in den integrierten Prüfungs- und Bewertungsansätzen für Hautverätzungen und -reizungen (d. h. in den drei Teilen dieses Leitliniendokuments und in den betreffenden Modulen) beschrieben (1). In Teil 1 werden vorhandene Daten in sieben Modulen unter Berücksichtigung von Humandaten, *In-vivo*-Daten, *In-vitro*-Daten und Daten zu physikalisch-chemischen Eigenschaften (pH-Wert, insbesondere starke Azidität oder Alkalität, usw.) sowie von Daten behandelt, die nicht auf der Verwendung von Prüfmethoden beruhen. In Teil 2 wird die Durchführung einer WoE-Analyse beschrieben. Wenn diese WoE-Analyse noch nicht zu einem schlüssigen Ergebnis führt, sollten weitere Prüfungen durchgeführt werden, wie in Teil 3 beschrieben. Dabei sollte mit *In- vitro*-Methoden begonnen werden. *In-vivo*-Prüfungen sollten erst als letzte Möglichkeit in Betracht gezogen werden. Diese Analyse soll somit dazu führen, dass weniger *In-vivo*-Prüfungen zum Hautverätzungs-/-reizungspotenzial von Prüfchemikalien durchgeführt werden, wenn aus anderen Studien zu diesen beiden Endpunkten bereits ausreichende Belege verfügbar sind.

PRINZIP DER IN-VIVO-PRÜFUNG

4. Die Prüfchemikalie wird in einmaliger Dosierung auf die Haut eines Versuchstiers aufgetragen; nicht behandelte Hautareale dienen als Kontrolle. Der Grad der Reizung/Verätzung wird in zuvor festgelegten Zeitabständen bestimmt und bewertet und anschließend beschrieben, um eine umfassende Beurteilung der Wirkung vornehmen zu können. Die Beobachtungsdauer sollte ausreichend sein, um die Reversibilität bzw. Irreversibilität der Wirkungen vollständig zu erfassen,

5. Tiere mit starken und anhaltenden Anzeichen von Leiden und/oder Schmerzen sollten jederzeit während des Versuchs human getötet werden, wobei die Prüfchemikalie entsprechend einzustufen ist. Kriterien für die Entscheidung über die humane Tötung moribunder Tiere mit starken Leidensanzeichen sind Gegenstand eines gesonderten Leitfadens (2).

VORBEREITUNG DER IN-VIVO-PRÜFUNG

Auswahl von Versuchstierarten

6. Das bevorzugte Labortier ist das Albino-Kaninchen. Für diese Prüfung sind gesunde junge geschlechtsreife Kaninchen zu verwenden. Die Verwendung anderer Spezies ist zu begründen.

Vorbereitung der Versuchstiere

7. Etwa 24 Stunden vor dem Versuch wird das Fell auf dem Rücken der Versuchstiere gründlich geschoren. Dabei ist darauf zu achten, dass die Haut nicht verletzt wird. Es sind nur Tiere mit gesunder, unverletzter Haut zu verwenden.

8. Einige Kaninchenrassen haben Stellen mit dichtem Fellbewuchs, die zu bestimmten Zeiten im Jahr deutlicher hervortreten. An diesen Stellen sollte keine Prüfung durchgeführt werden.

Haltungs- und Fütterungsbedingungen

9. Die Tiere sollten einzeln gehalten werden. Die Temperatur im Versuchstierraum sollte für Kaninchen 20 °C (± 3 °C) betragen. Obwohl die relative Luftfeuchtigkeit mindestens 30 % betragen und außer bei der Reinigung vorzugsweise nicht über 70 % liegen sollte, ist ein Wert von 50-60 % anzustreben. Für die Beleuchtung ist Kunstlicht zu verwenden und so zu schalten, dass sich 12 Stunden Licht mit 12 Stunden Dunkelheit abwechseln. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist.

PRÜFVERFAHREN

Applikation der Prüfchemikalie

10. Die Prüfchemikalie sollte auf eine kleine Hautfläche (etwa 6 cm^2) aufgetragen und mit einem Mullläppchen abgedeckt werden, das mit einem nicht reizenden Pflaster fixiert wird. Wenn eine direkte Applikation nicht möglich ist (z. B. bei Flüssigkeiten oder bestimmten Pasten), sollte die Prüfchemikalie zunächst auf das Mullläppchen gegeben werden, das anschließend auf der Haut fixiert wird. Für die Dauer der Exposition sollte das Läppchen mit einem geeigneten Semi-Okklusiv-Verband lose auf der Haut gehalten werden. Wird die Prüfchemikalie auf ein Läppchen aufgebracht, so ist dieses so auf der Haut zu fixieren, dass ein guter Hautkontakt und die gleichmäßige Verteilung der Prüfchemikalie auf der Haut gewährleistet sind. Es ist dafür zu sorgen, dass das Tier nicht an das Mullläppchen gelangt und die Prüfchemikalie nicht oral aufnehmen oder inhalieren kann.

11. Flüssige Prüfchemikalien werden gewöhnlich unverdünnt verwendet. Wird der Versuch mit Feststoffen durchgeführt (die im Bedarfsfall pulverisiert werden können), sollte die Prüfchemikalie mit gerade so viel Wasser (bzw. gegebenenfalls mit einem anderen geeigneten Vehikel) angefeuchtet werden, dass ein guter Kontakt mit der Haut sichergestellt ist. Bei Verwendung eines anderen Vehikels als Wasser sollte dessen möglicher Einfluss auf eine Reizung der Haut durch die Prüfchemikalie minimal sein.

12. Nach Ablauf der Expositionszeit, die in der Regel 4 Stunden beträgt, wird die restliche Prüfchemikalie möglichst mit Wasser oder einem geeigneten Lösungsmittel entfernt, ohne die bestehende Reaktion oder die Integrität der Epidermis zu beeinträchtigen.

Dosierung

13. Bei Flüssigkeiten werden 0,5 ml und bei Feststoffen oder Pasten 0,5 g auf die vorbereitete Hautstelle aufgetragen.

Vorversuch (*In-vivo*-Prüfung auf Hautreizung/-verätzung an einem Tier)

14. Wenn eine Prüfchemikalie aufgrund einer WoE-Analyse oder früherer *In-vitro*-Prüfungen entweder als ätzend oder reizend oder als nicht klassifiziert eingestuft wurde, sind weitere *In-vivo*-Prüfungen im Allgemeinen nicht erforderlich. Erscheint allerdings die Ermittlung zusätzlicher Daten gerechtfertigt, wird die *In-vivo*-Prüfung zunächst mit nur einem Versuchstier wie im Folgenden beschrieben durchgeführt. Dem Tier werden dann bis zu drei Mullläppchen nacheinander appliziert. Das erste Läppchen wird nach drei Minuten entfernt. Wird keine schwere Hautreaktion festgestellt, wird ein zweites Läppchen an einer anderen Stelle appliziert, das nach einer Stunde entfernt wird. Lassen die Beobachtungen zu diesem Zeitpunkt den Schluss zu, dass eine Exposition für die Dauer von vier Stunden ethisch verantwortbar ist, wird ein drittes Läppchen appliziert und nach vier Stunden entfernt. Anschließend wird die Reaktion bewertet.

15. Der Versuch wird sofort abgebrochen, falls nach einer der drei sequenziellen Expositionen eine ätzende Wirkung beobachtet wird. Ist nach der Entfernung des letzten Läppchens keine Verätzung feststellbar, wird das Tier 14 Tage lang beobachtet, sofern nicht vor Ablauf dieser Zeit Verätzungen auftreten.

16. Geht man davon aus, dass die Prüfchemikalie zwar keine hautätzende Wirkung hat, aber Hautreizungen hervorrufen kann, sollte nur ein Tier verwendet werden, dem ein einziges Läppchen für die Dauer von vier Stunden appliziert wird.

Bestätigungsprüfung (*In-vivo*-Prüfung auf hautreizende Wirkungen an zusätzlichen Tieren)

17. Wird im Vorversuch keine ätzende Wirkung beobachtet, sollte die Reizungsreaktion bzw. die negative Reaktion an bis zu zwei weiteren Tieren mit jeweils einem Läppchen bei einer Expositionsdauer von vier Stunden bestätigt werden. Ergibt der Vorversuch eine Reizungswirkung, kann die Bestätigungsprüfung als sequenzieller Versuch bzw. durch gleichzeitige Exposition von zwei weiteren Tieren durchgeführt werden. Findet ausnahmsweise kein Vorversuch statt, können zwei bzw. drei Tiere mit einem Läppchen behandelt werden, das nach vier Stunden entfernt wird. Bei Verwendung von zwei Versuchstieren, die beide die gleiche Reaktion zeigen, erübrigen sich weitere Untersuchungen. Andernfalls wird auch das dritte Tier geprüft. Unklare Reaktionen könnten möglicherweise bewertet werden, indem Versuche mit weiteren Tieren durchgeführt werden.

Beobachtungszeitraum

18. Der Beobachtungszeitraum sollte so bemessen sein, dass die Reversibilität der festgestellten Wirkungen vollständig bewertet werden kann. Allerdings sollte der Versuch abgebrochen werden, sobald das betreffende Tier starke und anhaltende Anzeichen von Leiden und Schmerzen zeigt. Um feststellen zu können, ob die Wirkungen reversibel sind, sollten die Tiere für die Dauer von bis zu 14 Tagen nach Entfernung der Läppchen beobachtet werden. Bilden sich die Schäden vor Ablauf dieser 14 Tage zurück, sollte der Versuch zum betreffenden Zeitpunkt beendet werden.

Klinische Beobachtungen und Bewertung von Hautreaktionen

19. Die Tiere sind auf Anzeichen von Hautrötungen und Ödemen zu untersuchen, wobei die Reaktion 60 Minuten sowie 24, 48 und 72 Stunden nach Entfernen des Läppchens bewertet wird. Beim Vorversuch an einem Tier wird die behandelte Stelle auch unmittelbar nach Entfernen des Läppchens untersucht. Die Hautreaktionen werden bewertet und anhand der Punkteskala in der unten stehenden Tabelle dokumentiert. Bei Hautschädigungen, die nach 72 Stunden weder als Reizung noch als Verätzung eingestuft werden können, ist unter Umständen die Beobachtung bis zum 14. Tag erforderlich, um Aussagen zur Reversibilität der Wirkungen treffen zu können. Neben Hautreizungen sollten alle lokal begrenzten toxischen Wirkungen (z. B. Entfettung der Haut) und alle negativen systemischen Wirkungen (z. B. klinische Anzeichen für Toxizität und Veränderungen des Körpergewichts) vollständig beschrieben und dokumentiert werden. Unklare Reaktionen sollen gegebenenfalls durch eine histopathologische Untersuchung abgeklärt werden.

20. Die Bewertung von Hautreaktionen ist zwangsläufig subjektiv. Um die Einstufung von Hautreaktionen stärker zu vereinheitlichen und den Prüflabors und allen an den Versuchen und an der Auswertung der Versuchsergebnisse Beteiligten die Arbeit zu erleichtern, müssen die Prüfer im Umgang mit der Bewertungsskala (siehe unten stehende Tabelle) entsprechend geschult werden. Dabei könnte sich ein Leitfaden mit Abbildungen zur Bewertung von Hautreizungen und anderen Schädigungen als hilfreich erweisen (3).

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

21. Die Untersuchungsergebnisse sollten im Abschlussbericht in Tabellenform dargestellt werden und alle in Nummer 24 genannten Punkte umfassen.

Auswertung der Ergebnisse

22. Die Bewertung der Hautreizung sollte anhand der Art und des Schweregrads der Schädigung und deren Reversibilität bzw. Irreversibilität vorgenommen werden. Die einzelnen ermittelten Schweregrade stellen keinen allein gültigen Maßstab für die reizenden Eigenschaften eines Stoffs dar, denn es werden auch andere Effekte der Prüfchemikalie beurteilt. Vielmehr sollten diese einzelnen Graduierungswerte als Referenzwerte betrachtet werden, die zusammen mit allen anderen Ergebnissen der Studie zu beurteilen sind.

23. Bei der Bewertung von hautreizenden Reaktionen spielt auch die Reversibilität der Hautschädigung eine Rolle. Treten Reaktionen wie (begrenzter) Haarausfall, Hyperkeratose, Hyperplasie und Schuppung bis zum Ende des 14-tägigen Beobachtungszeitraums auf, ist die Prüfchemikalie als hautreizende Chemikalie zu betrachten.

Prüfbericht

24. Der Prüfbericht muss die folgenden Angaben enthalten:

Begründung für die In-vivo-Prüfung:

— WoE-Analyse von Daten aus früheren Versuchen unter Einbeziehung von Ergebnissen aus der sequenziellen Prüfstrategie;

— Beschreibung aller einschlägigen Daten aus früheren Versuchen;

— Daten, die in den einzelnen Stufen der Prüfstrategie erhoben wurden;

— Beschreibung der durchgeführten *In-vitro*-Prüfungen mit Einzelheiten zu den angewendeten Verfahren sowie zu den Ergebnissen für Prüf-/Referenzstoffe;

— WoE-Analyse als Grundlage für die Durchführung einer *In-vivo*-Studie.

Prüfchemikalie:

— Einkomponentiger Stoff: chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.

— Mehrkomponentiger Stoff: Gemische und Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien (UVCB): so weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten;

— physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;

— Herkunft, Chargennummer, sofern vorhanden;

— Behandlung der Prüfchemikalien/Kontrollstoffe vor der Prüfung, sofern relevant (z. B. Erwärmen, Mahlen);

— Stabilität der Prüfchemikalie, letztes Verwendungsdatum oder Datum für erneute Analyse, soweit bekannt;

— Lagerungsbedingungen.

Vehikel:

— Angaben zur Identität, (gegebenenfalls) Konzentration; Einsatzvolumen;

— Begründung der Auswahl des Vehikels.

Versuchstier(e):

— verwendete Spezies/Rasse, Begründung für den Verzicht auf die Verwendung von Albino- Kaninchen und die Nutzung anderer Tiere;

— Anzahl der Versuchstiere pro Geschlecht;

— Gewicht der einzelnen Tiere bei Versuchsbeginn und -ende;

— Alter der Tiere bei Beginn der Studie;

— Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.

Prüfbedingungen:

— Methode der Vorbereitung der Applikationsstelle;

— Angaben zur Art der verwendeten Läppchen sowie zur Patching-Technik;

— Angaben zur Herstellung, Applikation und Entfernung der Prüfchemikalie.

Ergebnisse:

— Tabellarische Erfassung der Bewertung des Schweregrades von Hautreizungs-/-verätzungsreaktionen zu allen Messzeitpunkten für jedes einzelne Versuchstier;

— Beschreibungen aller beobachteten Schädigungen;

— ausführliche Beschreibung von Art und Schwere der festgestellten Hautreizung bzw. -verätzung sowie Angaben zu eventuellen histopathologischen Befunden;

— Beschreibung anderer lokal begrenzter negativer (z. B. Entfettung der Haut) und systemischer Wirkungen neben den Hautreizungen bzw. -verätzungen.

Diskussion der Ergebnisse

Schlussfolgerungen

LITERATUR

(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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

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

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 19), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

Tabelle

Bewertung Von Hautreaktionen

Bildung von Erythemen und Schorf

Kein Erythem	0
Sehr leichtes Erythem (kaum wahrnehmbar)	1
Klar abgegrenztes Erythem	2
Mäßiges bis ausgeprägtes Erythem	3
Ausgeprägtes Erythem (dunkelrot) bis hin zur Schorfbildung, so dass eine Bewertung nicht möglich ist	4

Höchstmögliche Punktzahl: 4

Bildung von Ödemen

Kein Ödem	0
Sehr leichtes Ödem (kaum wahrnehmbar)	1
Leichtes Ödem (Ränder des betroffenen Areals durch deutliche Schwellung klar abgegrenzt)	2
Mäßiges Ödem (Schwellung etwa 1 mm)	3
Ausgeprägtes Ödem (Schwellung mehr als 1 mm und über den Expositionsbereich hinaus)	4

Höchstmögliche Punktzahl: 4

Zur Klärung unklarer Reaktionen kann eine histopathologische Untersuchung erfolgen.

Anlage

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Chemikalie: Ein Stoff oder Gemisch.

Hautreizung: Das Auslösen einer reversiblen Hautschädigung nach Applikation einer Prüfchemikalie für die Dauer von bis zu 4 Stunden.

Hautverätzung: Das Auslösen einer irreversiblen Hautschädigung, d. h. einer sichtbaren, bis in das Corium reichenden Nekrose der Epidermis nach Applikation einer Prüfchemikalie für die Dauer von bis zu 4 Stunden. Verätzungsreaktionen sind gekennzeichnet durch Geschwüre, Blutungen, blutige Verschorfungen und am Ende des Beobachtungszeitraums von 14 Tagen durch eine auf ein Ausbleichen der Haut zurückzuführende Verfärbung, komplett haarlose Bereiche und Narben. Bei der Beurteilung fragwürdiger Schädigungen ist die Histopathologie mit zu berücksichtigen.

Prüfchemikalie: Ein beliebiger Stoff oder eine beliebige Mischung, der/die nach dieser Methode geprüft wird.“

(2) In Teil B erhält Kapitel B.17 folgende Fassung:

„B.17 ***IN VITRO*-GENMUTATIONSPRÜFUNG AN SÄUGETIERZELLEN ANHAND DES HPRT- UND DES XPRT-GENS**

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode (PM) entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 476 (2016). Die Prüfmethoden werden regelmäßig überarbeitet, um dem wissenschaftlichen Fortschritt, sich ändernden Rechtsvorgaben und Belangen des Tierschutzes gerecht zu werden. Diese überarbeitete Fassung der Prüfmethode B.17 beruht auf fast 30-jähriger Erfahrung mit dieser Prüfung sowie auf der Entwicklung einer eigenen neuen Methode für *In-vitro*-Genmutationsprüfungen an Säugetierzellen anhand des Thymidin-Kinase-Gens. Sie ist Teil einer Reihe von Prüfmethoden zur genetischen Toxikologie. Die OECD hat ein Dokument erstellt, das kurz gefasste und hilfreiche Informationen zu Untersuchungen zur genetischen Toxikologie sowie eine Übersicht über die jüngsten Änderungen der OECD-Prüfrichtlinien zur genetischen Toxikologie enthält (1).

2. Die *In-vitro*-Genmutationsprüfung an Säugetierzellen wird zum Nachweis von chemisch induzierten Genmutationen verwendet. Mit den bei dieser Prüfung verwendeten Zelllinien werden Vorwärtsmutationen in Reporter-Genen gemessen, insbesondere im endogenen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen (Hprt bei Zelllinien von Nagern und HPRT bei menschlichen Zellen, bei dieser Prüfmethode gemeinsam als Hprt-Gen und als HPRT-Prüfung bezeichnet) und im Transgen von Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (gpt) (im Folgenden XPRT-Prüfung genannt). Durch die HPRT- und XPRT-Mutationsprüfung lassen sich unterschiedliche Spektren genetischer Ereignisse ermitteln. Neben den mit der HPRT-Prüfung nachgewiesenen Mutationsereignissen (z. B. Basenpaarsubstitutionen, Rasterverschiebungen, kleine Deletionen und Insertionen) kann die Autosomenlokation des gpt-Transgens den Nachweis von Mutationen infolge umfangreicher Deletionen und u. U. mitotischer Rekombinationen ermöglichen, die in der HPRT-Prüfung nicht erkannt wurden, weil das Hprt-Gen sich auf dem X-Chromosom befindet (2) (3) (4) (5) (6) (7). Aus rechtlichen Gründen ist die XPRT-Prüfung gegenwärtig weniger verbreitet als die HPRT-Prüfung.

3. Es gelten die Begriffsbestimmungen in Anlage 1.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

4. *In vitro* durchgeführte Prüfungen erfordern in der Regel den Zusatz eines exogenen Fremdstoff-Metabolisierungssystems. Mit diesem exogenen Stoffwechselaktivierungssystem lassen sich die *In-vivo*-Bedingungen jedoch nicht gänzlich nachvollziehen.

5. Es sind unbedingt Bedingungen zu vermeiden, die zu künstlich verursachten Positivergebnissen führen könnten (d. h. mögliche Wechselwirkungen mit dem Prüfsystem), die nicht von einer direkten Interaktion zwischen den Prüfchemikalien und dem genetischen Material der Zelle herrühren; zu solchen Bedingungen gehören Veränderungen des pH-Wertes bzw. der Osmolalität (8) (9) (10), eine Interaktion mit einzelnen Komponenten des Mediums (11) (12) oder eine hochgradige Zytotoxizität (13). Zytotoxizitätswerte, die die empfohlenen Höchstwerte nach Nummer 19 überschreiten, werden mit Blick auf die HPRT-Prüfung als zu hoch betrachtet.

6. Bevor die Prüfmethode an einem Gemisch für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regulierungszweck verwendet wird, ist zu prüfen, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefern kann und, wenn dem so ist, warum. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs gesetzlich vorgeschrieben ist.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

7. Mutierte Zellen, bei denen in der HPRT-Prüfung keine Aktivität des Hprt-Enzyms bzw. in der XPRT-Prüfung keine Aktivität des xprt-Enzyms nachgewiesen wird, sind resistent gegenüber den zytostatischen Wirkungen des purinanalogen 6-Thioguanins (TG). Bei Anwesenheit von Hprt (bei der HPRT-Prüfung) bzw. von gpt (bei der XPRT-Prüfung) sind Zellen hingegen empfindlich gegenüber TG, das die Hemmung des Zellstoffwechsels verursacht und eine weitere Zellteilung verhindert. So können die Mutantenzellen bei Anwesenheit von TG proliferieren, während die normalen Zellen, die das Hprt-Enzym (bei der HPRT-Prüfung) bzw. das gpt-Enzym (bei der XPRT-Prüfung) enthalten, nicht dazu in der Lage sind.

8. Zellen in Suspensions- oder Monoschichtkultur werden über einen angemessenen Zeitraum (3-6 Stunden) mit und ohne exogenes Fremdstoff-Metabolisierungssystem (Nummer 14) mit der Prüfchemikalie behandelt und anschließend subkultiviert, um die Zytotoxizität zu bestimmen und vor der Mutantenselektion die Expression des Phänotyps zu ermöglichen (14) (15) (16) (17). Die Zytotoxizität wird anhand der relativen Überlebensrate (RS). d. h. der Klonierungseffizienz, ermittelt unmittelbar nach der Behandlung und bereinigt um Zellverluste während der Behandlung im Vergleich zur Negativkontrolle bestimmt (Nummer 18 und Anlage 2). Die behandelten Kulturen werden für einen ausreichenden Zeitraum (in der Regel mindestens 7-9 Tage), der für den jeweils gewählten Zelltyp charakteristisch ist, in einem Wachstumsmedium gehalten, um eine annähernd optimale phänotypische Expression der induzierten Mutationen zu ermöglichen. Nach der Expression des Phänotyps wird die Mutantenhäufigkeit bestimmt, indem eine bekannte Anzahl von Zellen auf ein Medium mit dem selektierenden Agens zur Bestimmung der Mutantenkolonien und auf ein Medium ohne selektierendes Agens zur Bestimmung der Klonierungseffizienz (Lebensfähigkeit) aufgeimpft wird. Nach einer geeigneten Inkubationszeit werden die Kolonien gezählt. Die Mutantenhäufigkeit wird anhand der Anzahl der Mutantenkolonien bereinigt um die Klonierungseffizienz bei der Mutantenselektion berechnet.

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Vorbereitungen

Zellen

9. Die bei der HPRT- und der XPRT-Prüfung verwendeten Zelltypen sollten nachweislich eine Empfindlichkeit für chemische Mutagene, eine hohe Klonierungseffizienz, einen stabilen Karyotyp und eine geringe Spontanmutationshäufigkeit aufweisen. Für die HPRT-Prüfung werden meist die Zelllinien CHO, CHL und V79 des chinesischen Hamsters, Maus-Lymphomazellen L5178Y und menschliche Lymphoblastoidzellen TK6 verwendet (18) (19). Für die XPRT-Prüfung werden AS52-Zellen (CHO-Zellen) mit dem gpt-Transgen (nach Deletion des Hprt-Gens) verwendet (20) (21); die HPRT-Prüfung kann bei AS52-Zellen nicht durchgeführt werden, weil das Hprt-Gen deletiert wurde. Die Verwendung anderer Zelllinien sollte gerechtfertigt und validiert sein.

10. Zelllinien sind routinemäßig auf Stabilität der modalen Chromosomenzahl und Mycoplasma-Verunreinigung zu überprüfen (22) (23); bei Verunreinigung oder bei veränderter modaler Chromosomenzahl sollten Zellen nicht verwendet werden. Die normale Dauer des Zellzyklus im Prüflabor sollte bekannt sein und mit den veröffentlichten Zelleigenschaften übereinstimmen. Außerdem sollte die Spontanmutationshäufigkeit der Master-Zellenbestände geprüft werden, und bei nicht annehmbarer Mutationshäufigkeit sollten die Bestände nicht verwendet werden.

11. Vor der Verwendung bei dieser Prüfung sind die Kulturen ggf. von bereits vorhandenen Mutantenzellen zu reinigen, z. B. durch Kultivierung im HAT-Medium bei HPRT-Prüfungen und im MPA-Medium bei der XPRT-Prüfung (5) (24) (siehe Anlage 1). Die gereinigten Zellen können kryokonserviert und anschließend zur Verwendung als Arbeitsstämme wieder aufgetaut werden. Nach Erreichen der normalen Verdopplungszeiten können die frisch aufgetauten Arbeitsstämme für die Prüfungen verwendet werden. Bei Durchführung der XPRT-Prüfung sollten bei Routinekulturen von AS52-Zellen Bedingungen hergestellt werden, bei denen die Erhaltung des gpt-Transgens gewährleistet ist (20).

Medien und Kulturbedingungen

12. Die Kultivierung erfordert geeignete Kulturmedien und Inkubationsbedingungen (Kulturgefäße, befeuchtete Atmosphäre mit einer CO_2-Konzentration von 5 % und eine Inkubationstemperatur von 37 °C). Die Zellkulturen sollten immer unter Bedingungen gehalten werden, bei denen das Wachstum in der Log-Phase sichergestellt ist. Vor allem ist für Medien- und Kulturbedingungen zu sorgen, die ein optimales Zellwachstum während der Expressionszeit und eine optimale Klonierungseffizienz der mutierenden und nichtmutierenden Zellen gewährleisten.

Vorbereitung der Kulturen

13. Zelllinien werden aus Stammkulturen gewonnen und im Kulturmedium in einer solchen Dichte überimpft, dass die Zellen in Suspensions- oder Monolayerkultur während der Behandlung und der Expressionszeit weiterhin exponentiell wachsen (z. B. sollte eine Konfluenz bei in Monolayerkultur gezüchteten Zellen vermieden werden).

Stoffwechselaktivierung

14. Bei Zellen mit unzulänglicher endogener Stoffwechselkapazität sollten exogene metabolisierende Systeme verwendet werden. Das gängigste und, sofern nicht anders begründet, standardmäßig empfohlene System, ist eine durch Ko-Faktoren ergänzte post-mitochondriale Fraktion (S9) aus der Leber von Nagern (in der Regel Ratten), die mit enzyminduzierenden Agenzien wie Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) oder einer Kombination aus Phenobarbiton und β-Naphtoflavon (29) (30) (31) (32) vorbehandelt wurde. Das letztgenannte Gemisch verstößt nicht gegen das Stockholmer Übereinkommen über persistente organische Schadstoffe (33) und hat sich bei der Induktion von Mischfunktionsoxidasen als ebenso wirksam wie Aroclor 1254 erwiesen (29) (31). Die S9-Fraktion wird im Endmedium in der Regel in Konzentrationen von 1 bis 2 % v/v verwendet, kann jedoch auf 10 % v/v erhöht werden. Die Wahl der Art und Konzentration des exogenen Metabolisierungssystems oder metabolischen Agens ist möglicherweise von der geprüften Stoffklasse abhängig (34) (35) (36).

Vorbereitung der Prüfchemikalie

15. Feste Prüfchemikalien sollten vor der Zellbehandlung in geeigneten Lösungsmitteln gelöst und ggf. verdünnt werden (Nummer 16). Flüssige Prüfchemikalien können dem Versuchssystem vor der Behandlung direkt beigegeben und/oder verdünnt werden. Gasförmige oder flüchtige Prüfchemikalien sind durch entsprechende Modifikationen der Standardprotokolle zu prüfen, z. B. durch Behandlung in hermetisch verschlossenen Kulturgefäßen (37) (38). Zubereitungen der Prüfchemikalie sollten kurz vor der Behandlung hergestellt werden, es sei denn, die Stabilität der Chemikalie bei Lagerung wird nachgewiesen.

PRÜFBEDINGUNGEN

Lösungsmittel

16. Das Lösungsmittel sollte so gewählt werden, dass eine optimale Löslichkeit der Prüfchemikalien gewährleistet ist, ohne dass die Durchführung der Prüfung beeinträchtigt wird, z. B. durch Veränderung des Zellwachstums, Beeinträchtigung der Integrität der Prüfchemikalie, Reaktion mit Kulturgefäßen oder Behinderung des Metabolisierungssystems. Nach Möglichkeit sollte ein wässriges Lösungsmittel (oder Kulturmedium) verwendet werden. Gründlich erprobte Lösungsmittel sind z. B. Wasser und Dimethylsulfoxid. Organische Lösungsmittel sollten 1 % v/v und wässrige Lösungsmittel (Kochsalzlösung oder Wasser) 10 % v/v im Endmedium möglichst nicht überschreiten. Kommen weniger gründlich erprobte Lösungsmittel zur Verwendung (z. B Ethanol oder Aceton), ist deren Verwendung durch Daten zu stützen, die belegen, dass sie mit den Prüfchemikalien und mit dem Prüfsystem verträglich und in der verwendeten Konzentration nicht gentoxisch sind. Sind keine entsprechenden Belege verfügbar, sollten unbedingt unbehandelte Kontrollen (siehe Anlage 1) einbezogen werden, um nachzuweisen, dass durch die gewählten Lösungsmittel keine schädlichen oder mutagenen Wirkungen ausgelöst werden.

Messung der Zytotoxizität und Auswahl der Expositionskonzentrationen

17. Bei der Bestimmung der höchsten Konzentration der Prüfchemikalie sind Konzentrationen zu vermeiden, die zu künstlich positiven Reaktionen führen können, z. B. zu übermäßiger Zytotoxizität (Nummer 20), Ausfällungen im Kulturmedium (Nummer 21) oder ausgeprägten Veränderungen des pH-Werts oder der Osmolalität (Nummer 5). Sofern die Prüfchemikalie zum Zeitpunkt der Zugabe den pH-Wert des Mediums erheblich verändert, lässt sich der pH-Wert auch durch Anwendung eines Puffers im Endmedium einstellen, damit künstlich positive Reaktionen vermieden und geeignete Kulturbedingungen aufrechterhalten werden.

18. Die Konzentrationen werden u. a. nach der Zytotoxizität ausgewählt (Nummern 20-22). Wenngleich die Bewertung der Zytotoxizität im Rahmen eines Vorversuchs nützlich sein kann, um eine bessere Bestimmung der im Hauptversuch verwendeten Konzentrationen vornehmen zu können, ist ein Vorversuch nicht erforderlich. Auch wenn die anfängliche Zytotoxizität bewertet wird, ist im Hauptversuch die Zytotoxizität jeder einzelnen Kultur zu messen. Die Zytotoxizität sollte anhand der relativen Überlebensrate (RS) (d. h. der Klonierungseffizienz (CE)) von Zellen ermittelt werden, die nach der Behandlung umgehend plattiert werden; dabei ist eine Bereinigung um Zellverluste während der Behandlung auf der Grundlage der Zellzahl im Vergleich zur bereinigten Klonierungseffizienz bei Negativkontrollen (mit einer Überlebensrate von 100 %) vorzunehmen (Formel siehe Anlage 2).

19. Es sollten mindestens vier Prüfkonzentrationen (ausgenommen das Lösungsmittel und Positivkontrollen) ausgewertet werden, die die Akzeptanzkriterien erfüllen (geeignete Zytotoxizität, Anzahl der Zellen usw.). Die Verwendung von Zweifachkulturen ist zu empfehlen, doch können für jede überprüfte Konzentration auch Replikat- oder Einfachkulturen herangezogen werden. Die Ergebnisse aus den unabhängigen Replikatkulturen bei einer gegebenen Konzentration sollten getrennt angegeben werden, können zu Datenanalysezwecken aber auch gepoolt werden (17). Bei Prüfchemikalien mit geringer Zytotoxizität oder ohne zytotoxische Wirkung sind in der Regel Konzentrationsintervalle mit zwei- bis dreifacher Konzentration geeignet. Wenn zytotoxische Wirkungen auftreten, sollten die Prüfkonzentrationen einen Bereich ausgehend vom Wert, bei dem die Zytotoxizität deutlich wird, bis zu Konzentrationen mit mäßiger oder geringer oder nicht vorhandener Toxizität umfassen. Viele Prüfchemikalien zeigen steile Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Um Daten zu mäßiger oder geringer Toxizität zu erhalten oder um die Dosis-Wirkungs-Beziehungen im Einzelnen auszuwerten, kann es daher erforderlich sein, Konzentrationen mit kleineren Abständen und/oder mehr als vier Konzentrationen zu verwenden, insbesondere in Fällen, in denen ein Wiederholungsversuch erforderlich ist (Nummer 43). Die Verwendung von mehr als 4 Konzentrationen kann besonders bei Verwendung von Einfachkulturen wichtig sein.

20. Wenn die Höchstkonzentration auf der Zytotoxizität beruht, sollte bei der Höchstkonzentration eine relative Überlebensrate von 10-20 % erreicht werden. Besondere Sorgfalt ist dann geboten, wenn positive Ergebnisse nur bei relativen Überlebensraten von höchstens 10 % zu verzeichnen sind (Nummer 43).

21. Im Falle schwer löslicher Chemikalien, die bei Konzentrationen unterhalb der niedrigsten unlöslichen Konzentration nicht zytotoxisch sind, sollte die höchste analysierte Konzentration am Ende der Behandlung mit der Prüfchemikalie eine Trübung oder eine mit bloßem Auge oder mithilfe eines Inversmikroskops erkennbare Ausfällung bewirken. Auch wenn die Zytotoxizität oberhalb der niedrigsten unlöslichen Konzentration auftritt, ist es ratsam, nur eine Konzentration zu testen, bei der es zu einer Trübung oder sichtbaren Ausfällung kommt, da künstliche Wirkungen eine Folge dieser Ausfällung sein könnten. Bei der Konzentration, bei der es zu einer Ausfällung kommt, ist unbedingt sicherzustellen, dass die Ausfällung nicht die Durchführung des Versuchs beeinträchtigt. Es ist möglicherweise sinnvoll, die Löslichkeit im Kulturmedium vor dem Versuch zu bestimmen.

22. Wird keine Ausfällung bzw. keine grenzwertige Zytotoxizität beobachtet, sollte die höchste Versuchskonzentration 10 mM, 2 mg/ml oder 2 µl/ml entsprechen, je nachdem, welcher Wert der niedrigere ist (39) (40). Sofern die Zusammensetzung der Prüfchemikalie nicht genau definiert ist, z. B. ein Stoff mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien (UVCB) (41), Umweltextrakte usw., muss die höchste Konzentration möglicherweise höher angesetzt werden (z. B. bei 5 mg/ml), sofern keine ausreichende Zytotoxizität vorhanden ist, um die Konzentration der einzelnen Bestandteile zu erhöhen. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass diese Anforderungen sich von denen für Humanpharmazeutika unterscheiden können (42).

Kontrollen

23. Bei allen Versuchsbedingungen sind jeweils gleichzeitige Negativkontrollen (Nummer 16) anzulegen, bei denen das Behandlungsmedium lediglich Lösungsmittel enthält, die ansonsten aber auf die gleiche Weise behandelt wurden wie die Behandlungskulturen.

24. Gleichzeitige Positivkontrollen müssen angelegt werden, um die Eignung des Labors zum Nachweis von Mutagenen unter den Bedingungen des verwendeten Prüfprotokolls sowie ggf. die Wirksamkeit des exogenen Metabolisierungssystems nachzuweisen. Beispiele für Positivkontrollen sind der folgenden Tabelle 1 zu entnehmen. Es können andere geeignete Positivkontrollstoffe verwendet werden, sofern dies begründet ist. Da *In-vitro*-Prüfungen an Säugetierzellen auf genetische Toxizität hinreichend standardisiert sind, können Prüfungen anhand von Behandlungen mit und ohne exogene Stoffwechselaktivierung mit einer einzelnen Positivkontrolle durchgeführt werden, bei der eine Stoffwechselaktivierung erforderlich ist. In diesem Fall wird durch die Reaktion einer einzelnen Positivkontrolle sowohl die Aktivität des Stoffwechselaktivierungssystems als auch die Reaktionsfähigkeit des Prüfsystems nachgewiesen. Jede Positivkontrolle sollte bei einer oder mehreren Konzentrationen durchgeführt werden, die voraussichtlich eine reproduzierbare und erkennbare Zunahme gegenüber dem Hintergrund ergeben, womit sich die Empfindlichkeit des Versuchssystems nachweisen lässt, und die Wirkung sollte nicht durch einen Zytotoxizitätswert beeinträchtigt werden, der die in dieser Prüfmethode vorgegebenen Grenzen überschreitet (Nummer 20).

Tabelle 1

Zur Beurteilung der Eignung des Labors und zur Wahl der Positivkontrollen empfohlene Referenzstoffe

Stoffwechselaktivierungsstatus	Lage	Stoff und CAS-Nr.
Ohne exogene Stoffwechselaktivierung	*Hprt*	Ethylmethansulfonat [CAS-Nr. 62-50-0] Ethylnitrosoharnstoff (ENU) [CAS-Nr. 759-73-9] 4-Nitroquinolin-1-Oxid (CAS-Nr. 56-57-5)
	xprt	Streptonigrin [CAS-Nr. 3930-19-6] Mitomycin C [CAS-Nr. 50-07-7]
Mit exogener Stoffwechselaktivierung	*Hprt*	3-Methylcholanthren [CAS-Nr. 56-49-5] 7,12-Dimethylbenzanthracen [CAS-Nr. 57-97-6] Benzo[a]pyren (CAS-Nr. 50-32-8)
	xprt	Benzo[a]pyren (CAS-Nr. 50-32-8)

VERFAHREN

Behandlung mit der Prüfchemikalie

25. Proliferierende Zellen werden mit und ohne Stoffwechselaktivierungssystem mit der Prüfchemikalie behandelt. Die Exposition sollte über einen geeigneten Zeitraum (gewöhnlich 3 bis 6 Stunden) erfolgen.

26. Die Mindestzahl der für jede Prüfung und im jeweiligen Stadium der Prüfung verwendeten Zellen (Kontrolle und behandelte Kultur) sollte auf der Spontanmutationshäufigkeit beruhen. Als Faustregel ist anzunehmen, dass die Anzahl an behandelten Zellen und an Passagen so groß sein muss, dass in jeder einzelnen Kultur und in allen Phasen der Prüfung ständig 10 Spontanmutationen zu verzeichnen sind (17). Die Spontanmutationshäufigkeit liegt in der Regel zwischen 5 und 20×10^{-6}. Um eine hinreichende Anzahl an Spontanmutationen (mindestens 10) bei einer Spontanmutationshäufigkeit von 5×10^{-6} zu erhalten, müssten selbst bei Kulturen, die mit Konzentrationen behandelt wurden, bei denen sich eine Zytotoxizität von 90 % (relative Überlebensrate 10 %) ergibt, mindestens 20×10^{6} Zellen behandelt werden. Außerdem muss während der Expressionszeit eine hinreichende Anzahl an Zellen (mindestens 2 Millionen) kultiviert und zur Mutantenselektion plattiert werden (17).

Expressionszeit des Phänotyps und Messung der Mutationshäufigkeit

27. Nach der Dauer der Behandlung werden die Zellen kultiviert, um die Expression des Mutantenphänotyps zu ermöglichen. Im Allgemeinen sind mindestens 7-9 Tage hinreichend für eine annähernd optimale phänotypische Expression neu induzierter Hprt- und xprt-Mutanten (43) (44). In diesem Zeitraum werden Zellen regelmäßig subkultiviert, um ein exponentielles Wachstum aufrechtzuerhalten. Nach der phänotypischen Expression werden die Zellen im Medium mit und ohne selektierendes Agens (6-Tioguanin) nochmals plattiert, um die Anzahl der Mutanten bzw. die Klonierungseffizienz zum Zeitpunkt der Selektierung zu bestimmen. Diese Plattierung kann mit Schalen für Monoschichtkulturen oder mit Mikrotiterplatten für Zellen in Suspensionskultur vorgenommen werden. Für die Mutantenselektion sollten die Zellen mit einer Dichte plattiert werden, bei der eine optimale Wiederfindung der Mutanten gewährleistet ist (d. h. eine metabolische Kooperation vermieden wird) (17). Die Platten werden über einen angemessenen Zeitraum für ein optimales Koloniewachstum (z. B. 7-12 Tage) inkubiert. Anschließend werden die Kolonien gezählt. Die Mutantenhäufigkeit wird anhand der Anzahl der Mutantenkolonien bereinigt um die Klonierungseffizienz bei der Mutantenselektion berechnet (Formeln siehe Anlage 2).

Kompetenz des Labors

28. Um ausreichende Erfahrungen mit der Prüfung zu sammeln, bevor routinemäßige Prüfungen erfolgen, sollte das Labor eine Reihe von Versuchen mit positiven Referenzstoffen durchgeführt haben, die sich unterschiedlicher Mechanismen (mindestens ein aktiver Mechanismus mit und ein aktiver Mechanismus ohne Stoffwechselaktivierung, ausgewählt aus den in Tabelle 1 aufgeführten Stoffen) und verschiedener Negativkontrollen (unter Verwendung verschiedener Lösungsmittel/Vehikel) bedienen. Die Reaktionen dieser Positiv- und Negativkontrollen sollten mit der Literatur im Einklang stehen. Dies gilt nicht für erfahrene Labors, d. h. für Labors, die über eine Datenbank mit historischen Daten gemäß der Definition unter den Nummern 30 bis 33 verfügen.

29. Unabhängig davon, ob eine Stoffwechselaktivierung gegeben ist, sollte eine Auswahl von Positivkontrollstoffen (siehe Tabelle 1 in Nummer 25) untersucht werden, um die Fähigkeit zur Erkennung mutagener Chemikalien nachzuweisen und die Wirksamkeit des Stoffwechselaktivierungssystems zu ermitteln und zum einen die Eignung der Bedingungen für das Zellwachstum während der Behandlung sowie für die phänotypische Expression und für die Mutantenselektion und zum anderen die Eignung der Auswertungsverfahren zu belegen. Zum Nachweis der Empfindlichkeit und dynamischen Bandbreite des Versuchssystems sollte eine Spanne der Konzentrationen der ausgewählten Stoffe festgelegt werden, um reproduzierbare und konzentrationsbezogene Zunahmen gegenüber dem Hintergrund zu erhalten.

Historische Kontrolldaten

30. Das Labor sollte Folgendes bestimmen:

— Bereich und Verteilung historischer Positivkontrollen und

— Bereich und Verteilung historischer Negativkontrollen (unbehandelt, Lösungsmittel).

31. Beim erstmaligen Erwerb von Daten zur Verteilung einer historischen Negativkontrolle sollten gleichzeitige Negativkontrollen veröffentlichten Kontrolldaten entsprechen (22). Werden weitere Versuchsdaten zur Verteilung der Kontrollen hinzugefügt, sollten gleichzeitige Negativkontrollen idealerweise innerhalb von 95 % der Kontrollgrenzen der gewählten Verteilung liegen (17) (45) (46).

32. Die Datenbank des Labors zu historischen Negativkontrollen sollte zunächst mit mindestens 10 Versuchen angelegt werden. Vorzugsweise sollte sie jedoch aus mindestens 20 Versuchen bestehen, die unter vergleichbaren Versuchsbedingungen durchgeführt wurden. Labors sollten Qualitätskontrollverfahren anwenden, wie z. B. Qualitätsregelkarten (z. B. C-Karten oder X-Bar-Karten (47)), um zu ermitteln, wie variabel ihre Positiv- und Negativkontrolldaten sind, und um nachzuweisen, dass die Methodik in ihrem Labor kontrolliert wird (46). Weitere Empfehlungen zum Aufbau und zur Verwendung von Sammlungen historischer Daten (d. h. Kriterien für die Aufnahme und den Ausschluss von Daten in bzw. aus historischen Datensätzen und die Akzeptanzkriterien für einen bestimmten Versuch) sind den Literaturangaben zu entnehmen (45).

33. Negativkontrolldaten sollten die Mutantenhäufigkeit aus einer Einzelkultur oder vorzugsweise aus Replikatkulturen erfassen, wie in Nummer 23 beschrieben. Gleichzeitige Negativkontrollen sollten idealerweise innerhalb der Kontrollgrenzen von 95 % der gewählten Verteilung in der Datenbank des Labors zu historischen Negativkontrollen liegen (17) (45) (46). Sofern gleichzeitige Negativkontrolldaten außerhalb der Kontrollgrenzen von 95 % liegen, ist es zulässig, sie in die historische Kontrollverteilung aufzunehmen, solange es sich bei den Daten nicht um „extreme Ausreißer“ handelt und nachgewiesen werden kann, dass das Prüfsystem kontrolliert wird (siehe oben) und nachweislich kein technisches oder menschliches Versagen vorliegt.

34. Sämtliche Änderungen am Versuchsprotokoll sind auf ihre Übereinstimmung mit den bereits vorhandenen Datenbanken historischer Kontrolldaten des Labors zu prüfen. Bei größeren Inkonsistenzen sollte eine neue Datenbank historischer Kontrolldaten erstellt werden.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Darstellung der Prüfergebnisse

35. Die Darstellung der Prüfergebnisse sollte sämtliche für die Berechnung der Zytotoxizität (ausgedrückt als relative Überlebensrate) erforderlichen Daten beinhalten. Die Daten für behandelte Kulturen und für Kontrollkulturen sollten die Anzahl der Zellen am Ende der Behandlung, die Anzahl der unmittelbar nach der Behandlung plattierten Zellen und die Koloniezahlen (bzw. bei der Mikrotitermethode die Anzahl der Vertiefungen ohne Kolonien) beinhalten. Die relative Überlebensrate der Kulturen sollten jeweils als Prozentanteil der gleichzeitigen Lösungsmittelkontrolle ausgedrückt werden (Begriffsbestimmungen siehe Anlage 1).

36. Die Darstellung der Prüfergebnisse sollte zudem sämtliche für die Berechnung der Mutantenhäufigkeit erforderlichen Daten beinhalten. Die Daten für behandelte Kulturen und Kontrollkulturen sollten Folgendes umfassen: (1) die Anzahl der mit und ohne selektierendes Agens plattierten Zellen (zum Zeitpunkt der Plattierung der Zellen zur Mutantenselektion) und (2) die ermittelte Koloniezahl (bzw. bei der Mikrotitermethode die Anzahl der Vertiefungen ohne Kolonien) auf den Platten mit und ohne selektierendes Agens. Die Mutantenhäufigkeit wird anhand der Anzahl der Mutantenkolonien (auf den Platten mit dem selektierenden Agens) bereinigt um die Klonierungseffizienz (auf den Platten ohne selektierendes Agens) berechnet. Die Mutantenhäufigkeit sollte als Anzahl der Mutantenzellen pro Million lebensfähiger Zellen ausgedrückt werden (Begriffsbestimmungen siehe Anlage 1).

37. Die Daten der einzelnen Kulturen sind zu dokumentieren. Zusätzlich sollten alle Daten in tabellarischer Form zusammengefasst werden.

Akzeptanzkriterien

38. Die Akzeptanz eines Versuchs beruht auf folgenden Kriterien:

— Die Daten der gleichzeitigen Negativkontrolle gelten als zulässig für die Aufnahme in die Datenbank des Labors mit historischen Negativkontrolldaten (Nummer 33).

— Gleichzeitige Positivkontrollen (Nummer 24) sollten Reaktionen hervorrufen, die mit den Reaktionen kompatibel sind, die in der Datenbank für historische Positivkontrollen erzeugt werden, und, verglichen mit den gleichzeitigen Negativkontrollen, eine statistisch signifikante Zunahme aufweisen.

— Zwei Versuchsbedingungen (d. h. mit und ohne Stoffwechselaktivierung) wurden geprüft, wenn nicht bei einem Versuch positive Ergebnisse ermittelt wurden (Nummer 25).

— Eine angemessene Zahl an Zellen und Konzentrationen ist analysierbar (Nummern 25, 26 und 19).

— Die Kriterien für die Auswahl der höchsten Konzentration entsprechen den Kriterien unter den Nummern 20, 21 und 22.

Beurteilung und Auswertung

39. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig positiv, wenn bei einer der getesteten Versuchsbedingungen

— mindestens eine der Versuchskonzentrationen, verglichen mit der gleichzeitigen Negativkontrolle, eine statistisch signifikante Zunahme aufweist,

— ein geeigneter Trendtest zeigt, dass die Zunahme konzentrationsabhängig ist,

— Ergebnisse außerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten liegen (z. B. Kontrollgrenze von 95 % beruhend auf einer Poisson-Verteilung, siehe Nummer 33).

Sind all diese Kriterien erfüllt, wird davon ausgegangen, dass die Prüfchemikalie in diesem Versuchssystem Genmutationen in Säugerzellkulturen auslösen kann. Für Empfehlungen zu den am besten geeigneten statistischen Methoden siehe Literaturhinweise (46) (48).

40. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig negativ, wenn unter allen untersuchten Versuchsbedingungen

— keine der Versuchskonzentrationen eine statistisch signifikante Zunahme gegenüber der gleichzeitigen Negativkontrolle aufweist,

— die Bewertung anhand einer geeigneten Trendprüfung keine konzentrationsabhängige Zunahme ergibt, alle Ergebnisse innerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten liegen (z. B. Kontrollgrenze von 95 % beruhend auf einer Poisson-Verteilung, siehe Nummer 33).

Es wird dann davon ausgegangen, dass die Prüfchemikalie keine Genmutationen in Säugerzellkulturen in diesem Versuchssystem auslösen kann.

41. Bei einer eindeutig positiven oder negativen Reaktion ist eine Verifizierung nicht erforderlich.

42. In den Fällen, in denen die Reaktion, wie oben beschrieben, weder eindeutig negativ noch eindeutig positiv ist, oder um die biologische Relevanz eines Ergebnisses zu untermauern, sollten die Daten durch eine fachkundige Beurteilung und/oder anhand weiterer Untersuchungen bewertet werden. Die Durchführung eines Wiederholungsversuchs, möglicherweise unter veränderten Versuchsbedingungen (z. B. Abstände der Konzentrationen, andere Metabolisierungsbedingungen (d. h. Konzentration (S9) oder Herkunft (S9)), könnten hilfreich sein.

43. In seltenen Fällen erlaubt der Datensatz selbst nach weiteren Untersuchungen keine definitive Aussage zu positiven oder negativen Ergebnissen. Daher sollte die Reaktion der Prüfchemikalie als nicht eindeutig eingestuft werden (d. h. für ein positives und für ein negatives Ergebnis besteht die gleiche Wahrscheinlichkeit).

Prüfbericht

44. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalie:

— Herkunft, Chargennummer, ggf. begrenztes Verwendungsdatum;

— Stabilität der Prüfchemikalie, falls bekannt;

— Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie im Lösungsmittel, falls bekannt;

— Messung des pH-Werts, Osmolalität und ggf. Niederschlag im Kulturmedium, dem die Prüfchemikalie zugegeben wurde.

Einkomponentiger Stoff:

— physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;

— chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:

— so weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

Lösungsmittel:

— Begründung der Auswahl des Lösungsmittels;

— Anteil des Lösungsmittels im endgültigen Kulturmedium.

Zellen:

Bei Labor-Masterkulturen:

— Art, Herkunft der Zelllinien;

— Passagenanzahl (wenn verfügbar) und Laborgeschichte;

— Karyotypmerkmale und/oder Modalzahl der Chromosomen;

— zum Erhalt der Zellkultur verwendete Verfahren;

— Nichtvorhandensein von Mycoplasma;

— Verdopplungszeit der Zellen.

Prüfbedingungen:

— Begründung der Wahl der Konzentrationen und der Anzahl der Kulturen, darunter z. B. Angaben zur Zytotoxizität und Löslichkeitsgrenze;

— Medienzusammensetzung, CO_2-Konzentration, Feuchtigkeit;

— Konzentration der Prüfchemikalie, ausgedrückt als Endkonzentration im Kulturmedium (z. B. µg oder mg/ml oder mM des Kulturmediums);

— Konzentration (und/oder Volumen) des Lösungsmittels und der beigegebenen Prüfchemikalie im Kulturmedium;

— Inkubationstemperatur;

— Inkubationszeit;

— Behandlungsdauer;

— Zelldichte während der Behandlung;

— Art und Zusammensetzung des Stoffwechselaktivierungssystems (Herkunft von S9, Zubereitungsmethode des S9-Gemisches, Konzentration oder Volumen des S9-Gemisches und S9 im Endmedium, Qualitätskontrollen von S9);

— Positiv- und Negativkontrollstoffe, Endkonzentrationen für die jeweiligen Behandlungsbedingungen;

— Dauer der Expressionszeit (ggf. einschließlich Anzahl der überimpften Zellen, Subkulturen und Medienwechsel);

— Bezeichnung und Konzentration des selektierenden Agens;

— Akzeptanzkriterien der Prüfungen;

— Methoden zur Zählung der lebensfähigen und mutierten Zellen;

— Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität;

— evtl. zusätzliche Angaben zur Zytotoxizität und zum verwendeten Verfahren;

— Inkubationszeiten nach dem Plattieren;

— Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig;

— Methoden zur Bestimmung von pH-Wert, Osmolalität und Ausfällung.

Ergebnisse:

— Anzahl der behandelten Zellen und Anzahl der subkultivierten Zellen der einzelnen Kulturen;

— Bestimmung der Zytotoxizität und ggf. sonstige Beobachtungen;

— Ausfällungszeichen und Bestimmungszeit;

— Anzahl der plattierten Zellen im selektiven und im nicht selektiven Medium;

— Anzahl der Kolonien im nicht selektiven Medium und Anzahl der resistenten Kolonien im selektiven Medium sowie entsprechende Mutantenhäufigkeiten;

— nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;

— Daten zu gleichzeitigen Negativ-(Lösungsmittel-)Kontrollen und Positivkontrollen (Konzentrationen und Lösungsmittel);

— Daten zu historischen Negativ-(Lösungsmittel-)Kontrollen und Positivkontrollen mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen und Konfidenzintervall (z. B. 95 %) sowie Anzahl der Datensätze;

— statistische Analysen (für einzelne Kulturen und (ggf.) für gepoolte Replikatkulturen) sowie ggf. p-Werte.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlussfolgerung

LITERATUR

(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. und Tindall, K.R. (Hrsg.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.

(3) Chu, E.H.Y. und 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. und 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. und Stankowski, L.F. Jr. (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. und 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. und 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. und 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. und 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. und Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (Oryzias latipes). Arch. Mol. Mutation Res., 49, 439-452.

(12) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. und 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. und 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. und 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. und 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. und 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. und Asquith, J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Hrsg.), CambridgeUniversity Press, S. 66-101.

(18) Hsie, A.W., Casciano, D.A., Couch, D.B., Krahn, D.F., O'Neill, J.P. und 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, L.F. Jr., Machanoff, R. und Hsie, A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2*gpt*-Transformed Cells, Mol. Cell. Biol., 4, 1411-1415.

(21) Hsie, A. W., Recio, L., Katz, D. S., Lee, C. Q., Wagner, M. und 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. (Manuskript in Vorbereitung).

(23) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, O.W., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. und 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. und Stich, H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299-305.

(25) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. und 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. und 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. und 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. und 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. und 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. und Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. und Philpot, R.M. (Hrsg.), Elsevier, North-Holland, S. 85-88.

(31) Ong, T.-M., Mukhtar, M., Wolf, C.R. und 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. und 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). Stockholmer Übereinkommen über persistente organische Schadstoffe, Umweltprogramm der Vereinten Nationen (UNEP). Abrufbar unter: [http://www.pops.int.html].

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

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

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

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

(38) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. und 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. Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (Oryzias latipes). Arch. Mutagen., 5, 795-801.

(39) OECD (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). Auf Anfrage erhältlich von der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung.

(40) Brookmire, L., Chen, J.J. und 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. Abrufbar unter:[https://federalregister.gov/a/2012-13774].

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

(44) Chiewchanwit, T., Ma, H., El Zein, R., Hallberg, L. und 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. und 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

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

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

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Basenpaaraustauschmutagene: Chemikalien, die den Austausch von Basenpaaren in der DNA verursachen.

Chemikalie: Ein Stoff oder ein Gemisch.

Expressionszeit des Phänotyps: Die Zeit nach der Behandlung, in der sich die genetische Alteration im Genom ausprägt und bereits vorhandene Genprodukte so weit abgebaut werden, dass die phänotypischen Eigenschaften verändert werden.

Genotoxisch: Ein allgemeiner Begriff, der alle Typen von DNA- oder Chromosomenschädigungen umfasst, einschließlich DNA-Brüchen, Addukt-Neubildungen, Mutationen, Chromosomenaberrationen sowie Aneuploidie. Nicht alle genotoxischen Effekte führen zu Mutationen oder stabilen Chromosomenschäden.

HAT-Medium: Medium, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält und verwendet wird, um Kulturen von Hprt-Mutanten zu reinigen.

Klonierungseffizienz: Der Prozentanteil der mit einer niedrigen Dichte plattierten Zellen, die sich zu einer zählbaren Kolonie entwickeln können.

Konzentrationen: Endkonzentrationen der Prüfchemikalie im Kulturmedium

Lösungsmittelkontrolle: Allgemeiner Begriff zur Bezeichnung der Kontrollkulturen, die nur mit dem Lösungsmittel behandelt werden, das verwendet wird, um die Prüfchemikalie zu lösen.

Mitotische Rekombination: Während der Mitose Rekombination homologer Chromatiden, die zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen oder einem Verlust der Heterozygotie führen kann.

MPA-Medium: Medium, das Xanthin, Adenin, Thymidin, Aminopterin und Mycophenolsäure enthält und verwendet wird, um Kulturen von Xprt-Mutanten zu reinigen.

Mutagen: Auslöser einer Erbgutveränderung der DNA-Basenpaarsequenz(en) in Genen oder in der Chromosomenstruktur (Chromosomenaberrationen).

Mutationshäufigkeit: Anzahl der ermittelten Mutantenkolonien geteilt durch die Anzahl der im selektierenden Medium plattierten Zellen, bereinigt um die Klonierungseffizienz (oder die Lebensfähigkeit) zum Zeitpunkt der Selektierung.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

Rasterschubmutagene: Chemikalien, die die Addition oder Deletion eines oder mehrerer Basenpaare im DNA-Molekül verursachen.

Relative Überlebensrate: Die relative Überlebensrate ist ein Maß der behandlungsbedingten Zytotoxizität. Sie ist identisch mit Klonierungseffizienz von Zellen, die nach der Behandlung umgehend plattiert werden; dabei ist eine Bereinigung um Zellverluste während der Behandlung im Vergleich zur Klonierungseffizienz bei Negativkontrollen (mit einer Überlebensrate von 100 %) vorzunehmen.

S9-Gemisch: Gemisch aus der S9-Leberfraktion und für die metabolische Enzymaktivität notwendigen Ko-Faktoren.

S9-Leberfraktionen: Überstand des Leberhomogenats nach Zentrifugieren bei 9 000 g, d. h. Rohleberextrakt.

Unbehandelte Kontrolle: Kulturen, die nicht behandelt werden (d. h. weder mit der Prüfchemikalie noch mit Lösungsmittel), jedoch gleichzeitig in gleicher Weise aufgearbeitet werden wie die Kulturen, die mit der Prüfchemikalie behandelt werden.

UVCB: Chemische Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Vorwärtsmutation: Genmutation vom Elterntyp zur mutierten Form, die eine Veränderung oder den Ausfall der Enzymaktivität oder der Funktion des kodierten Proteins bewirkt.

Zytotoxizität: Bei den Versuchen im Zusammenhang mit dieser Prüfmethode wird Zytotoxizität definiert als eine Reduzierung der relativen Überlebensrate der behandelten Zellen gegenüber der Negativkontrolle (siehe einschlägige Nummer).

Anlage 2

FORMELN ZUR BEWERTUNG DER ZYTOTOXIZITÄT UND DER MUTANTENHÄUFIGKEIT

Die Zytotoxizität wird anhand der relativen Überlebensrate ermittelt, d. h. anhand der Klonierungseffizienz (CE) von Zellen, die nach der Behandlung umgehend plattiert werden; dabei ist eine Bereinigung um Zellverluste während der Behandlung im Vergleich zur bereinigten Klonierungseffizienz bei Negativkontrollen (mit einer Überlebensrate von 100 %) vorzunehmen (siehe folgende Formel zur Berechnung der relativen Überlebensrate).

Die bereinigte CE einer mit einer Prüfmethode behandelten Kultur wird wie folgt berechnet:

$$\text{Bereinigte CE} = \frac{\text{Anzahl der Zellen am Ende der Behandlung}}{\text{Anzahl der Zellen bei Beginn der Behandlung}}$$

Die relative Überlebensrate (RS) einer mit einer Prüfmethode behandelten Kultur wird wie folgt berechnet:

$$\text{RS} = \frac{\text{Bereinigte CE der behandelten Kultur}}{\text{Bereinigte CE der Lösungsmittelkontrolle}} \times 100$$

Als Mutantenhäufigkeit wird die Klonierungseffizienz von Mutantenkolonien im selektierenden Medium geteilt durch die zum Zeitpunkt der Selektierung in einem nicht selektierenden Medium für dieselbe Kultur ermittelte Klonierungseffizienz bezeichnet.

$$\text{Mutantenbäufigkeit} = \frac{\text{Klonierungseffizient von Mutantenkolonien im selektierenden Medium}}{\text{Klonierungseffizienz im nicht selektrierenden Medium}}$$

Verwendung von Platten zur Ermittlung der Klonierungseffizienz:

CE = Anzahl der plattierten Kolonien/Zellen.

Verwendung von Mikrotiterplatten zur Ermittlung der Klonierungseffizienz:

Die Anzahl der Kolonien je Vertiefung auf den Mikrotiterplatten entwickelt sich entsprechend der Poisson-Verteilung.

Klonierungseffizienz = -LnP(0) / Anzahl der pro Vertiefung plattierten Zellen

Wobei -LnP(0) = wahrscheinliche Anzahl leerer überimpfter Vertiefungen; diese Anzahl wird mit der folgenden Formel beschrieben:

LnP(0) = -Ln (Anzahl leerer Vertiefungen / Anzahl plattierter Vertiefungen)“

(3) In Teil B erhält Kapitel B.22 folgende Fassung:

„B.22 **DOMINANT-LETAL-PRÜFUNG AN NAGERN**

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode (PM) entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 478 (2016). Die Prüfmethoden werden regelmäßig überarbeitet, um dem wissenschaftlichen Fortschritt, sich ändernden Rechtsvorgaben und Belangen des Tierschutzes gerecht zu werden. Diese modifizierte Fassung der Prüfmethode beruht auf mehr als 30-jähriger Erfahrung mit dieser Prüfung und trägt der Tatsache Rechnung, dass die Prüfung in andere Toxizitätsprüfungen eingebunden oder mit anderen Toxizitätsprüfungen kombiniert werden kann (z. B. mit Untersuchungen der Entwicklungs-, Reproduktions- und Genotoxizität); aufgrund ihrer Beschränkungen und der Verwendung einer großen Anzahl an Versuchstieren, soll diese Prüfmethode jedoch nicht als primäre Methode, sondern eher als ergänzende Prüfmethode angewendet werden, die nur dann zum Einsatz kommt, wenn aus rechtlichen Gründen keine Alternative besteht. Durch die Kombination von Toxizitätsprüfungen kann die Anzahl der für Toxizitätsprüfungen zu verwendenden Versuchstiere erheblich reduziert werden. Die OECD hat ein Dokument erstellt, das kurz gefasste und hilfreiche Informationen zu Untersuchungen zur genetischen Toxikologie sowie eine Übersicht über die jüngsten Änderungen der OECD-Prüfrichtlinien zur genetischen Toxikologie enthält (1).

2. Mit der Dominant-Letal-Prüfung (DL-Prüfung) soll untersucht werden, ob Chemikalien aufgrund von Chromosomenaberrationen in Keimzellen Mutationen auslösen. Außerdem ist die Dominant-Letal-Prüfung für die Bewertung von Genotoxizität von Bedeutung, da trotz artenspezifischer Unterschiede Faktoren des *In-vivo*-Stoffwechsels, der Pharmakokinetik und von DNA-Reparaturprozessen aktiv sind und zu den Reaktionen beitragen. Die Induktion einer DL-Mutation durch Behandlung mit einer Prüfchemikalie weist darauf hin, dass die Chemikalie das Keimgewebe des Versuchstiers geschädigt hat.

3. DL-Mutationen bewirken den Tod des Embryos bzw. des Fötus. Die Induktion einer DL-Mutation durch Behandlung mit einer Prüfchemikalie weist darauf hin, dass die Chemikalie die Keimzellen des Versuchstiers geschädigt hat.

4. Eine DL-Prüfung ist hilfreich für die Bestätigung positiver Prüfergebnisse mit somatischen *In-vivo*-Endpunkten und stellt einen relevanten Endpunkt für die Abschätzung der Gefahren für den Menschen und des Risikos genetischer Erkrankungen dar, die über die Keimbahn übertragen werden. Dieser Versuch erfordert jedoch eine große Anzahl an Versuchstieren und ist arbeitsintensiv; daher ist die Durchführung dieses Versuchs sehr teuer und zeitaufwändig. Wegen der verhältnismäßig großen spontanen Häufigkeit von DL-Mutationen besteht bei diesem Versuch im Allgemeinen nur eine beschränkte Empfindlichkeit im Hinblick auf die Erkennung geringer Erhöhungen der Mutationshäufigkeit.

5. Die Definitionen der Schlüsselbegriffe sind Anlage 1 zu entnehmen.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

6. Meist wird die Prüfung an Mäusen durchgeführt (2) (3) (4). Andere Arten (beispielsweise Ratten) (5) (6) (7) (8) kommen manchmal möglicherweise ebenfalls in Betracht, wenn dies wissenschaftlich gerechtfertigt ist. Dominante Letalgene sind im Allgemeinen auf starke Chromosomenaberrationen (strukturelle und numerische Anomalien) zurückzuführen (9) (10) (11), Genmutationen können jedoch nicht ausgeschlossen werden. DL-Mutationen sind Mutationen, die per se in einer Keimzelle oder nach der Befruchtung im frühen Embryonalstadium auftreten; sie verursachen keine Funktionsstörung der Gameten, sind aber für das befruchtete Ei oder den sich entwickelnden Embryo tödlich.

7. Einzelne männliche Tiere werden in angemessenen Abständen der Behandlung mit jungfräulichen weiblichen Tieren verpaart. Die Anzahl der Paarungen nach der Behandlung richtet sich nach dem eigentlichen Zweck der DL-Untersuchung (Nummer 23); sie muss ausreichen, um alle Stadien der Reifung männlicher Keimzellen einer Untersuchung auf dominante Letalgene unterziehen zu können (12).

8. Wenn Anzeichen dafür bestehen, dass die Prüfchemikalie oder ein reaktiver Metabolit bzw. reaktive Metaboliten die Hoden nicht erreicht bzw. erreichen, ist diese Prüfung nicht geeignet.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

9. Im Allgemeinen werden die männlichen Tiere über einen geeigneten Expositionsweg mit einer Prüfchemikalie behandelt und dann mit unbehandelten jungfräulichen weiblichen Tieren verpaart. Verschiedene Keimzellarten können durch Verwendung aufeinander folgender Paarungsintervalle geprüft werden. Nach einer angemessenen Zeit nach der Paarung werden die weiblichen Tiere getötet und die Uteri der Tiere einer Untersuchung unterzogen, um die Anzahl der Implantate sowie der lebenden und der toten Embryonen zu ermitteln. Der dominante Letaleffekt einer Prüfchemikalie wird anhand des Vergleichs der lebenden Implantate pro weibliches Tier in der behandelten Gruppe mit der Anzahl lebender Implantate pro weibliches Tier in der Vehikel-/Lösungsmittel-Kontrollgruppe bestimmt. Die Differenz zwischen der Anzahl toter Implantate pro weibliches Tier in der behandelten Gruppe und der Anzahl toter Implantate pro weibliches Tier in der Kontrollgruppe entspricht dem durch die Prüfchemikalie induzierten Postimplantationsverlust. Der Postimplantationsverlust wird durch Ermittlung des Verhältnisses toter Implantate zur Gesamtzahl der Implantate in der behandelten Gruppe im Vergleich zum Verhältnis toter Implantate zur Gesamtzahl der Implantate in der Kontrollgruppe ermittelt. Der Präimplantationsverlust kann anhand des Vergleichs der Anzahl der Corpora lutea abzüglich der Gesamtzahl der Implantate bzw. der Anzahl der Gesamtimplantate pro weibliches Tier in der behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe abgeschätzt werden.

ÜBERPRÜFUNG DER EIGNUNG DES LABORS

10. Die Kompetenz zur Durchführung dieses Versuchs sollte durch den Nachweis der Fähigkeit zur Reproduktion der Häufigkeiten dominanter Letalgene aus veröffentlichten Daten (z. B. (13) (14) (15) (16) (17) (18)) mit Positivkontrollstoffen (einschließlich schwacher Reaktionen) (wie beispielsweise in Tabelle 1 genannt) sowie mit Vehikeln und durch die Ermittlung von Häufigkeiten bei Negativkontrollen in einem annehmbaren Datenbereich (siehe vorstehende Literatur) oder – wenn verfügbar – durch die historische Kontrollverteilung des jeweiligen Labors belegt werden.

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Vorbereitungen

Auswahl von Versuchstierarten

11. Es sollten junge gesunde und geschlechtsreife Tiere üblicher Labortierstämme zum Einsatz kommen. Gewöhnlich werden Mäuse verwendet, doch kommen auch Ratten in Betracht. Außerdem können andere geeignete Säugetierarten verwendet werden, sofern dies im Bericht wissenschaftlich begründet wird.

Haltungs- und Fütterungsbedingungen

12. Bei Nagern sollte die Temperatur im Versuchstierraum 22 °C (± 3 °C) betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit sollte vorzugsweise bei 50 bis 60 % liegen, mindestens aber 40 % betragen und außer bei der Reinigung des Raumes 70 % nicht übersteigen. Der Raum sollte künstlich beleuchtet sein, wobei die Beleuchtung im 12-Stunden-Rhythmus ein- und ausgeschaltet werden sollte. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist. Die Auswahl des Futters wird eventuell dadurch beeinflusst, dass eine geeignete Beimischung einer Prüfchemikalie gewährleistet werden muss, wenn diese über das Futter verabreicht wird. Vor der Behandlung bzw. der Paarung sollten die Nager in kleinen gleichgeschlechtlichen Gruppen (höchstens fünf Tiere) gehalten werden, sofern kein aggressives Verhalten zu erwarten ist oder festgestellt wird, vorzugsweise in Käfigen mit festem Boden und angemessener Ausstattung des Lebensumfelds. Sie können auch einzeln gehalten werden, wenn dies wissenschaftlich gerechtfertigt ist.

Vorbereitung der Versuchstiere

13. Gesunde und geschlechtsreife männliche und weibliche adulte Tiere werden randomisiert und den einzelnen Kontroll- bzw. Behandlungsgruppen zugeteilt. Es erfolgt eine Einzelidentifizierung der Tiere unter Verwendung einer humanen, minimalinvasiven Methode (z. B. durch Anbringen von Ringen, Marken oder Mikrochips oder durch biometrische Identifizierung, nicht jedoch durch Kupieren der Zehen oder Ohren). Die Tiere werden über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt. Die Käfige sind so aufzustellen, dass etwaige standortbedingte Auswirkungen möglichst gering sind. Eine gegenseitige Kontamination durch die Positivkontrolle und die Prüfchemikalie ist zu vermeiden. Zu Beginn des Versuchs sollte die Abweichung des Körpergewichts der Tiere vom Mittelwert so gering wie möglich sein und bei beiden Geschlechtern nicht mehr als ± 20 % betragen.

Vorbereitung der Dosierung

14. Feste Prüfchemikalien sollten vor der Verabreichung an die Tiere in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert oder in das Futter bzw. das Trinkwasser gegeben werden. Flüssige Prüfchemikalien können direkt verabreicht oder zuvor verdünnt werden. Bei Exposition durch Inhalation können die Prüfchemikalien je nach ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften als Gase, Dämpfe oder festes/flüssiges Aerosol verabreicht werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfchemikalie zu verwenden, es sei denn, die Stabilität der Chemikalie bei Lagerung wird nachgewiesen, und die entsprechenden Lagerbedingungen werden definiert.

Prüfbedingungen

Lösungsmittel/Vehikel

15. Das Lösungsmittel/Vehikel sollte in der verwendeten Dosierung keine toxischen Wirkungen hervorrufen und nicht im Verdacht stehen, mit der Prüfchemikalie eine chemische Reaktion einzugehen. Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Referenzdaten zur Kompatibilität beizubringen. Nach Möglichkeit sollte ein wässriges Lösungsmittel/Vehikel verwendet werden. Beispiele für üblicherweise verwendete, kompatible Lösungsmittel/Vehikel sind Wasser, physiologische Kochsalzlösung, Methylcelluloselösung, Carboxymethylcellulose-Natriumsalzlösung, Olivenöl und Maisöl.

Positivkontrollen

16. Grundsätzlich sind parallel Positivkontrolltiere zu verwenden, wenn das Labor nicht seine Befähigung zur Durchführung der Prüfung nachgewiesen und die Prüfung in letzter Zeit (beispielsweise in den letzten 5 Jahren) nicht regelmäßig durchgeführt hat. Allerdings brauchen Positivkontrolltiere nicht auf demselben Expositionsweg wie die mit der Prüfchemikalie behandelten Tiere behandelt und nicht für alle Paarungsintervalle Proben genommen zu werden. Die Positivkontrollstoffe sollten unter den in der Prüfung bestehenden Bedingungen bekanntermaßen dominante Letalgene induzieren. Bis auf die Verabreichung der Prüfchemikalie sind die Tiere der Kontrollgruppen ebenso zu behandeln wie die Tiere der Behandlungsgruppen.

17. Die Dosen der Positivkontrollstoffe sind so auszuwählen, dass sie schwache oder moderate Wirkungen hervorrufen, mit denen die Leistung und Empfindlichkeit des Versuchs kritisch bewertet werden können, gleichzeitig aber konsistent positive dominante Letaleffekte induziert werden. Beispiele für Positivkontrollstoffe und für geeignete Dosierungen sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1

Beispiele für Positivkontrollstoffe

Stoff [CAS-Nr.] (Referenznummer)	Effektiver Dosisbereich (mg/kg) (Nagetierarten)	Verabreichungsdauer (Tage)
Triethylenmelamin [51-18-3] (15)	0,25 (Mäuse)	1
Cyclophosphamid [50-18-0] (19)	50-150 (Mäuse)	5
Cyclophosphamid [50-18-0] (5)	25-100 (Ratten)	1
Ethylmethansulfonat [62-50-0] (13)	100-300 (Mäuse)	5
Monomeres Acrylamid [79-06-1] (17)	50 (Mäuse)	5
Chlorambucil [305-03-3] (14)	25 (Mäuse)	1

Negativkontrollen

18. In jede Probenahme sind Negativkontrolltiere einzubeziehen, die nur ein Lösungsmittel oder ein Vehikel erhalten und ansonsten in derselben Weise behandelt werden wie die Behandlungsgruppen (20). Um die Eignung der Vehikelkontrolle festzustellen, sollten darüber hinaus in jede Probenahme auch unbehandelte Kontrolltiere einbezogen werden, soweit keine historischen oder veröffentlichten Kontrolldaten vorliegen, aus denen hervorgeht, dass das gewählte Lösungsmittel/Vehikel keine dominanten Letalgene und keine sonstigen schädlichen Wirkungen induziert.

VERFAHREN

Anzahl der Versuchstiere

19. Einzelne männliche Tiere werden nacheinander in geeigneten zuvor festgelegten Intervallen (z. B. wöchentlich, Nummern 21 und 23) vorzugsweise mit einem jungfräulichen weiblichen Tier verpaart. Die Anzahl der männlichen Tiere pro Gruppe sollte so gewählt werden, dass sie (in Verbindung mit der Anzahl der verpaarten weiblichen Tiere in den einzelnen Paarungsintervallen) ausreichend ist, um die erforderliche statistische Aussagekraft für den Nachweis mindestens einer Verdopplung der Häufigkeit dominanter Letalgene (Nummer 44) sicherzustellen.

20. Die Anzahl der weiblichen Tiere pro Paarungsintervall sollte anhand von Berechnungen der statistischen Aussagekraft so gewählt werden, dass mindestens eine Verdopplung der Häufigkeit dominanter Letalgene nachgewiesen werden kann (d. h. ausreichend trächtige weibliche Tiere zur Hervorbringung von insgesamt mindestens 400 Implantaten) (20) (21) (22) (23) und dass mindestens ein totes Implantat pro Analyseeinheit (d. h. Paarungsgruppe pro Dosis) zu erwarten ist (24).

Verabreichungsdauer und Paarungsintervalle

21. Die Anzahl der Paarungsintervalle nach der Behandlung richtet sich nach dem Behandlungsplan; sie sollte gewährleisten, dass alle Stadien der Reifung männlicher Keimzellen auf die Induzierung dominanter Letalgene untersucht werden (12) (25). Bei einer Einzelbehandlung unter Verabreichung von bis zu fünf Tagesdosen sollten nach der letzten Behandlung in wöchentlichen Abständen 8 (Mäuse) bzw. 10 (Ratten) Paarungen vorgenommen werden. Bei Mehrfachdosierungen kann die Anzahl der Paarungsintervalle entsprechend dem Anteil der längeren Dauer des Verabreichungszeitraums reduziert werden, sofern alle Phasen der Spermatogenese wie vorgesehen evaluiert werden können (nach einer Expositionsdauer von 28 Tagen beispielsweise sind bei Mäusen bereits 4 wöchentliche Paarungen zur Evaluierung aller Phasen der Spermatogenese ausreichend). Alle Behandlungs- und Paarungspläne sollten wissenschaftlich begründet sein.

22. Weibliche Tiere sollten mindestens für die Dauer eines Östruszyklus (bei Mäusen und Ratten jeweils eine Woche) mit den männlichen Tieren zusammenbleiben. Weibliche Tiere, die sich innerhalb dieser Woche nicht gepaart haben, können für ein späteres Paarungsintervall verwendet werden. Alternativ können die Tiere zusammenbleiben, bis die Paarung erfolgt ist (was durch die Feststellung von Spermien in der Vagina oder das Vorliegen eines Vaginalpropfs nachzuweisen ist).

23. Die Exposition und der Paarungsplan hängen vom eigentlichen Zweck der DL-Untersuchung ab. Wenn das Ziel in der Feststellung besteht, ob eine bestimmte Chemikalie per se DL-Mutationen induziert, besteht die akzeptierte Methode in der Exposition eines vollständigen Spermatogenesezyklus (beispielsweise 7 Wochen bei Mäusen und 5-7 Behandlungen wöchentlich) und einer Paarung am Ende des Zyklus. Besteht das Ziel jedoch in der Ermittlung des Keimzellentyps, in dem dominante Letalgene induziert werden können, ist eine einmalige Exposition (über 5 Tage) mit einer anschließenden Paarungszeit von einer Woche vorzuziehen.

Dosierungen

24. Wenn zunächst eine Dosisfindungsstudie durchgeführt wird, da keine geeigneten Daten zur Dosierungswahl verfügbar sind, sollte diese im gleichen Labor unter Verwendung des/der gleichen Spezies, Rasse, Geschlechts und Behandlungsverfahrens wie im Hauptversuch stattfinden (26). Ziel der Studie sollte sein, die maximal verträgliche Dosis (MTD) zu ermitteln, die definiert ist als die höchste Dosierung, die vertragen wird, ohne dass Anzeichen von Toxizität auftreten, die die Studie, bezogen auf den Untersuchungszeitraum, begrenzen würden (z. B. durch Abweichungen in Verhalten oder Reaktionen, geringen Rückgang des Körpergewichts oder Zytotoxizität des blutbildenden Systems, ausgenommen jedoch Tod oder Anzeichen von Schmerzen und Leiden, die eine humane Tötung erforderlich machen würden (27)).

25. Die maximal verträgliche Dosis (MTD) darf zudem den Paarungserfolg nicht beeinträchtigen (21).

26. Prüfchemikalien mit spezifischen biologischen Aktivitäten bei niedrigen, nicht toxischen Dosen (wie Hormone und Mitogene) und Chemikalien mit gesättigten toxikokinetischen Eigenschaften können als Ausnahmen von den Kriterien zur Dosisfestsetzung angesehen werden und sind auf Fallbasis zu bewerten.

27. Um Dosis-Wirkungs-Informationen zu erhalten, sollte eine vollständige Studie eine Negativkontrollgruppe und mindestens drei Dosierungen enthalten, die sich in der Regel um einen Faktor von 2 (maximal von 4) unterscheiden. Ruft die Prüfchemikalie in einer Dosisfindungsstudie oder nach bereits vorhandenen Daten keine Toxizität hervor, so sollte die Höchstdosis für eine Einzelgabe 2 000 mg/kg Körpergewicht betragen. Wirkt die Prüfchemikalie jedoch toxisch, sollte die MTD die höchste verabreichte Dosierung sein und die Dosierung vorzugsweise einen Bereich vom Höchstwert bis zu einer Dosierung abdecken, die wenig oder keine Toxizität erzeugt. Bei nicht toxischen Chemikalien beträgt die Grenzdosis für einen Verabreichungszeitraum von mindestens 14 Tagen 1 000 mg/kg Körpergewicht/Tag und bei Verabreichungszeiträumen von weniger als 14 Tagen 2 000 mg/kg Körpergewicht/Tag.

Verabreichung der Dosen

28. Bei der Versuchsplanung ist der zu erwartende Expositionsweg beim Menschen zu berücksichtigen. Daher können mit entsprechender Begründung Verabreichungswege wie etwa eine Aufnahme über die Nahrung, über das Trinkwasser, eine subkutane, intravenöse, topische oder orale (über eine Magensonde) Verabreichung oder eine Verabreichung durch Inhalation oder Implantation gewählt werden. In jedem Fall sollte der Verabreichungsweg so gewählt werden, dass das bzw. die Zielgewebe eine angemessene Exposition erfährt bzw. erfahren. Eine intraperitoneale Injektion wird in der Regel nicht empfohlen, da diese nicht als Verabreichungsweg beim Menschen vorgesehen ist, und sollte nur mit spezieller wissenschaftlicher Begründung angewandt werden. Sofern die Prüfchemikalie der Nahrung oder dem Trinkwasser beigemischt wird, ist insbesondere im Fall von Einzeldosierungen darauf zu achten, dass ein ausreichender Abstand zwischen der Nahrungsmittel- und Trinkwasseraufnahme und der Paarung eingehalten wird, damit ein Nachweis der Wirkungen möglich ist (Nummer 31). Welches Flüssigkeitsvolumen jeweils höchstens durch Sonde oder Injektion verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Das Volumen sollte im Normalfall 1 ml/100 g Körpergewicht nicht überschreiten, bei wässrigen Lösungen kommen aber auch 2 ml/100 g in Betracht. Werden größere Volumina verwendet (sofern nach Tierschutzvorschriften erlaubt), ist dies zu begründen. Schwankungen der Prüfvolumina sind durch entsprechende Dosierung so gering wie möglich zu halten, damit bei allen Dosen ein gemessen am Körpergewicht gleich bleibendes Volumen gewährleistet ist.

Beobachtungen

29. Mindestens einmal täglich – vorzugsweise zum gleichen Zeitpunkt und unter Berücksichtigung des Zeitraums, in dem der Wirkungsgipfel nach Verabreichung der Dosis zu erwarten ist – sollten allgemeine klinische Beobachtungen der Versuchstiere vorgenommen und protokolliert werden. Mindestens zweimal täglich während der Verabreichungszeit sind alle Tiere auf Morbidität und Mortalität zu überprüfen. Alle Tiere sollten zu Studienbeginn und mindestens einmal pro Woche während Studien mit Wiederholungsdosen sowie bei humaner Tötung gewogen werden. Die Futteraufnahme wird mindestens wöchentlich gemessen. Wenn die Prüfchemikalie über das Trinkwasser verabreicht wird, sollte auch die Wasseraufnahme bei jedem Wasserwechsel und mindestens einmal wöchentlich gemessen werden. Tiere mit Anzeichen von übermäßiger, jedoch nicht tödlich wirkender Toxizität sollten vor Ende des Prüfzeitraums human getötet werden (27).

Gewebeentnahme und -verarbeitung

30. Weibliche Tiere werden in der zweiten Hälfte der Gravidität am Trächtigkeitstag (GD) 13 bei Mäusen bzw. an GD 14-15 bei Ratten human getötet. Die Uteri werden auf dominante Letaleffekte untersucht, um die Anzahl der Implantate, der lebenden und toten Embryonen und der Corpora lutea zu ermitteln.

31. Die Uterushörner und die Ovarien werden freigelegt, um die Corpora lutea zählen zu können, und die Feten werden entfernt, gezählt und gewogen. Die Uteri sind sorgfältig auf durch lebende Feten verdeckte Resorptionen zu prüfen. Dabei sollte sichergestellt werden, dass alle Resorptionen gezählt werden. Die Fötusmortalität wird dokumentiert. Die Anzahl der erfolgreich befruchteten weiblichen Tiere und die Gesamtzahl der Implantate sowie die Präimplantationsverluste und die Postimplantationsmortalität (einschließlich Früh- und Spätresorptionen) sind ebenfalls zu erfassen. Außerdem können die sichtbaren Feten mindestens 2 Wochen in Bouinscher Lösung fixiert und anschließend auf schwere äußerliche Fehlbildungen untersucht werden (28), um weitere Informationen über die reproduktions- und entwicklungsbezogenen Auswirkungen der Prüfchemikalie zu erhalten.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Auswertung der Ergebnisse

32. Die Daten sind in tabellarischer Form unter Angabe der Anzahl der verpaarten männlichen Tiere, der Anzahl der trächtigen weiblichen Tiere und der Anzahl nicht trächtiger weiblicher Tiere darzustellen. Die Ergebnisse jeder Paarung einschließlich der Identität aller männlichen und weiblichen Tiere sind einzeln anzugeben. Für behandelte männliche Tiere sollten das Paarungsintervall und die Dosierung und für die einzelnen weiblichen Tiere die Anzahl lebender sowie toter Implantate dokumentiert werden.

33. Der Postimplantationsverlust wird durch Ermittlung des Verhältnisses toter Implantate zur Gesamtzahl der Implantate in der behandelten Gruppe im Vergleich zum Verhältnis toter Implantate zur Gesamtzahl der Implantate in der Vehikel-/Lösungsmittelkontrollgruppe ermittelt.

34. Der Präimplantationsverlust wird als Differenz zwischen der Anzahl der Corpora lutea und der Anzahl der Implantate oder als Verringerung der Durchschnittsanzahl der Implantate pro weibliches Tier gegenüber den Kontrollpaarungen berechnet. Wird der Präimplantationsverlust berechnet, ist er anzugeben.

35. Der DL-Faktor wird wie folgt berechnet: (Postimplantationsmortalität/Gesamtzahl der Implantate pro weibliches Tier) × 100.

36. Daten zur Toxizität und klinische Anzeichen (gemäß Nummer 29) sind zu dokumentieren.

Akzeptanzkriterien

37. Die folgenden Kriterien entscheiden über die Gültigkeit eines Versuchs:

— Die gleichzeitige Negativkontrolle wird im Einklang mit veröffentlichten Normen für historische Negativkontrolldaten und mit den historischen Kontrolldaten des Labors (sofern verfügbar) durchgeführt (Nummern 10 und 18).

— Gleichzeitige Positivkontrollen induzieren Reaktionen, die im Einklang mit veröffentlichten Normen für historische Positivkontrolldaten bzw. mit den historischen Kontrolldaten des Labors (sofern verfügbar) stehen und bewirken eine statistisch signifikante Erhöhung im Vergleich zur Negativkontrolle (Nummern 17 und 18).

— Eine angemessene Gesamtzahl an Implantaten und Dosierungen wurde analysiert (Nummer 20).

— Die Kriterien für die Auswahl der Höchstdosis entsprechen den Kriterien unter den Nummern 24 und 27.

Bewertung und Auswertung der Ergebnisse

38. Es sind mindestens drei behandelte Dosisgruppen zu analysieren, um ausreichende Daten für Dosis-Wirkungs-Analysen zu liefern.

39. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig positiv, wenn

— mindestens eine der Versuchsdosierungen eine statistisch signifikante Zunahme gegenüber der gleichzeitigen Negativkontrolle aufweist,

— die Zunahme im Hinblick auf mindestens eine Versuchsbedingung (z. B. ein Paarungsintervall von einer Woche) bei Auswertung mit einer geeigneten Prüfung dosisabhängig ist und

— Ergebnisse außerhalb des akzeptablen Bereichs für Negativkontrolldaten bzw. der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten des Labors (z. B. der auf einer Poisson-Verteilung beruhenden Kontrollgrenze von 95 %) liegen (sofern verfügbar).

Wenn diese Voraussetzungen erfüllt sind, wird angenommen, dass die Prüfchemikalie in Keimzellen der Versuchstiere DL-Mutationen induziert. Empfehlungen zu den am besten geeigneten statistischen Methoden sind Nummer 44 zu entnehmen; weitere statistische Ansätze werden in der Fachliteratur empfohlen (20) (21) (22) (24) (29). Bei durchgeführten statistischen Prüfungen sollte das Tier als Versuchseinheit zugrunde gelegt werden.

40. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig negativ, wenn

— keine der Versuchsdosierungen eine statistisch signifikante Zunahme gegenüber der gleichzeitigen Negativkontrolle hervorruft,

— bei keiner Versuchsbedingung eine dosisabhängige Zunahme festzustellen ist und

— alle Ergebnisse innerhalb eines akzeptablen Bereichs der historischen Negativkontrolldaten des Labors (z. B. der auf einer Poisson-Verteilung beruhenden Kontrollgrenze von 95 %) liegen (sofern verfügbar).

Wenn diese Voraussetzungen erfüllt sind, wird angenommen, dass die Prüfchemikalie nicht geeignet ist, in Keimzellen der Versuchstiere DL-Mutationen zu induzieren.

41. Bei einer eindeutig positiven oder negativen Reaktion ist eine Verifizierung nicht erforderlich.

42. In den Fällen, in denen die Reaktion weder eindeutig negativ noch eindeutig positiv ist, oder um die biologische Relevanz eines Ergebnisses zu untermauern (z. B. eine geringe oder grenzwertige Zunahme), sollten die Daten durch eine fachkundige Beurteilung und/oder anhand weiterer Untersuchungen der vorliegenden abgeschlossenen Versuche bewertet werden (beispielsweise wenn beurteilt werden soll, ob das positive Ergebnis außerhalb des akzeptablen Bereichs von Negativkontrolldaten oder der historischen Negativdaten des betreffenden Labors liegt) (30).

43. In seltenen Fällen erlaubt der Datensatz selbst nach weiteren Untersuchungen keine definitive Aussage zu positiven oder negativen Ergebnissen, so dass die Reaktion als nicht eindeutig eingestuft wird.

44. Bei durchgeführten statistischen Prüfungen sollte das männliche Tier als Versuchseinheit zugrunde gelegt werden. Die Zähldaten (z. B. die Anzahl der Implantate pro weibliches Tier) können auf einer Poisson-Verteilung beruhen, und/oder Anteile (etwa der Anteil toter Implantate) können eine Binomialverteilung ergeben; diese Daten weisen häufig jedoch eine übermäßige Verteilung auf (31). Daher sollte bei der statistischen Analyse zunächst mithilfe von Varianztests wie z. B. des Cochran-Tests zur Ermittlung der binomialen Varianz (32) oder des Tarone-C(α)-Tests zur Ermittlung einer binomialen übermäßigen Verteilung (31) (33) eine Untersuchung auf übermäßige oder zu geringe Verteilung vorgenommen werden. Wenn keine Abweichungen von der Binomialverteilung festgestellt wird, kann mit dem Cochran-Armitage-Trendtest (34) und mit paarweisen Vergleichen mit der Kontrollgruppe mit dem exakten Test nach Fischer (35) eine Untersuchung auf die Entwicklung von Anteilen bei verschiedenen Dosierungen vorgenommen werden. Ähnlich können dann, wenn keine Abweichungen von der Poisson-Verteilung festgestellt werden, Entwicklungen der Zahlen durch Poisson-Regression untersucht (36) und paarweise Vergleiche mit der Kontrollgruppe vor dem Hintergrund des Poisson-Modells mithilfe von Kontrastpaaren vorgenommen werden (36). Wenn eine signifikant übermäßig starke oder geringe Verteilung festgestellt wird, werden parameterfreie Methoden empfohlen. (23) (31). Dazu zählen rangbezogene Prüfungen wie der Jonckheere-Terpstra-Trendtest (37) und Mann-Whitney-Tests (38) für paarweise Vergleiche mit der Vehikel-/Lösungsmittel-Kontrollgruppe sowie Permutations-, Resampling- oder Bootstrap-Trendtests und paarweise Vergleiche mit der Kontrollgruppe (31) (39).

45. Eine DL-Prüfung mit positivem Ergebnis ist ein Nachweis für die Genotoxizität der Prüfchemikalie an den Keimzellen der behandelten männlichen Tiere der Versuchstierart.

46. Indem ermittelt wird, ob die gemessenen Werte innerhalb oder außerhalb des historischen Kontrollbereichs liegen, lassen sich Leitlinien für die Bewertung der biologischen Signifikanz der Reaktion herleiten (40).

Prüfbericht

47. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Zusammenfassung

Prüfchemikalie:

— Herkunft, Chargennummer, ggf. begrenztes Verwendungsdatum;

— Stabilität der Prüfchemikalie, falls bekannt;

— Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie im Lösungsmittel, falls bekannt;

— Messung des pH-Werts, der Osmolalität und ggf. des Niederschlags im Kulturmedium, dem die Prüfchemikalie zugegeben wurde.

Einkomponentiger Stoff:

— physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;

— chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:

— so weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

Zubereitung der Prüfchemikalie:

— Begründung der Auswahl des Vehikels;

— Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie im Lösungsmittel/Vehikel, falls bekannt;

— Zubereitung von Formulierungen für Nahrung, Trinkwasser oder Inhalationspräparaten;

— analytische Bestimmung der Formulierungen (z. B. Stabilität, Homogenität, nominale Konzentrationen), wenn erfolgt.

Versuchstiere:

— Art/Stamm und Begründung der getroffenen Wahl;

— Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;

— Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.;

— Methode zur eindeutigen Identifizierung der Tiere;

— bei Kurzzeitstudien: individuelles Körpergewicht der männlichen Tiere zu Beginn und am Ende der Studie; bei Studien über einer Woche: individuelles Körpergewicht während der Studie und Futteraufnahme. Bereich des Körpergewichts, Mittelwert und Standardabweichung für jede Gruppe.

Prüfbedingungen:

— Daten zu den Positiv- und Negativkontrollen (Vehikel/Lösungsmittel),

— Daten aus der Dosisfindungsstudie,

— Begründung der gewählten Dosisstufen;

— Angaben zur Zubereitung der Prüfchemikalie;

— Angaben zur Verabreichung der Prüfchemikalie;

— Begründung des Verabreichungswegs;

— Methoden zur Toxizitätsmessung beim Tier, einschließlich, soweit verfügbar, histopathologischer oder hämatologischer Analysen, sowie Angaben zur Häufigkeit, mit der die Tiere beobachtet und ihre Körpergewichte gemessen wurden;

— Methoden zur Überprüfung, ob die Prüfchemikalie ins Zielgewebe oder in den allgemeinen Kreislauf gelangt ist, im Falle negativer Ergebnisse;

— tatsächliche Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag), berechnet aus der Konzentration der Prüfchemikalie im Futter/Wasser (ppm) und der Futter- bzw. Wasseraufnahme, falls zutreffend;

— Angaben über Futter- und Wasserqualität;

— Angaben zur Ausgestaltung der Käfigumgebung;

— detaillierte Beschreibung der Behandlungs- und Probenahmepläne und Begründung der jeweils getroffenen Wahl;

— Analgesiemethode;

— Tötungsmethode;

— Verfahren zur Isolierung und Konservierung der Gewebe;

— Herkunft und Chargennummern aller Laborkits und Reagenzien (soweit zutreffend);

— Methoden zur Auszählung von dominanten Letalgenen;

— Paarungsplan;

— Verfahren zur Feststellung, ob die Paarung erfolgt ist;

— Tötungszeitpunkt;

— Kriterien für die Auswertung von DL-Effekten einschließlich Corpora lutea, Implantaten, Resorptionen und Präimplantationsverlusten, lebenden Implantaten und toten Implantaten.

Ergebnisse:

— Zustand des Tiers vor und während des Prüfzeitraums, einschließlich Anzeichen von Toxizität;

— Körpergewicht der männlichen Tiere während der Behandlung und während der Paarungszeit;

— Zahl der verpaarten weiblichen Tiere;

— gegebenenfalls Dosis-Wirkungsverhältnis;

— Daten über Negativkontrolltiere, die gleichzeitig in den Versuch einbezogen waren, und historische Kontrolldaten aus Negativkontrollen mit Angaben zu Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen;

— Daten zu gleichzeitigen Positivkontrollen;

— tabellarische Daten zu den einzelnen Muttertieren, Anzahl der Corpora lutea pro Muttertier, Anzahl der Implantate pro Muttertier, Anzahl der Resorptionen und der Präimplantationsverluste pro Muttertier, Anzahl lebender Implantate pro Muttertier, Anzahl toter Implantate pro Muttertier, Gewicht der Feten;

— die vorstehenden Daten aggregiert für die einzelnen Paarungszeiten und Dosierungen mit Häufigkeiten dominanter Letalgene;

— statistische Analysen und angewandte Methoden.

Diskussion der Ergebnisse:

Schlussfolgerung.

LITERATUR

(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 u. a. (Hrsg.), S. 235-334, Elsevier, Amsterdam

(3) Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Müller, D., Pheh, J., Röhrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M. und Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Erstellt von der Arbeitsgruppe „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,. Pharmacol., 352:159-167.

(5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. und 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., u 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., White, D.M., Blauch, J.L. und Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol*. Lett. Pharmacol., 20:325-329.

(8) Rao, K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. und 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. und 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. und Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. Biol. Reprod., 70:616-624.

(11) Marchetti, F. und 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. und 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. und 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. und Gallo, M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, Mutation Res., 40: 371-378.

(16) James, D.A. und 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. und 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. und Generoso, W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, Mutation Res., 296: 143-156.

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

(20) Adler, I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. und 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. und 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. und Piegorsch, W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. Methods, *Toxicol.*, 3A:124-141.

(23) Haseman, J.K. und 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. und 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. und 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

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

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

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

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

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

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

(34) Margolin, B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. In *Encyclopedia of* Statistical Sciences, Volume 9, Kotz, S. und Johnson, N. L. (Hrsg.), S. 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. und 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.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Chemikalie: Ein Stoff oder ein Gemisch.

Corpus luteum (Corpora lutea): Endokrines System im Ovarium, das jeweils an einem Follikel entsteht, aus dem eine Eizelle freigesetzt wurde. Die Anzahl der Corpora lutea (Gelbkörper) in den Ovarien (Eierstöcken) entspricht der Anzahl der beim Eisprung ausgestoßenen Eizellen.

DL-Mutation: Eine Mutation, die in der Keimzelle bzw. nach der Befruchtung auftritt und zum Tod des Embryos bzw. des Fötus führt.

Fertilitätsrate: Anzahl der verpaarten trächtigen weiblichen Tiere bezogen auf die Gesamtzahl der verpaarten weiblichen Tiere.

Paarungsintervall: Zeitraum zwischen dem Ende der Exposition und der Paarung behandelter männlicher Tiere. Durch die Steuerung dieses Intervalls können chemische Auswirkungen auf verschiedene Keimzellenarten beurteilt werden. In der Paarungszeit der Mäuse in der 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. und 8. Woche nach Ende der Exposition werden die Auswirkungen auf Spermien, kondensierte Spermatiden, runde Spermatiden, pachytene Spermatozyten, frühe Spermatozyten, differenzierte Spermatogonien und Spermatogoniestammzellen gemessen.

Präimplantationsverluste: Differenz zwischen der Anzahl der Implantate und der Anzahl der Corpora lutea. Die Präimplantationsverluste können auch anhand der Gesamtzahl der Implantate pro weibliches Tier in der behandelten Gruppe und in der Kontrollgruppe berechnet werden.

Postimplantationsverlust: Anteil der toten Implantate in der behandelten Gruppe im Vergleich zum Anteil der toten Implantate bezogen auf die Gesamtzahl der Implantate in der Kontrollgruppe.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

UVCB: Chemische Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Anlage 2

ZEITLICHER ABLAUF DER SPERMATOGENESE BEI SÄUGETIEREN

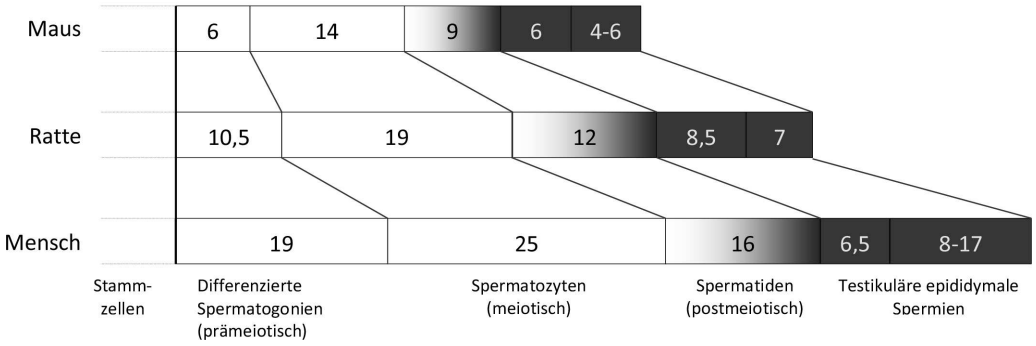


Abb. 1: Übersicht über die Dauer (in Tagen) der Entwicklung männlicher Keimzellen bei Mäusen und Ratten und beim Menschen. In den grau dargestellten Zeiträumen kommt es nicht zu DNA-Reparaturen.

In der vorstehenden Abbildung wird die Spermatogenese bei Mäusen und Ratten sowie beim Menschen schematisch dargestellt (entnommen aus Adler, 1996). Zu den nicht differenzierten Spermatogonien zählen: Spermatogonien der Typen A single, A paired und A aligned (Hess und de Franca, 2008). Der Typ A single wird als echter Stammzellentyp betrachtet; um die Auswirkungen auf Stammzellen zu beurteilen, müssen daher mindestens 49 Tage (bei Mäusen) zwischen der letzten Injektion der Prüfchemikalie und der Paarung vergehen.

LITERATUR

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

Hess, R.A., Moore, B.J. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, C. Yan Cheng (Hrsg.), Landes Biosciences and Springer Science&Business Media:1-15.“

(4) In Teil B erhält Kapitel B.23 folgende Fassung:

„B.23 **SPERMATOGONIEN-PRÜFUNG AUF CHROMOSOMENABERRATIONEN BEI SÄUGETIEREN**

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode (PM) entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 483 (2016). Die Prüfmethoden werden regelmäßig überarbeitet, um dem wissenschaftlichen Fortschritt, sich ändernden Rechtsvorgaben und Belangen des Tierschutzes gerecht zu werden. Diese modifizierte Fassung der Prüfmethode beruht auf langjähriger Erfahrung mit diesem Versuch und trägt der Tatsache Rechnung, dass die Prüfung in andere Toxizitäts- oder Genotoxizitätsuntersuchungen eingebunden oder mit anderen Toxizitäts- oder Genotoxizitätsuntersuchungen kombiniert werden kann. Durch die Kombination von Toxizitätsuntersuchungen kann die Anzahl der Versuchstiere in Toxizitätsprüfungen verringert werden. Diese Prüfmethode ist Bestandteil einer Reihe von Prüfmethoden zur genetischen Toxikologie. Die OECD hat ein Dokument erstellt, das kurz gefasste und hilfreiche Informationen zu Untersuchungen zur genetischen Toxikologie sowie eine Übersicht über die jüngsten Änderungen der OECD-Prüfrichtlinien zur genetischen Toxikologie enthält (1).

2. Die *In-vivo*-Spermatogenienprüfung auf Chromosomenaberrationen bei Säugetieren dient zum Nachweis von Chemikalien, die bei Säugetieren strukturelle Chromosomenaberrationen in den Spermatogonien auslösen (2) (3) (4). Außerdem ist diese Prüfung insbesondere für die Bewertung der Genotoxizität relevant, da trotz artenspezifischer Unterschiede Faktoren des *In-vivo*-Stoffwechsels, der Pharmakokinetik und von DNA-Reparaturprozessen aktiv sind und zu den Reaktionen beitragen. Allerdings ist diese Methode nicht zur Messung numerischer Anomalien bestimmt und wird folglich auch nicht routinemäßig dafür eingesetzt.

3. Mit dieser Prüfung werden strukturelle Chromosomenaberrationen (sowohl Chromosomentyp- als auch Chromatidtypaberrationen) bei der Teilung von Spermatogonien festgestellt, so dass Prognosen zur Auslösung vererbbarer Mutationen in Keimzellen getroffen werden können.

4. Definitionen der Schlüsselbegriffe sind der Anlage zu entnehmen.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

5. Bei dieser Prüfung werden routinemäßig Nager eingesetzt, aber auch andere Arten können in einigen Fällen geeignet sein, sofern dies wissenschaftlich gerechtfertigt wird. Normalerweise entwickeln sich während der Zytogenese von Nagetierhoden mitotische (Spermatogonien) und meiotische (Spermatozyten) Metaphasen. Mitotische und meiotische Metaphasen werden nach der Chromosomenmorphologie bestimmt (4). Mit dieser zytogenetischen *In-vivo*-Prüfung werden strukturelle Chromosomenaberrationen in Mitosen von Spermatogonien ermittelt. Andere Zielzellen sind nicht Gegenstand dieser Prüfmethode.

6. Zum Nachweis von Chromatidentypaberrationen in Spermatogonien ist die erste mitotische Zellteilung nach der Behandlung zu untersuchen, bevor diese Aberrationen sich bei anschließenden Zellteilungen zu Chromosomentypaberrationen entwickeln. Die meiotische Chromosomenanalyse der Spermatozyten in der Diakinese-Metaphase I und der Metaphase II auf Aberrationen der Chromosomenstruktur kann weitere nützliche Informationen liefern.

7. In den Hoden finden sich mehrere Generationen von Spermatogonien (5); diese verschiedenen Keimzellenarten reagieren unterschiedlich empfindlich auf die Behandlung mit Chemikalien. Die festgestellten Aberrationen stellen also eine Gesamtreaktion der behandelten Spermatogoniepopulationen dar. Die meisten mitotischen Zellen in Hodenpräperaten sind B-Spermatogonien mit einem Zellzyklus von 26 h (3).

8. Wenn Anzeichen dafür bestehen, dass die Prüfchemikalie oder ein reaktiver Metabolit bzw. reaktive Metaboliten die Hoden nicht erreicht bzw. erreichen, ist diese Prüfung nicht geeignet.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

9. Im Allgemeinen werden die Tiere über einen geeigneten Expositionsweg mit einer Prüfchemikalie behandelt und zu geeigneten Zeitpunkten nach der Behandlung getötet. Vor der Tötung werden die Tiere mit einem Spindelgift (z. B. Colchicin oder Colcemid®) behandelt. Aus den Keimzellen werden dann Chromosomen präpariert und gefärbt, und die Metaphasezellen werden auf Chromosomenaberrationen untersucht.

ÜBERPRÜFUNG DER EIGNUNG DES LABORS

10. Die Kompetenz zur Durchführung dieses Versuchs sollte durch den Nachweis der Fähigkeit zur Reproduktion der erwarteten Ergebnisse in Bezug auf die Häufigkeit struktureller Chromosomenaberrationen bei Spermatogonien mit Positivkontrollstoffen (einschließlich schwacher Reaktionen) wie in Tabelle 1 genannt und durch Ermittlung von Häufigkeiten bei Negativkontrollen in einem annehmbaren Kontrolldatenbereich (siehe vorstehende Literatur, z. B. (2)(3)(6)(7)(8)(9)(10)) oder – wenn verfügbar – durch die historische Kontrollverteilung des jeweiligen Labors belegt werden.

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Vorbereitungen

Auswahl von Versuchstierarten

11. Es sollten junge gesunde und geschlechtsreife Tiere üblicher Labortierstämme zum Einsatz kommen. Im Allgemeinen werden männliche Mäuse verwendet; allerdings können auch männliche Tiere sonstiger geeigneter Säugetierarten zum Einsatz kommen, wenn dies wissenschaftlich gerechtfertigt ist und diese Prüfung dann in Verbindung mit einer anderen Prüfmethode durchgeführt werden kann. Die wissenschaftliche Begründung für die Verwendung anderer Versuchstiere als Nager sollte in den Bericht aufgenommen werden.

Haltungs- und Fütterungsbedingungen

12. Bei Nagern sollte die Temperatur im Versuchstierraum 22 °C (± 3 °C) betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit sollte vorzugsweise bei 50 bis 60 % liegen, mindestens aber 40 % betragen und außer bei Reinigung des Raumes 70 % nicht übersteigen. Der Raum sollte künstlich beleuchtet sein, wobei die Beleuchtung im 12-Stunden-Rhythmus ein- und ausgeschaltet werden sollte. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist. Die Auswahl des Futters wird eventuell dadurch beeinflusst, dass eine geeignete Beimischung einer Prüfchemikalie gewährleistet werden muss, wenn diese über das Futter verabreicht wird. Nager sollten in kleinen Gruppen (maximal fünf pro Käfig) untergebracht werden, sofern kein aggressives Verhalten zu erwarten ist, vorzugsweise in Käfigen mit festem Boden und angemessener Ausgestaltung des Lebensumfelds. Sie können auch einzeln gehalten werden, wenn dies wissenschaftlich gerechtfertigt ist.

Vorbereitung der Versuchstiere

13. Gewöhnlich werden gesunde, adulte männliche Tiere (zu Beginn der Behandlung 8-12 Wochen alt) nach dem Zufallsprinzip in die Kontroll- bzw. Behandlungsgruppen eingeteilt. Es erfolgt eine Einzelidentifizierung der Tiere unter Verwendung einer humanen, minimalinvasiven Methode (z. B. durch Anbringen von Ringen, Marken oder Mikrochips oder durch biometrische Identifizierung, nicht jedoch durch Kupieren der Ohren oder Zehen). Die Tiere werden über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt. Die Käfige sind so aufzustellen, dass etwaige standortbedingte Auswirkungen möglichst gering sind. Eine gegenseitige Kontamination durch die Positivkontrolle und die Prüfchemikalie ist zu vermeiden. Zu Beginn des Versuchs sollte die Abweichung des Körpergewichts der einzelnen Tiere möglichst gering sein und nicht mehr als ± 20 % betragen.

Vorbereitung der Dosierung

14. Feste Prüfchemikalien sollten vor der Verabreichung an die Tiere in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert oder in das Futter bzw. das Trinkwasser gegeben werden. Flüssige Prüfchemikalien können direkt verabreicht oder zuvor verdünnt werden. Bei Exposition durch Inhalation können die Prüfchemikalien je nach ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften als Gase, Dämpfe oder festes/flüssiges Aerosol verabreicht werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfchemikalie zu verwenden, es sei denn, die Stabilität der Chemikalie bei Lagerung wird nachgewiesen, und die entsprechenden Lagerbedingungen werden definiert.

Prüfbedingungen – Lösungsmittel/Vehikel

15. Das Lösungsmittel/Vehikel sollte bei den gewählten Dosierungen keine toxischen Wirkungen hervorrufen und mit den Prüfchemikalien keine chemische Reaktion eingehen. Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Referenzdaten zur Kompatibilität beizubringen. Nach Möglichkeit sollte ein wässriges Lösungsmittel/Vehikel verwendet werden. Beispiele für üblicherweise verwendete, kompatible Lösungsmittel/Vehikel sind Wasser, physiologische Kochsalzlösung, Methylcelluloselösung, Carboxymethylcellulose-Natriumsalzlösung, Olivenöl und Maisöl. Liegen keine historischen oder veröffentlichten Kontrolldaten vor, aus denen hervorgeht, dass keine strukturellen Chromosomenaberrationen und keine anderen schädlichen Wirkungen von einem gewählten, nicht gängigen Lösungsmittel/Vehikel ausgehen, sollte die Eignung des Lösungsmittels/Vehikels in einem Vorversuch nachgewiesen werden.

Positivkontrollen

16. Grundsätzlich sind parallel Positivkontrolltiere zu verwenden, wenn das Labor nicht seine Befähigung zur Durchführung der Prüfung nachgewiesen und die Prüfung in letzter Zeit (beispielsweise in den letzten 5 Jahren) nicht regelmäßig durchgeführt hat. Umfasst der Versuch keine gleichzeitige Positivkontrolle, sollten Auswertungskontrollen (fixierte und nicht angefärbte Objektträger) einbezogen werden. Dazu eignen sich Referenzproben, die im Rahmen eines gesonderten Positivkontrollversuchs in dem Labor entnommen und gelagert wurden, das den Versuch in regelmäßigen Zeitabständen (z. B. alle 6 bis 18 Monate) durchführt (z. B. bei Eignungsprüfungen und danach ggf. auf regelmäßiger Basis).

17. Positivkontrollstoffe sollten zuverlässig bewirken, dass die Häufigkeiten der Zellen mit Chromosomenaberrationen gemessen an den spontan entstehenden Zellmengen nachweislich zunehmen. Positivkontrolldosen sollten so gewählt werden, dass die Wirkungen eindeutig sind, die Labortechniker die kodierten Proben aber nicht identifizieren können. Beispiele für Positivkontrollstoffe sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1

Beispiele für Positivkontrollstoffe

Stoffe [CAS-Nr.] (Referenznummer)
Cyclophosphamid(monohydrat) [CAS-Nr. 50-18-0 (CAS-Nr. 6055-19-2)] (9)
Cyclohexylamin [CAS-Nr. 108-91-8] (7)
Mitomycin C [CAS-Nr. 50-07-7] (6)
Monomeres Acrylamid [CAS 79-06-1] (10)
Triethylenmelamin [CAS-Nr. 51-18-3] (8)

Negativkontrollen

18. In jede Probenahme sind Negativkontrolltiere einzubeziehen, die nur ein Lösungsmittel oder ein Vehikel erhalten und ansonsten in derselben Weise behandelt wurden wie die Behandlungsgruppen. Um die Eignung der Vehikelkontrolle festzustellen, sollten darüber hinaus in jede Probenahme auch unbehandelte Kontrolltiere einbezogen werden, soweit keine historischen oder veröffentlichten Kontrolldaten vorliegen, aus denen hervorgeht, dass das gewählte Lösungsmittel/Vehikel keine Chromosomenaberrationen und keine sonstigen schädlichen Wirkungen induziert.

VERFAHREN

Anzahl der Versuchstiere

19. Zu Beginn der Studie sollten die Gruppengrößen so bestimmt werden, dass pro Gruppe mindestens 5 männliche Tiere einbezogen werden. Diese Anzahl der Tiere pro Gruppe gilt als ausreichend für eine angemessene statistische Aussagekraft (d. h. für den Nachweis mindestens einer Verdopplung der Häufigkeit einer Chromosomenaberration bei einer Konzentration der Negativkontrolle von mindestens 1,0 % bei einer Wahrscheinlichkeit von 80 % und einer Signifikanz von 0,05) (3) (11). Als typische Höchstmenge an Versuchstieren bei einer Untersuchung mit zwei Probenahmezeitpunkten, drei Dosisgruppen und einer gleichzeitigen Negativkontrollgruppe zuzüglich einer Positivkontrollgruppe (wobei jede Gruppe aus fünf Tieren besteht) kann von maximal 45 Versuchstieren ausgegangen werden.

Behandlungsplan

20. Die Prüfchemikalien werden gewöhnlich einmal verabreicht (d. h. als Einzelbehandlung); wenn wissenschaftlich gerechtfertigt, können auch andere Dosierungspläne verwendet werden.

21. In der Gruppe mit der höchsten Dosis wird zu zwei verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung eine Stichprobe entnommen. Da die für die Aufnahme und Metabolisierung der Prüfchemikalie(n) sowie für die Wirkung auf die Zellzykluskinetik benötigte Zeit den optimalen Zeitpunkt für die Feststellung von Chromosomenaberrationen beeinflussen kann, erfolgen eine frühe Probenahme und eine weitere Probenahme etwa 24 bzw. 48 Stunden nach der Behandlung. Wenn nicht die Höchstdosis verabreicht wird, sollte die erste Probe 24 Stunden nach der Behandlung (d. h. spätestens bei Ablauf des Zellzyklus der B-Spermatogonien zur Maximierung der Wahrscheinlichkeit der Bewertung der ersten Metaphasen nach der Behandlung) entnommen werden, wenn nicht ein anderer Zeitpunkt für die Probenahme als besser geeignet bekannt und gerechtfertigt ist.

22. Für die Probenahme kommen auch andere Zeitpunkte in Frage. Bei Chemikalien, die beispielsweise S-unabhängige Effekte auslösen, ist möglicherweise eine Probenahme zu früheren Zeitpunkten (d. h. nach weniger als 24 h) angebracht.

23. Ein Behandlungsverfahren mit Wiederholungsdosis kann zur Anwendung kommen, beispielsweise in Verbindung mit einer Prüfung mit einem anderen Endpunkt und einem Verabreichungszeitraum von 28 Tagen (z. B. PM B.58); in diesem Fall werden jedoch weitere Tiergruppen benötigt, damit Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommen werden können. Die Eignung eines solchen Verfahrens muss jedoch in jedem Einzelfall wissenschaftlich gerechtfertigt sein.

24. Vor der Tötung wird den Tieren intraperitoneal eine geeignete Dosis eines Spindelgifts (z. B. Colcemid® oder Colchicin) verabreicht. Die Tiere werden dann zu einem geeigneten Zeitpunkt aufgearbeitet. Bei Mäusen und Ratten beträgt die betreffende Zeitspanne 3-5 Stunden.

Dosierungen

25. Wenn zunächst eine Dosisfindungsstudie durchgeführt wird, da noch keine geeigneten Daten aus anderen einschlägigen Studien zur Dosierungswahl vorliegen, sollte diese im selben Labor unter Verwendung von Tieren derselben Art und Rasse sowie nach demselben Behandlungsverfahren stattfinden, die nach den Empfehlungen für die Durchführung von Dosisfindungsstudien in der Hauptstudie durchzuführen sind (12). Ziel der Studie sollte sein, die maximal verträgliche Dosis (MTD) zu ermitteln, die als die Dosis definiert ist, die für die Dauer der Studie leichte toxische Wirkungen (z. B. Abweichungen in Verhalten oder Reaktionen, einen geringen Rückgang des Körpergewichts oder Zytotoxizität des blutbildenden Systems) induziert, jedoch weder zum Tod führt noch Anzeichen von Schmerzen, Leiden oder Ängsten hervorruft, die eine Tötung erforderlich machen würden (13).

26. Die Höchstdosis kann auch als jene Dosis definiert werden, die bestimmte Anzeichen von Toxizität in den Spermatogonien hervorruft (z. B. eine Reduzierung des Verhältnisses der Spermatogonienmitosen zur ersten und zweiten meiotischen Metaphase). Diese Reduzierung sollte nicht mehr als 50 % betragen.

27. Prüfchemikalien mit spezifischen biologischen Aktivitäten bei niedrigen, nicht toxischen Dosen (wie Hormone und Mitogene) und Chemikalien mit gesättigten toxikokinetischen Eigenschaften können als Ausnahmen von den Kriterien zur Dosisfestsetzung angesehen werden und sind auf Fallbasis zu bewerten.

28. Um Dosis-Wirkungs-Informationen zu erhalten, sollte eine vollständige Studie eine Negativkontrollgruppe (Nummer 18) und mindestens drei Dosierungen enthalten, die sich in der Regel um einen Faktor von 2 (maximal von 4) unterscheiden. Ruft die Prüfchemikalie in einer Dosisfindungsstudie oder nach bereits vorhandenen Daten keine Toxizität hervor, so sollte die Höchstdosis für eine Einzelgabe 2 000 mg/kg Körpergewicht betragen. Ruft die Prüfchemikalie jedoch Toxizität hervor, sollte die MTD die höchste verabreichte Dosierung sein und die Dosierung vorzugsweise einen Bereich vom Höchstwert bis zu einer Dosierung abdecken, die wenig oder keine Toxizität erzeugt. Wenn bei allen untersuchten Dosierungen toxische Wirkungen im Zielgewebe (d. h. in den Hoden) beobachtet werden, sind weitere Untersuchungen bei nichttoxischen Dosierungen anzuraten. Studien zur ausführlicheren Charakterisierung der quantitativen Dosis-Wirkungs-Informationen erfordern gegebenenfalls weitere Dosisgruppen. Bei bestimmten Arten von Prüfchemikalien (z. B. Humanpharmazeutika), für die spezielle Anforderungen gelten, können die Grenzen variieren. Wenn die Prüfchemikalie keine toxische Wirkung induziert, sollten die Grenzdosis sowie zwei geringere Dosen (wie oben beschrieben) ausgewählt werden. Die Grenzdosis für einen Verabreichungszeitraum von mindestens 14 Tagen beträgt 1 000 mg/kg Körpergewicht/Tag und bei Verabreichungszeiträumen von weniger als 14 Tagen 2 000 mg/kg Körpergewicht/Tag.

Verabreichung der Dosen

29. Bei der Versuchsplanung ist der zu erwartende Expositionsweg beim Menschen zu berücksichtigen. Daher können mit entsprechender Begründung Verabreichungswege wie etwa eine Aufnahme über die Nahrung, über das Trinkwasser, eine topische, subkutane, intravenöse oder orale (über eine Magensonde) Verabreichung oder eine Verabreichung durch Inhalation oder Implantation gewählt werden. In jedem Fall sollte der Verabreichungsweg so gewählt werden, dass eine angemessene Exposition des Zielgewebes sichergestellt ist. Eine Intraperitonealinjektion wird in der Regel nur in wissenschaftlich gerechtfertigten Fällen empfohlen, weil sie beim Menschen gewöhnlich keinen physiologisch relevanten Expositionsweg darstellt. Sofern die Prüfchemikalie der Nahrung oder dem Trinkwasser beigemischt wird, insbesondere im Fall von Einzeldosierungen, ist darauf zu achten, einen ausreichenden Abstand zwischen der Nahrungsmittel- und Trinkwasseraufnahme und der Probenahme einzuhalten, damit ein Nachweis der Wirkungen möglich ist (Nummer 33). Welches Flüssigkeitsvolumen jeweils höchstens durch Sonde oder Injektion verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Das Volumen sollte im Normalfall 1 ml/100 g Körpergewicht nicht überschreiten, bei wässrigen Lösungen kommen aber auch 2 ml/100 g Körpergewicht in Betracht. Werden größere Volumina verwendet (sofern nach Tierschutzvorschriften erlaubt), ist dies zu begründen. Schwankungen der Prüfvolumina sind durch entsprechende Dosierung so gering wie möglich zu halten, damit bei allen Dosen ein gemessen am Körpergewicht gleich bleibendes Volumen gewährleistet ist.

Anmerkungen

30. Mindestens einmal täglich – vorzugsweise zum gleichen Zeitpunkt und unter Berücksichtigung des Zeitraums, in dem der Wirkungsgipfel nach Verabreichung der Dosis zu erwarten ist – sollten allgemeine klinische Beobachtungen der Versuchstiere vorgenommen und protokolliert werden. Mindestens zweimal täglich sind alle Tiere auf Morbidität und Mortalität zu überprüfen. Alle Tiere sollten zu Studienbeginn und mindestens einmal pro Woche bei Studien mit wiederholter Verabreichung sowie bei der Tötung gewogen werden. In Studien von mindestens einwöchiger Dauer sollten mindestens wöchentlich Messungen der Futteraufnahme vorgenommen werden. Wenn die Prüfchemikalie über das Trinkwasser verabreicht wird, sollte auch die Wasseraufnahme bei jedem Wasserwechsel und mindestens einmal wöchentlich gemessen werden. Tiere mit Anzeichen von übermäßiger, jedoch nicht tödlich wirkender Toxizität sollten vor Ende des Prüfzeitraums getötet werden (13).

Chromosomenpräparation

31. Unmittelbar nach der Tötung werden aus einem oder beiden Hoden Keimzellsuspensionen gewonnen, mit hypotoner Lösung behandelt und nach festgelegten Protokollen (z. B. (2) (14) (15)) fixiert. Die Zellen werden dann auf Objektträger aufgetropft und gefärbt (16) (17). Alle Objektträger sollten kodiert werden, damit sie bei der Auswertung nicht identifiziert werden können.

Analyse

32. Bei jedem Tier sollten mindestens 200 gut gespreizte Metaphasen analysiert werden (3)(11). Wenn die historische Häufigkeit bei Negativkontrollen < 1 % ist, sollten mehr als 200 Zellen pro Tier ausgewertet werden, um die statistische Aussagekraft zu erhöhen (3). Die angewendeten Färbemethoden sollten eine Identifizierung der Zentromere ermöglichen.

33. Chromosomentyp- und Chromatidentypaberrationen sollten gesondert erfasst und Subtypen zugeordnet werden (Brüche, Austausche). Bei der Prüfung, ob eine Chemikalie signifikante Erhöhungen der Inzidenz von Zellen mit Chromosomenaberrationen induziert, sollten Gaps erfasst, aber nicht berücksichtigt werden. Die Laborpraxis sollte gewährleisten, dass die Chromosomenaberrationen von gut ausgebildeten Labortechnikern analysiert werden. Da es bei der Präparation der Objektträger häufig zum Bruch eines Teils der Metaphasezellen und zum Verlust von Chromosomen kommt, sollten die ausgewerteten Zellen eine Zentromerzahl enthalten, die der Zahl $2n \pm 2$ entspricht, wobei n die haploide Chromosomenzahl für diese Spezies ist.

34. Obwohl es bei der Prüfung um den Nachweis struktureller Chromosomenaberrationen geht, sind die Häufigkeiten von polyploiden Zellen und von Zellen mit endoreduplizierten Chromosomen bei Feststellung zu vermerken (Nummer 44).

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Behandlung der Ergebnisse

35. Die Daten für die einzelnen Tiere sind in tabellarischer Form darzustellen. Für jedes Tier sind die Anzahl der Zellen mit strukturellen Chromosomenaberrationen und die Anzahl der Chromosomenaberrationen je Zelle anzugeben. Chromatidentyp- und Chromosomentypaberrationen, die Subtypen zugeordnet sind (Brüche, Austausche), sollten dabei unter Angabe ihrer Anzahl und Häufigkeit für Versuchs- und Kontrollgruppen getrennt erfasst werden. Gaps werden gesondert vermerkt. Die Häufigkeit der Gaps ist anzugeben, wird in der Regel bei der Analyse der Gesamthäufigkeit der Chromosomenaberrationen jedoch nicht berücksichtigt. Der Anteil der Zellen mit Polyploidie und der Zellen mit endoreduplizierten Chromosomen wird angegeben, sofern beobachtet.

36. Daten zur Toxizität und klinische Anzeichen (gemäß Nummer 30) sind zu dokumentieren.

Akzeptanzkriterien

37. Die folgenden Kriterien entscheiden über die Gültigkeit eines Versuchs:

— Die gleichzeitige Negativkontrolle wird im Einklang mit veröffentlichten Normen für historische Negativkontrolldaten (die im Allgemeinen bei > 0 % und ≤ 1,5 % Zellen mit Chromosomenaberrationen liegen sollten) und (sofern verfügbar) mit den historischen Kontrolldaten des Labors durchgeführt (Nummern 10 und 18).

— Gleichzeitige Positivkontrollen induzieren Reaktionen, die im Einklang mit veröffentlichten Normen für historische Positivkontrolldaten bzw. mit den historischen Kontrolldaten des Labors (sofern verfügbar) stehen und bewirken eine statistisch signifikante Erhöhung im Vergleich zur Negativkontrolle (Nummern 17 und 18).

— Eine angemessene Zahl an Zellen und Dosierungen wurde analysiert (Nummern 28 und 32).

— Die Kriterien für die Auswahl der Höchstdosis entsprechen den Kriterien unter den Nummern 25 und 26.

38. Werden sowohl Mitosen als auch Meiosen beobachtet, ist das Verhältnis der Spermatogonienmitosen zur ersten und zweiten meiotischen Metaphase als Gradmesser der Zytotoxizität bei allen behandelten Tieren und bei Tieren der Negativkontrolle in einer Gesamtstichprobe von 100 sich teilenden Zellen zu bestimmen, um eine mögliche zytotoxische Wirkung festzustellen. Werden nur Mitosen beobachtet, so ist der Mitoseindex für mindestens 1 000 Zellen je Tier zu bestimmen.

Beurteilung und Auswertung

39. Es sind mindestens drei behandelte Dosisgruppen zu analysieren, um ausreichende Daten für Dosis-Wirkungs-Analysen zu liefern.

40. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig positiv, wenn

— mindestens eine der Versuchsdosierungen eine statistisch signifikante Zunahme gegenüber der gleichzeitigen Negativkontrolle aufweist,

— die Zunahme zumindest bei einer Probenahme dosisabhängig ist, und

— Ergebnisse außerhalb des akzeptablen Bereichs für Negativkontrolldaten bzw. der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten des Labors (z. B. der auf einer Poisson-Verteilung beruhenden Kontrollgrenze von 95 %) liegen (sofern verfügbar).

Wenn diese Voraussetzungen erfüllt sind, wird angenommen, dass die Prüfchemikalie in Keimzellen der Versuchstiere Chromosomenaberrationen induziert. Empfehlungen zu den am besten geeigneten statistischen Methoden sind der Literatur zu entnehmen (11) (18). Die verwendeten statistischen Prüfungen müssen das Tier als Versuchseinheit berücksichtigen.

41. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig negativ, wenn

— keine der Versuchsdosierungen eine statistisch signifikante Zunahme gegenüber der gleichzeitigen Negativkontrolle aufweist,

— bei keiner Versuchsbedingung eine dosisabhängige Zunahme festzustellen ist und

— alle Ergebnisse innerhalb eines akzeptablen Bereichs der historischen Negativkontrolldaten des Labors (z. B. der auf einer Poisson-Verteilung beruhenden Kontrollgrenze von 95 %) liegen (sofern verfügbar).

Wenn diese Voraussetzungen erfüllt sind, wird angenommen, dass die Prüfchemikalie in Keimzellen der Versuchstiere keine Chromosomenaberrationen induziert. Empfehlungen zu den am besten geeigneten statistischen Methoden sind der Literatur zu entnehmen (11) (18). Ein negatives Ergebnis schließt nicht aus, dass die Chemikalie Chromosomenaberrationen in späteren Entwicklungsphasen induzieren könnte, die noch nicht untersucht wurden, oder dass sie Genmutationen auslöst.

42. Bei einer eindeutig positiven oder negativen Reaktion ist eine Verifizierung nicht erforderlich.

43. In den Fällen, in denen die Reaktion weder eindeutig negativ noch eindeutig positiv ist, oder um die biologische Relevanz eines Ergebnisses zu untermauern (z. B. eine geringe oder grenzwertige Zunahme), sollten die Daten durch eine fachkundige Beurteilung und/oder anhand weiterer Untersuchungen der vorliegenden abgeschlossenen Versuche bewertet werden (beispielsweise wenn beurteilt werden soll, ob das positive Ergebnis außerhalb des akzeptablen Bereichs von Negativkontrolldaten oder der historischen Negativdaten des betreffenden Labors liegt) (19).

44. In seltenen Fällen erlaubt der Datensatz selbst nach weiteren Untersuchungen keine definitive Aussage zu positiven oder negativen Ergebnissen, so dass die Reaktion als nicht eindeutig eingestuft wird.

45. Eine zahlenmäßige Zunahme der polyploiden Zellen deutet möglicherweise darauf hin, dass die Prüfchemikalie mitotische Prozesse zu hemmen und numerische Chromosomenaberrationen hervorzurufen vermag (20). Eine zahlenmäßige Zunahme der Zellen mit endoreduplizierten Chromosomen ist möglicherweise ein Anzeichen dafür, dass die Prüfchemikalie die Zellzyklusprogression zu hemmen vermag (21) (22), die neben der Hemmung mitotischer Prozesse ebenfalls ein Mechanismus der Induzierung numerischer Chromosomenänderungen ist (Nummer 2). Die Inzidenz von polyploiden Zellen und Zellen mit endoreduplizierten Chromosomen sollte daher getrennt erfasst werden.

Prüfbericht

46. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Zusammenfassung

Prüfchemikalie:

— Herkunft, Chargennummer, ggf. begrenztes Verwendungsdatum;

— Stabilität der Prüfchemikalie, falls bekannt;

— Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie im Lösungsmittel, falls bekannt;

— Messung des pH-Werts, der Osmolalität und ggf. des Niederschlags im Kulturmedium, dem die Prüfchemikalie zugegeben wurde.

Einkomponentiger Stoff:

— physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;

— chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:

— so weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

Zubereitung der Prüfchemikalie:

— Begründung der Auswahl des Vehikels.

— Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie im Lösungsmittel/Vehikel, falls bekannt;

— Zubereitung von Formulierungen für Nahrung, Trinkwasser oder Inhalationspräparaten;

— analytische Bestimmungen der Formulierungen (z. B. Stabilität, Homogenität, nominale Konzentrationen), wenn durchgeführt.

Versuchstiere:

— verwendete(r) Spezies/Stamm, Begründung für deren Verwendung;

— Anzahl und Alter der Tiere;

— Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.;

— Methode zur eindeutigen Identifizierung der Tiere;

— bei Kurzzeitstudien: individuelles Gewicht der Tiere zu Beginn und am Ende der Studie; bei Studien über einer Woche: individuelles Körpergewicht während der Studie und Futteraufnahme. Bereich des Körpergewichts, Mittelwert und Standardabweichung für jede Gruppe.

Prüfbedingungen:

— Daten zu den Positiv- und Negativkontrollen (Vehikel/Lösungsmittel),

— Daten aus einer gegebenenfalls durchgeführten Dosisfindungsstudie;

— Begründung der gewählten Dosisstufen;

— Begründung des Verabreichungswegs;

— Angaben zur Zubereitung der Prüfchemikalie;

— Angaben zur Verabreichung der Prüfchemikalie;

— Begründung für die Tötungszeiten;

— Methoden zur Toxizitätsmessung beim Tier, einschließlich, soweit verfügbar, histopathologischer oder hämatologischer Analysen, sowie Angaben zur Häufigkeit, mit der die Tiere beobachtet und ihre Körpergewichte gemessen wurden,

— Methoden zur Überprüfung, ob die Prüfchemikalie ins Zielgewebe oder in den allgemeinen Kreislauf gelangt ist, im Falle negativer Ergebnisse;

— tatsächliche Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag), berechnet aus der Konzentration der Prüfchemikalie im Futter/Wasser (ppm) und der Futter- bzw. Wasseraufnahme, falls zutreffend;

— Angaben über Futter- und Wasserqualität;

— detaillierte Beschreibung der Behandlungs- und Probenahmepläne und Begründung der jeweils getroffenen Wahl;

— Tötungsmethode;

— Analgesiemethode (sofern angewandt);

— Verfahren zur Isolierung von Geweben;

— Bezeichnung des Spindelgifts, Konzentration und Behandlungsdauer;

— Methode für die Präparation der Objektträger;

— Kriterien für die Auswertung der Aberrationen;

— Anzahl der analysierten Zellen pro Tier;

— Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig.

Ergebnisse:

— Zustand des Tiers vor und während des Prüfungszeitraums, einschließlich Anzeichen von Toxizität;

— Körper- und Organgewichte bei der Tötung (bei Mehrfachbehandlungen Körpergewichte während des Behandlungsverfahrens);

— Toxizitätszeichen;

— Mitoseindex;

— Verhältnis von Spermatogonienmitosen zur ersten und zweiten meiotischen Metaphase oder sonstige Anzeichen einer Exposition des Zielgewebes;

— Typ und Anzahl der Aberrationen, für jedes Tier gesondert anzugeben;

— Gesamtzahl der Aberrationen pro Gruppe mit Mittelwerten und Standardabweichungen;

— Anzahl der Zellen mit Aberrationen pro Gruppe mit Mittelwerten und Standardabweichungen;

— gegebenenfalls Dosis-Wirkungsverhältnis;

— statistische Analysen und angewandte Methoden.

— Daten zu gleichzeitigen Negativkontrollen;

— historische Negativkontrolldaten mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen und 95-%-Grenzen für die Verteilung (wenn verfügbar) oder für die Bewertung der Annehmbarkeit der Prüfergebnisse berücksichtigte veröffentliche historische Negativkontrolldaten;

— Daten zu gleichzeitigen Positivkontrollen;

— ggf. beobachtete Veränderungen der Ploidie, einschließlich Häufigkeiten von polyploiden und/oder endoreduplizierten Zellen;

Erörterung der Ergebnisse

Schlussfolgerung

LITERATUR

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

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

(3) Adler, I.-D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. und Tanaka N. (1994). 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. und de Franca, L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng, C.Y. (Hrsg.) Landes Bioscience und Springer Science+Business Media, S. 1-15.

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

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

(8) Cattanach, B.M. und 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. und 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. und 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

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

(15) Hsu, T.C., Elder, F. und 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. und Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.

(17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, In: D.J. Kirkland (Hrsg.) 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, S. 115-141.

(18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. und Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Hrsg.) 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, S. 184-232.

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

(20) Warr, T.J., Parry, E.M. und 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. und 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.

Anlage

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Aneuploidie: Abweichung von der normalen diploiden (oder haploiden) Chromosomenzahl durch ein einziges Chromosom oder mehr, nicht aber durch einen ganzen (oder mehrere) Chromosomensatz/-sätze (Polyploidie).

Chemikalie: Ein Stoff oder ein Gemisch.

Chromatidentypaberration: Strukturelle Chromosomenanomalie, gekennzeichnet durch Bruch einzelner Chromatiden oder Bruch und Reunion von Chromatiden.

Chromosomentypaberration: Strukturelle Chromosomenanomalie, gekennzeichnet durch Bruch oder Bruch und Reunion beider Chromatiden an gleicher Position.

Chromosomenvielfalt: Vielfalt der Formen (metazentrisch, akrozentrisch usw.) und Größen von Chromosomen.

Clastogen: Jede Chemikalie, die strukturelle Chromosomenaberrationen in Zell- oder Organismenpopulationen verursacht.

Genotoxisch: Allgemeiner Begriff, der alle Typen von DNA- oder Chromosomenschädigungen umfasst, einschließlich Brüchen, Deletionen, Addukten, Nukleotidmodifikationen und -verknüpfungen, Rearrangements, Mutationen, Chromosomenaberrationen sowie Aneuploidie. Nicht alle genotoxischen Effekte führen zu Mutationen oder stabilen Chromosomenschäden.

Gap: Achromatische Läsion von geringerer Breite als eine Chromatide und mit minimaler Verlagerung der Chromatiden.

Mitose: Teilung des Zellkerns, die in der Regel in Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase gegliedert ist.

Mitoseindex (MI): Anteil der Zellen einer Zellpopulation, die sich zum Beobachtungszeitpunkt in der Metaphase befinden: Gradmesser für den Vermehrungsgrad dieser Population.

Mutagen: Auslöser einer Erbgutveränderung der DNA-Basenpaarsequenz(en) in Genen oder in der Chromosomenstruktur (Chromosomenaberrationen).

Numerische Anomalie: Abweichung der Chromosomenzahl vom Normalwert, der für die verwendeten Tiere charakteristisch ist.

Polyploidie: Vorhandensein von mehr als zwei haploiden Chromosomensätzen (*n*) (z. B. 3*n*, 4*n* usw.).

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

Strukturelle Aberration: Veränderung der Chromosomenstruktur, nachweisbar durch mikroskopische Untersuchung des Metaphase-Stadiums der Zellteilung, äußert sich in Form von Deletionen und Fragmenten, Austauschen.

UVCB: Chemische Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Zentromer: Region(en) eines Chromosoms, an die während der Zellteilung die Spindelfasern anhaften, wodurch die ordnungsgemäße Beförderung der Tochterchromosomen zu den Polen der Tochterzellen ermöglicht wird.“

(5) In Teil B erhält Kapitel B.40 folgende Fassung:

„B.40 ***IN VITRO*-HAUTVERÄTZUNG: TER-PRÜFMETHODE**

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode (PM) entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 430 (2015). Als Hautverätzung wird das Auslösen einer irreversiblen Hautschädigung, d. h. einer sichtbaren, bis in das Corium reichenden Nekrose der Epidermis nach Applikation einer Prüfchemikalie [im Sinne der Definition des Global harmonisierten Systems zur Einstufung und Kennzeichnung von Gefahrstoffen der UN (GHS) (1) und der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (CLP-Verordnung) ([1])] bezeichnet. Diese aktualisierte Prüfmethode B.40 besteht in einem *In-vitro*-Verfahren zur Identifizierung nicht hautätzender und hautätzender Stoffe und Gemische nach dem UN GHS (1) und nach der CLP-Verordnung.

2. Die Bewertung von Hautverätzungen erfolgte in der Regel unter Verwendung von Labortieren (PM B.4, entsprechend OECD TG 404, ursprünglich angenommen im Jahr 1981 und geändert in den Jahren 1992, 2002 und 2015) (2). Neben dieser PM B.40 wurden noch weitere *In-vitro*-Prüfmethoden zur Untersuchung des Hautverätzungspotenzials von Chemikalien als PM B.40bis (entsprechend OECD TG 431) (3) und PM B.65 (entsprechend OECD TG 435) validiert und angenommen (4), mit denen ggf. ebenfalls Unterkategorien ätzender Chemikalien identifiziert werden können. Mehrere validierte *In-vitro*-Prüfmethoden wurden als PM B.46 (entsprechend OECD TG 439 (5) angenommen, die zur Untersuchung von Hautreizungen verwendet werden können. In einem OECD-Leitliniendokument über integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA = Integrated Approaches to Testing and Assessment) zur Untersuchung von Hautverätzungen und -reizungen werden mehrere Module beschrieben, in denen mehrere Informationsquellen und Analyseinstrumente zu Gruppen zusammengefasst werden. Sie enthalten i) Leitlinien dazu, wie existierende Daten aufgrund von Versuchen und aus sonstigen Quellen integriert und verwendet werden können, um das Hautreizungs- und das Hautverätzungspotenzial von Chemikalien zu bewerten, und ii) einen Vorschlag zur Durchführung ggf. erforderlicher weiterer Versuche (6).

3. Mit dieser Prüfmethode werden Hautverätzungen mit dem Endpunkt der menschlichen Gesundheit untersucht. Sie beruht auf der Methode zur Messung des elektrischen Widerstands der Haut (TER-Prüfung), bei der ätzende Chemikalien anhand ihrer Fähigkeit ermittelt werden, einen Verlust der normalen Beschaffenheit und Barrierefunktion der Hornhaut (*stratum corneum*) herbeizuführen. Die entsprechende OECD-Prüfrichtlinie wurde ursprünglich im Jahr 2004 angenommen und 2015 unter Berücksichtigung des IATA-Leitliniendokuments aktualisiert.

4. Um *In-vitro*-Prüfungen auf Hautverätzungen für rechtliche Zwecke zu evaluieren, wurden Vorvalidierungsstudien (7) mit anschließender formeller Validierungsstudie der TER-Prüfung mit Rattenhaut zur Bewertung von Hautverätzungen durchgeführt (8) (9) (10) (11). Die Ergebnisse dieser Studien führten zu der Empfehlung, dass die TER-Prüfmethode (auch als validierte Referenzmethode (VRM) bezeichnet) für rechtliche Zwecke zur Bewertung von *In-vivo*-Hautverätzungen verwendet werden kann (12) (13) (14).

5. Bevor eine vorgeschlagene ähnliche oder modifizierte *In-vitro*-TER-Prüfmethode zur Untersuchung auf Hautverätzungen außer der VRM für rechtliche Zwecke verwendet werden kann, sollten nach den Anforderungen der Leistungsstandards (15) Verlässlichkeit, Relevanz (Genauigkeit) und die Grenzen des Verfahrens für den vorgeschlagenen Verwendungszweck bestimmt werden, um sicherzustellen, dass es mit der VRM vergleichbar ist. Die gegenseitige Anerkennung der Daten gemäß dem OECD-Übereinkommen wird erst dann garantiert, wenn vorgeschlagene neue oder aktualisierte Prüfmethoden auf der Grundlage der Leistungsstandards überprüft und in die entsprechende OECD-Prüfrichtlinie aufgenommen wurden.

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

6. Es gelten die Begriffsbestimmungen der Anlage.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

7. In einer Validierungsstudie (10) und in anderen veröffentlichten Studien (16) (17) wurde festgestellt, dass die TER-Prüfmethode zur Untersuchung von Rattenhaut geeignet ist, mit einer Gesamtempfindlichkeit von 94 % (51/54) und einer Spezifizität von 71 % (48/68) zwischen bekannten hautätzenden Chemikalien und nicht hautätzenden Chemikalien aus einer Datenbank mit 122 Stoffen zu unterscheiden.

([1]) Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

8. Gegenstand dieser Prüfmethode sind *In-vitro*-Hautverätzungen. Mit der Prüfmethode können nicht ätzende und ätzende Prüfchemikalien nach dem UN GHS bzw. der CLP-Verordnung festgestellt werden. Eine Einschränkung bei dieser Prüfmethode besteht den Validierungsstudien (8) (9) (10) (11) zufolge darin, dass eine Unterkategorisierung ätzender Stoffe und Gemische nach Maßgabe des UN GHS bzw. der CLP-Verordnung nicht möglich ist. Mit dem geltenden Rechtsrahmen wird festgelegt, wie diese Prüfmethode zu verwenden ist. Diese Prüfmethode vermittelt keine geeigneten Informationen über Hautreizungen; mit PM B.46 werden jedoch gezielt die gesundheitlichen Auswirkungen von Hautreizungen *in vitro* untersucht (5). Eine umfassende Evaluierung lokaler Auswirkungen auf die Haut nach einer einmaligen dermalen Exposition ist dem OECD-Leitliniendokument über integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA) zu entnehmen (6).

9. In der dieser Prüfmethode zugrunde liegenden Validierung wurden zahlreiche Chemikalien (in erster Linie Stoffe) geprüft, und die empirische Datenbank der Validierungsstudie umfasste 60 Stoffe aus zahlreichen Chemikalienklassen (8) (9). Auf der Grundlage der insgesamt verfügbaren Daten ist festzustellen, dass die Prüfmethode bei zahlreichen Chemikalienklassen und Aggregatzuständen (u. a. Flüssigkeiten, halbfeste Stoffe, Feststoffe und Wachse) anwendbar ist. Da für bestimmte Aggregatzustände jedoch nicht ohne Weiteres Prüfstoffe mit geeigneten Referenzdaten verfügbar sind, ist darauf hinzuweisen, dass bei der Validierung eine vergleichsweise geringe Anzahl an Wachsen und ätzenden Feststoffen bewertet wurde. Flüssigkeiten können wässrig oder nicht wässrig und Feststoffe in Wasser löslich oder unlöslich sein. Wenn nachgewiesen werden kann, dass die Prüfmethode bei einer bestimmten Kategorie von Stoffen nicht anwendbar ist, sollte sie bei diesen nicht verwendet werden. Diese Prüfmethode kann jedoch nicht nur bei Stoffen verwendet werden, sondern wird auch als für Gemische geeignet betrachtet. Da Gemische jedoch vielfältigen Kategorien zuzurechnen sein und unterschiedliche Zusammensetzungen haben können, und da gegenwärtig nur begrenzte Informationen über die Prüfung von Gemischen verfügbar sind, sollten Prüfmethoden, bei denen nachgewiesen werden kann, dass sie für eine bestimmte Kategorie von Gemischen nicht geeignet sind (beispielsweise durch ein Verfahren entsprechend dem von Eskes u. a. (2012) vorgeschlagenen Verfahren) (18), für die betreffende Kategorie von Gemischen nicht verwendet werden. Bevor die Prüfmethode für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regulierungszweck verwendet wird, ist zu prüfen, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefern kann und, wenn dem so ist, warum. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs rechtlich vorgeschrieben ist. Gase und Aerosole wurden bislang noch nicht in Validierungsstudien bewertet (8)(9). Obwohl deren Prüfung mit der TER-Prüfmethode prinzipiell vorstellbar ist, erlaubt die vorliegende Prüfmethode das Untersuchen von Gasen und Aerosolen nicht.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

10. Die Prüfchemikalie wird in einem Zweikammersystem bis zu 24 Stunden lang auf den Epidermisflächen von Hautstücken aufgebracht, wobei die Hautstücke als Trennwand zwischen den beiden Kammern fungieren. Die Hautstücke werden 28-30 Tage alten Ratten entnommen, die zuvor tierschutzgerecht getötet wurden. Hautätzende Chemikalien werden anhand ihrer Fähigkeit ermittelt, einen Verlust der normalen Beschaffenheit und Barrierefunktion der Hornhaut (*stratum corneum*) herbeizuführen, welcher als Senkung des TER unter einen bestimmten Schwellenwert (16) gemessen wird (Nummer 32). Beim TER der Haut von Ratten wurde ein Schwellenwert von 5 kΩ auf der Grundlage umfangreicher Datenbestände für ein breites Spektrum unterschiedlicher Chemikalien gewählt, wobei die überwiegende Mehrzahl der Werte entweder eindeutig deutlich oberhalb dieses Schwellenwerts (oft > 10 kΩ) oder aber deutlich unterhalb dieses Werts (oft < 3 kΩ) lag (16). Im Allgemeinen sinkt der TER bei Prüfchemikalien, die bei Tieren nicht hautätzend wirken, aber hautreizende bzw. nicht hautreizende Eigenschaften aufweisen, nicht bis unter diesen Schwellenwert. Außerdem kann sich durch die Verwendung anderer Hautherstellungen oder anderer Prüfgeräte der Schwellenwert verändern, wodurch eine zusätzliche Validierung notwendig wird.

11. Im Prüfverfahren ist zur Bestätigung der Prüfungen auf positive Ergebnisse im TER (einschließlich Werten um ca. 5 kΩ) ein Farbbindungsschritt vorgesehen. Durch den Farbbindungsschritt wird festgestellt, ob die steigende Ionenpermeabilität auf die materielle Zerstörung der Hornhaut (*stratum corneum*) zurückzuführen ist. Durch die TER-Methode mit Rattenhaut konnte eine gute Vorhersagegenauigkeit der hautätzenden *In-vivo*-Wirkung bei dem nach Prüfmethode B.4 (2) untersuchten Kaninchen nachgewiesen werden.

NACHWEIS DER LEISTUNGFÄHIGKEIT

12. Vor der routinemäßigen Anwendung der TER-Prüfmethode mit Rattenhaut nach dieser Prüfmethode sollten Labors die erforderliche technische Befähigung durch eine ordnungsgemäße Klassifizierung der zwölf in Tabelle 1 empfohlenen Leistungsstoffe nachweisen. Wenn ein dort genannter Stoff nicht verfügbar ist bzw. wenn dies gerechtfertigt ist, kann ein anderer Stoff verwendet werden, für den geeignete *In-vivo*- und *In-vitro*-Referenzdaten verfügbar sind (z. B. aus der Liste der Referenzchemikalien (16)), sofern die in Tabelle 1 beschriebenen Auswahlkriterien angewendet werden.

Tabelle 1

Liste der Leistungsstoffe [1]

Stoff	CAS-Nr.	Chemikalienklasse [2]	UN GHS/CLP Kat. nach *In-vivo*-Ergebnissen [3]	VRM Kat. nach *In-vitro*-Ergebnissen	Aggregatzustand	pH [4]
In vivo ätzende Chemikalien						
N,N'-Dimethyl dipropylenetriamin	10563-29-8	organische Base	1A	6 × C	L	8,3
1,2-Diaminopropan	78-90-0	organische Base	1A	6 × C	L	8,3
Chlorwasserstoffsäure (10 %)	7664-93-9	anorganische Säure	(1A/)1B/1C	5 × C 1 × NC	L	1,2
Kaliumhydroxid (10 % aq.)	1310-58-3	anorganische Base	(1A/)1B/1C	6 × C	L	13,2
Octansäure (Caprylsäure)	124-07-2	organische Säure	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,6
2-tert-Butylphenol	88-18-6	Phenol	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,9
In Vivo nicht ätzende Chemikalien						
Isostearinsäure	2724-58-5	organische Säure	NC	6 × NC	L	3,6
4-Amino-1,2,4-Triazol	584-13-4	organische Base	NC	6 × NC	S	5,5
Phenethylbromid	103-63-9	Elektrophil	NC	6 × NC	L	3,6
4-(Methylthio)-Benzaldehyd	3446-89-7	Elektrophil	NC	6 × NC	L	6,8
1,9-Decadien	1647-16-1	neutral organisch	NC	6 × NC	L	3,9
Tetrachlorethylen	127-18-4	neutral organisch	NC	6 × NC	L	4,5

Abkürzungen: aq = wässrig; CAS-Nr. (CAS Registry Number = CAS-Registrierungsnummer); VRM = validierte Referenzmethode; C = ätzend; NC = nicht ätzend.

(1) Die Leistungsstoffe, sortiert zunächst nach ätzenden und nicht ätzenden Stoffen, anschließend nach Unterkategorien ätzender Stoffe und schließlich nach Chemikalienklassen, wurden unter den in der Validierungsstudie des Europäischen Zentrum zur Validierung alternativer Methoden (EZVAM) zur TER-Prüfmethode mit Rattenhäuten ausgewählt (8) (9). Wenn nicht anderweitig angegeben, wurden die Stoffe in der Reinheit geprüft, in der sie im Handel gekauft wurden (8). Die Auswahl beinhaltete nach Möglichkeit Stoffe, die (i) repräsentativ für die Spanne der Ätzwirkungen sind (z. B. nicht ätzend, schwach ätzend usw. bis hin zu stark ätzend), die mit der VRM gemessen oder vorhergesagt werden können; (ii) repräsentativ für die in der Validierungsstudie verwendeten Chemikalienklassen sind; (iii) Aufschluss über die Leistungsmerkmale der VRM geben; (iv) durch gut definierte chemische Strukturen gekennzeichnet sind; (v) bei der *In-vivo* -Referenzprüfmethode klare Ergebnisse induzieren; (vi) im Handel erhältlich sind; (vii) nicht mit nicht tragbaren Entsorgungskosten verbunden sind.

(2) Von Barratt u. a. zugewiesene Chemikalienklasse (8).

(3) Den UN-GHS-/CLP-Kategorien 1A, 1B und 1C entsprechen die UN-Verpackungsgruppen I, II und III.

(4) Die pH-Werte wurden von Fentem u. a. (9) und Barratt u. a. (8) ermittelt.

VERFAHREN

13. Für die TER-Prüfmethode zur Feststellung der Ätzwirkung bei Rattenhaut sind Standardarbeitsanweisungen (SOPs) verfügbar (19). Die in dieser Prüfmethode verwendeten TER-Prüfmethoden mit Rattenhaut sollten die folgenden Anforderungen erfüllen:

Versuchstiere

14. Für die Prüfung sollten Ratten verwendet werden, weil die Empfindlichkeit von Rattenhaut gegenüber den bei dieser Prüfmethode verwendeten Stoffen bereits nachgewiesen wurde (12) und weil nur Rattenhaut bislang förmlich validiert wurde (8) (9). Alter (wenn sich die Haut vollständig gebildet hat) und Abstammung der Ratten sind von besonderer Bedeutung, damit gewährleistet ist, dass sich die Fellfollikel in der Ruhephase befinden, bevor das Fellwachstum der erwachsenen Tiere beginnt.

15. An den jungen, ca. 22 Tage alten männlichen oder weiblichen Ratten (Wistar-Ratten oder vergleichbare Abstammung) wird das Fell am Rücken und an den Flanken mit einem geeigneten Instrument sorgfältig geschoren. Anschließend werden die Tiere mit vorsichtigen Wischbewegungen gewaschen, wobei die geschorenen Flächen in eine Antibiotikalösung getaucht werden (die Lösung enthält beispielsweise Streptomycin, Penicillin, Chloramphenicol und Amphotericin in Konzentrationen, die ein bakterielles Wachstum verhindern). Die Tiere werden dann am dritten oder vierten Tag nach dem ersten Waschvorgang erneut gewaschen und innerhalb von 3 Tagen nach dem zweiten Waschvorgang verwendet, wenn sich die Hornhaut vom Schervorgang erholt hat.

Gewinnung der Hautstücke

16. Die Versuchstiere werden im Alter von 28-30 Tagen tierschutzgerecht getötet; dieses Alter ist von entscheidender Bedeutung. Die dorsal-laterale Haut der Tiere wird entfernt und von überschüssigem subkutanem Fett befreit, das von der Haut sorgfältig abgeschält wird. Es werden Hautstücke mit einem Durchmesser von je ca. 20 mm entnommen. Die Haut kann vor der Verwendung der Hautstücke eingelagert werden, wenn sich zeigt, dass die positiven und negativen Kontrolldaten mit den an frischer Haut ermittelten Daten übereinstimmen.

17. Jedes Hautstück wird so über das Ende eines PTFE-(Polytetrafluorethylen)-Rohres gelegt, dass die Epidermisoberfläche auf dem Ende des Rohres aufliegt. Zur Fixierung des Hautstücks wird ein O-Ring aus Gummi straff über das Rohrende gezogen, so dass die Haut fixiert wird. Überflüssiges Hautgewebe wird abgeschnitten. Der O-Ring wird sodann mit gereinigter Naturvaseline zum Ende des PTFE-Rohrs hin gründlich abgedichtet. Das Rohr wird durch eine Federklemme in einer Rezeptorkammer gehalten, die $MgSO_4$-Lösung (154 mM) enthält (Abbildung 1). Das Hautstück ist vollständig in die $MgSO_4$-Lösung einzutauchen. Aus einer einzigen Rattenhaut können bis zu 10-15 Hautstücke entnommen werden. Die Abmessungen des Rohrs und des O-Rings sind in Abbildung 2 angegeben.

18. Vor Beginn der Prüfung wird zu Qualitätssicherungszwecken bei jeder Tierhaut der TER an zwei Hautstücken gemessen. Beide Hautstücke müssen einen Widerstand von mehr als 10 kΩ aufweisen, damit sie für die Prüfmethode verwendet werden können. Liegt der Widerstand unter 10 kΩ, sind die übrigen Hautstücke der betreffenden Tierhaut zu vernichten.

Applikation der Prüfchemikalie und Kontrollstoffe

19. Zu jedem Prüflauf (Versuch) sind gleichzeitige Positiv- und Negativkontrollen durchzuführen, damit eine angemessene Eignung des Experimentalmodells gewährleistet ist. Bei jedem Prüflauf (Versuch) sind Hautstücke eines einzigen Tieres zu verwenden. Als Prüfchemikalien für die Positiv- und Negativkontrolle sind 10 M Chlorwasserstoffsäure bzw. destilliertes Wasser zu verwenden.

20. Die flüssigen Prüfchemikalien (150 µl) werden im Rohrinneren gleichmäßig auf die epidermale Oberfläche aufgebracht. Bei Prüfungen an Feststoffen wird eine ausreichende Menge des Feststoffs gleichmäßig auf das Hautstück aufgebracht, so dass gewährleistet ist, dass die gesamte Epidermisoberfläche bedeckt ist. Auf den Feststoff wird entionisiertes Wasser (150 µl) aufgebracht und das Rohr vorsichtig bewegt. Um optimalen Kontakt der Prüfchemikalien mit der Haut zu erreichen, müssen einige Feststoffe gegebenenfalls auf 30 °C erwärmt werden, so dass die Prüfchemikalie schmilzt oder weich wird, oder die Prüfchemikalie muss zu einem Granulat oder Pulver zermahlen werden.

21. Für jede Prüf- und Kontrollchemikalie werden bei jedem Prüflauf (Versuch) je drei Hautstücke verwendet. Die Prüfchemikalien werden für 24 h bei 20-23 °C aufgebracht. Anschließend wird die Prüfchemikalie mit fließendem Leitungswasser höchstens mit Raumtemperatur gewaschen, bis kein weiteres Material mehr entfernt werden kann.

TER-Messungen

22. Der Hautwiderstand wird als TER mit einer Wheatstone'schen Wechselstrom-Messbrücke mit niedriger Spannung gemessen (18). Die Kenndaten der Messbrücke lauten: Betriebsspannung 1-3 V, sinus- oder rechteckförmiger Wechselstrom mit 50-1 000 Hz, Messbereich mindestens 0,1-30 kΩ. Die in der Validierungsstudie verwendete Datenbrücke misst Induktivität, Kapazität und Widerstand bis 2 000 H, 2 000 µF bzw. 2 MΩ bei Frequenzen von 100 Hz oder 1 kHz unter Verwendung serieller oder paralleler Werte. Für die TER-Messungen werden Messungen der hautätzenden Wirkung in Widerständen bei einer Frequenz von 100 Hz und unter Verwendung serieller Werte verwendet. Vor der Messung des elektrischen Widerstands wird die Oberflächenspannung der Haut verringert, indem so viel 70 %iges Ethanol hinzugegeben wird, dass die Epidermis bedeckt ist. Nach einigen Sekunden wird das Ethanol aus dem Rohr entfernt und das Hautgewebe durch Hinzufügen von 3 ml $MgSO_4$-Lösung (154 mM) befeuchtet. Zur Messung des Widerstands in kΩ/Hautstück (Abbildung 1) werden die Elektroden der Datenbrücke auf beiden Seiten des Hautstücks angebracht. Die Gesamtabmessungen der Elektroden sowie die Länge der Elektrode unterhalb der Abgreifklemmen sind in Abbildung 2 dargestellt. Die an der Innenelektrode angebrachte Abgreifklemme liegt während der Widerstandsmessung oben auf dem PTFE-Rohr auf, so dass stets eine gleich bleibende Elektrodenlänge in die $MgSO_4$-Lösung eingetaucht bleibt. Die äußere Elektrode ist in der Rezeptorkammer so angeordnet, dass sie am Kammerboden ansteht. Der Abstand zwischen der Federklemme und dem unteren Ende des PTFE-Rohrs bleibt konstant (Abbildung 2), da dieser Abstand den erzielten Widerstandswert beeinflusst. Folglich muss auch der Abstand zwischen der Innenelektrode und dem Hautstück konstant und möglichst gering sein (1-2 mm).

23. Ist der gemessene Widerstand größer als 20 kΩ, so kann dies daran liegen, dass ein Rest der Prüfchemikalie die Epidermisoberfläche des Hautstücks bedeckt. Zur weiteren Entfernung dieser Schicht kann beispielsweise versucht werden, das PTFE-Rohr mit dem Daumen (geschützt durch einen Gummihandschuh) zu verschließen und das Rohr ca. 10 Sekunden lang zu schütteln; anschließend wird die $MgSO_4$-Lösung weggeschüttet und die Widerstandsmessung mit frischer $MgSO_4$-Lösung wiederholt.

24. Eigenschaften und Abmessungen der Prüfapparatur und das verwendete Versuchsverfahren können die ermittelten TER-Werte beeinflussen. Der Schwellenwert von 5 kΩ für hautätzende Wirkung wurde aus Daten abgeleitet, die mit der/dem in dieser Methode beschriebenen speziellen Versuchsanordnung und Versuchsverfahren ermittelt wurden. Abweichende Schwellen- und Kontrollwerte gelten möglicherweise, wenn sich die Prüfbedingungen ändern oder eine andere Versuchsanordnung verwendet wird. Daher müssen die Schwellenwerte für die Methodik und den Widerstand durch Prüfung einer Reihe von Leistungsstoffen kalibriert werden, die aus den in der Validierungsstudie (8) (9) verwendeten Stoffen oder aus Chemikalienklassen, die den untersuchten Stoffen ähneln, ausgewählt wurden. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über geeignete Leistungsstoffe.

Farbbindungsmethoden

25. Bei bestimmten nicht hautätzenden Materialien, denen die Haut ausgesetzt ist, kann der Widerstand unter den Schwellenwert von 5 kΩ sinken, wodurch es zum Ionendurchtritt durch die Hornhaut kommt und der elektrische Widerstand absinkt (9). So können beispielsweise neutrale organische Stoffe und Chemikalien mit oberflächenaktiven Eigenschaften (u. a. Detergenzien, Emulgatoren und andere Tenside) die Hautlipide entziehen, wodurch die Trennschicht ionendurchlässiger wird. Liegen die TER-Werte dieser Prüfchemikalien also unter oder um 5 kΩ und sind keine optischen Anzeichen einer Schädigung der Hautstücke zu erkennen, ist eine Beurteilung des Farbeindringvermögens an den behandelten Hautgeweben und den Kontrollgeweben durchzuführen, um festzustellen, ob die ermittelten TER-Werte durch gestiegene Hautpermeabilität oder durch hautätzende Wirkung zustande kamen (7) (9). In letzterem Fall dringt, wenn eine Unterbrechung der Hornhaut vorliegt, der auf die Hautoberfläche aufgetragene Farbstoff Sulforhodamin B rasch ein und verursacht eine Verfärbung des darunter liegenden Hautgewebes. Dieser Farbstoff ist gegenüber einer breiten Palette von Stoffen stabil und wird durch das nachstehend beschriebene Extraktionsverfahren nicht beeinflusst.

Anwendung und Entfernung von Sulforhodamin-B-Farbstoff

26. Nach der Beurteilung der TER-Prüfungen wird das Magnesiumsulfat aus dem Rohr abgeschüttet und die Haut sorgfältig auf erkennbare Schäden untersucht. Wenn keine offensichtliche größere Schädigung (z. B. eine Perforation) zu erkennen ist, werden 150 µl einer 10 %igen (w/v) Verdünnung des Farbstoffs Sulforhodamin

B (Acid Red 52, CI-Nr. 45100; CAS-Nr. 3520-42-1) 2 h in destilliertem Wasser auf die Epidermis der einzelnen Hautstücke aufgetragen. Diese Hautstücke werden anschließend höchstens bei Raumtemperatur unter fließendem Wasser ca. 10 Sekunden lang abgewaschen, um überschüssige/ungebundene Farbe zu entfernen. Jedes Hautstück wird sorgfältig vom PTFE-Rohr entfernt und in ein Gefäß (z. B. ein 20-ml-Szintillationsfläschchen) eingelegt, das entionisiertes Wasser (8 ml) enthält. Die Fläschchen werden 5 Minuten lang vorsichtig geschüttelt, um restliche ungebundene Farbe zu entfernen. Nach Wiederholung des Spülvorgangs werden die Hautstücke entnommen und in Fläschchen eingelegt, die 5 ml 30 %iges (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) in destilliertem Wasser enthalten, und über Nacht bei 60 °C aufbewahrt.

27. Nach dieser Inkubation werden die einzelnen Hautstücke entnommen und entsorgt und die verbleibende Lösung 8 Minuten lang bei 21 °C zentrifugiert (relative Zentrifugalkraft ~175 × g). Eine 1-ml-Probe des oberflächenaktiven Stoffs wird im Verhältnis 1:5 (v/v) (d. h. 1 ml + 4 ml) mit 30 %igem (w/v) SDS in destilliertem Wasser verdünnt. Die optische Dichte (OD) der Lösung wird bei 565 nm gemessen.

Berechnung des Farbgehalts

28. Der Gehalt an Sulforhodamin-B-Farbstoff je Hautstück wird mittels der OD-Werte (9) berechnet (molarer Extinktionskoeffizient von Sulforhodamin B bei 565 nm = $8{,}7 \times 10^4$, Molekulargewicht = 580). Der Farbstoffgehalt wird für jedes der drei Hautstücke durch eine entsprechende Kalibrierungskurve bestimmt und dann der mittlere Farbstoffgehalt für die Wiederholungs-Gleichtests berechnet.

Akzeptanzkriterien

29. Die mittleren TER-Werte werden akzeptiert, wenn die Ergebnisse der gleichzeitigen Positiv- und Negativkontrollen innerhalb der akzeptablen Bereiche für die Methode im Prüflabor liegen. Die akzeptablen Widerstandsbereiche für die oben beschriebene Methode und Versuchsanordnung lauten wie folgt:

Kontrolle	Stoff	Widerstandsbereich (kΩ)
Positivkontrolle	10 M Chlorwasserstoffsäure	0,5-1,0
Negativkontrolle	Destilliertes Wasser	10-25

30. Die ermittelten Mittelwerte der Farbbindung werden nur akzeptiert, wenn die Ergebnisse der gleichzeitig geprüften Kontrollen innerhalb definierter Akzeptanzgrenzen der betreffenden Methode liegen. Die für die Kontrollstoffe der oben beschriebenen Methodik und Versuchsanordnung vorgeschlagenen Akzeptanzspannen sind der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Kontrolle	Stoff	Farbgehaltsbereich (µg/Hautstück)
Positivkontrolle	10 M Chlorwasserstoffsäure	40-100
Negativkontrolle	Destilliertes Wasser	15-35

Auswertung der Ergebnisse

31. Der TER-Schwellenwert zur Unterscheidung zwischen ätzenden und nicht ätzenden Prüfchemikalien wurde bei der Optimierung der Prüfmethode ermittelt, in einer Vorvalidierungsphase geprüft und in einer förmlichen Validierungsstudie bestätigt.

32. Im Folgenden wird das Vorhersagemodell für die TER-Prüfmethode zur Feststellung von Hautätzungen bei Rattenhaut (9)(19) in Verbindung mit dem Klassifizierungssystem des UN GHS bzw. der CLP-Verordnung erläutert:

Die Prüfchemikalie gilt als ‚nicht hautätzend':

i) wenn der Mittelwert des für die Prüfchemikalie ermittelten TER-Werts größer als 5 kΩ ist oder

ii) wenn der Mittelwert des für die Prüfchemikalie ermittelten TER-Werts gleich 5 kΩ oder kleiner ist und

— die Hautstücke keine wahrnehmbaren Veränderungen (z. B. Perforationen) erkennen lassen, und

— der mittlere Farbstoffgehalt des Hautstücks unter (<) dem mittleren Farbstoffgehalt des Hautstücks der gleichzeitig mit 10M HCl durchgeführten Positivkontrolle liegt (siehe Nummer 30 zu Werten der Positivkontrolle).

Die Prüfchemikalie gilt als ‚hautätzend':

i) wenn der für die Prüfchemikalie ermittelte Mittelwert des TER-Werts gleich 5 kΩ oder kleiner ist (≤) und das Hautstück offensichtliche Schädigungen aufweist (z. B. eine Perforation) oder

ii) wenn der Mittelwert des für die Prüfchemikalie ermittelten TER-Werts gleich 5 kΩ oder kleiner ist, und

— die Hautstücke keine wahrnehmbaren Veränderungen (z. B. Perforationen) erkennen lassen, aber

— der mittlere Farbstoffgehalt des Hautstücks größer oder gleich (≥) dem mittleren Farbstoffgehalt des Hautstücks der gleichzeitig mit 10M HCl durchgeführten Positivkontrolle ist (siehe Nummer 30 zu Werten der Positivkontrolle).

33. Vorausgesetzt die Prüfung liefert ein eindeutiges Ergebnis, genügt ein einziger Prüflauf (Versuch) mit drei parallel geprüften Replikat-Hautstücken. Bei Grenzergebnissen, wie z. B. nicht übereinstimmenden Replikatmessungen und/oder einer mittleren TER-Werten von 5 ± 0,5 k, sollte ein zweiter unabhängiger Prüflauf (Versuch) in Betracht gezogen werden bzw. ein dritter bei abweichenden Ergebnissen der ersten beiden Prüfläufe (Versuche).

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

34. Die Widerstandswerte (k) und ggf. die Farbstoffgehalte (µg/Hautstück) für die Prüfchemikalie sowie für Positiv- und Negativkontrollen sind in Tabellenform einschließlich der Daten für die einzelnen Replikat-Hautstücke pro Prüflauf (Versuch) und der Mittelwerte ± Standardabweichung in Berichten zusammenzufassen. Alle Wiederholungsversuche sollten vermerkt werden. Für jede Prüfchemikalie sind festgestellte Schädigungen der Hautstücke zu vermerken.

Prüfbericht

35. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalien und Kontrollchemikalien:

— Einkomponentiger Stoff: chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;

— mehrkomponentiger Stoff, UVCB und Gemische: So weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten;

— physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;

— Herkunft, Chargennummer, sofern vorhanden;

— Behandlung der Prüfchemikalien/Kontrollstoffe vor der Prüfung, sofern relevant (z. B. Erwärmen, Mahlen);

— Stabilität der Prüfchemikalie, letztes Verwendungsdatum oder Datum für erneute Analyse, soweit bekannt;

— Lagerungsbedingungen.

Versuchstiere:

— Abstammung und Geschlecht;

— Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Verwendung als Spendertiere;

— Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.;

— Details zur Herstellung der Hautstücke.

Prüfbedingungen:

— Eichkurven für die Versuchsapparaturen;

— Eichkurven für die Durchführung der Farbbindungsprüfungen, verwendete Bandbreite für die Messung von OD-Werten und die OD-Linearitätsspanne des Messgeräts (z. B. eines Spektrophotometers) (sofern relevant);

— Details des Prüfverfahrens für die TER-Messungen;

— Details des Prüfverfahrens für die Beurteilung der Farbbindefähigkeit (sofern relevant);

— verwendete Prüfdosierungen, Expositionszeitraum (-zeiträume) und -temperatur(en);

— Details zum verwendeten Waschverfahren nach dem Expositionszeitraum;

— Anzahl der je Prüfchemikalie und Kontrolle (Positiv- und Negativkontrolle) verwendeten Replikat-Hautstücke;

— Beschreibung etwaiger Änderungen am Prüfverfahren;

— Verweis auf historische Modelldaten. Dabei sollten unter anderem die folgenden Aspekte berücksichtigt werden:

i) Akzeptanz der TER-Werte der Positiv- und Negativkontrolle (in kΩ) mit Verweis auf die Spannen der Widerstandswerte der Positiv- und Negativkontrollen,

ii) Akzeptanz der Farbstoffgehaltwerte der Positiv- und Negativkontrolle (in µg/Hautstück) mit Verweis auf die Spannen der Farbstoffgehaltwerte der Positiv- und Negativkontrollen,

iii) Akzeptanz der Prüfergebnisse mit Verweis auf die historischen Schwankungen zwischen Replikat-Hautstücken;

— Beschreibung der berücksichtigten Entscheidungskriterien und des verwendeten Vorhersagemodells.

Ergebnisse:

— Tabellarische Darstellung der Daten der Versuche zur Beurteilung der TER-Werte und der Farbbindefähigkeit (wenn relevant) für die einzelnen Prüfchemikalien und Kontrollen, für jeden einzelnen Prüflauf (Versuch) und für jedes Replikat-Hautstück (einzelne Tiere und einzelne Hautproben), Mittel, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten;

— Beschreibung etwaiger beobachteter Wirkungen;

— abgeleitete Einstufung mit Bezug auf das Vorhersagemodell und/oder angewandte Entscheidungskriterien.

Erörterung der Ergebnisse

Schlussfolgerungen

LITERATUR

(1) Vereinte Nationen (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), fünfte überarbeitete Ausgabe, UN New York und Genf, 2013. Abrufbar unter:[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

(2) Kapitel B.4 dieses Anhangs, Akute Hautreizung/-verätzung.

(3) Kapitel B.40bis dieses Anhangs, *In-vitro*-Hautmodell.

(4) Kapitel B.65 dieses Anhangs, *In-vitro*-Methode zur Untersuchung der Membranbarriere.

(5) Kapitel B.46 dieses Anhangs, *In-vitro*-Hautreizung: Prüfmethode mit rekonstruierter humaner Epidermis.

(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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.*ATLA* 23, 219-255.

(8) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. und 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, CA., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H. und Zucco, F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops.*ATLA*23, 129-147.

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

(12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneos Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), herausgegeben vom Wissenschaftlich Beratenden Ausschuss (ESAC) des ECVAM (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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(16) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. und 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. und Gardner, J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro:* Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol. In Vitro* 6,191-194.

(18) Eskes, C., Detappe, V., Koëter, H., Kreysa, J., Liebsch, M., Zuang, V., Amcoff, P., Barroso, J., Cotovio, J., Guest, R., Hermann, M., Hoffmann, S., Masson, P., Alépée, N., Arce, L.A., Brüschweiler, B., Catone, T., Cihak, R., Clouzeau, J., D'Abrosca, F., Delveaux, C., Derouette, J.P., Engelking, O., Facchini, D., Fröhlicher, M., Hofmann, M., Hopf, N., Molinari, J., Oberli, A., Ott, M., Peter, R., Sá-Rocha, V.M., Schenk, D., Tomicic, C., Vanparys, P., Verdon, B., Wallenhorst, T., Winkler, G.C. und 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

Abbildung 1

Apparatur Für Die Ter-Prüfung Mit Rattenhaut

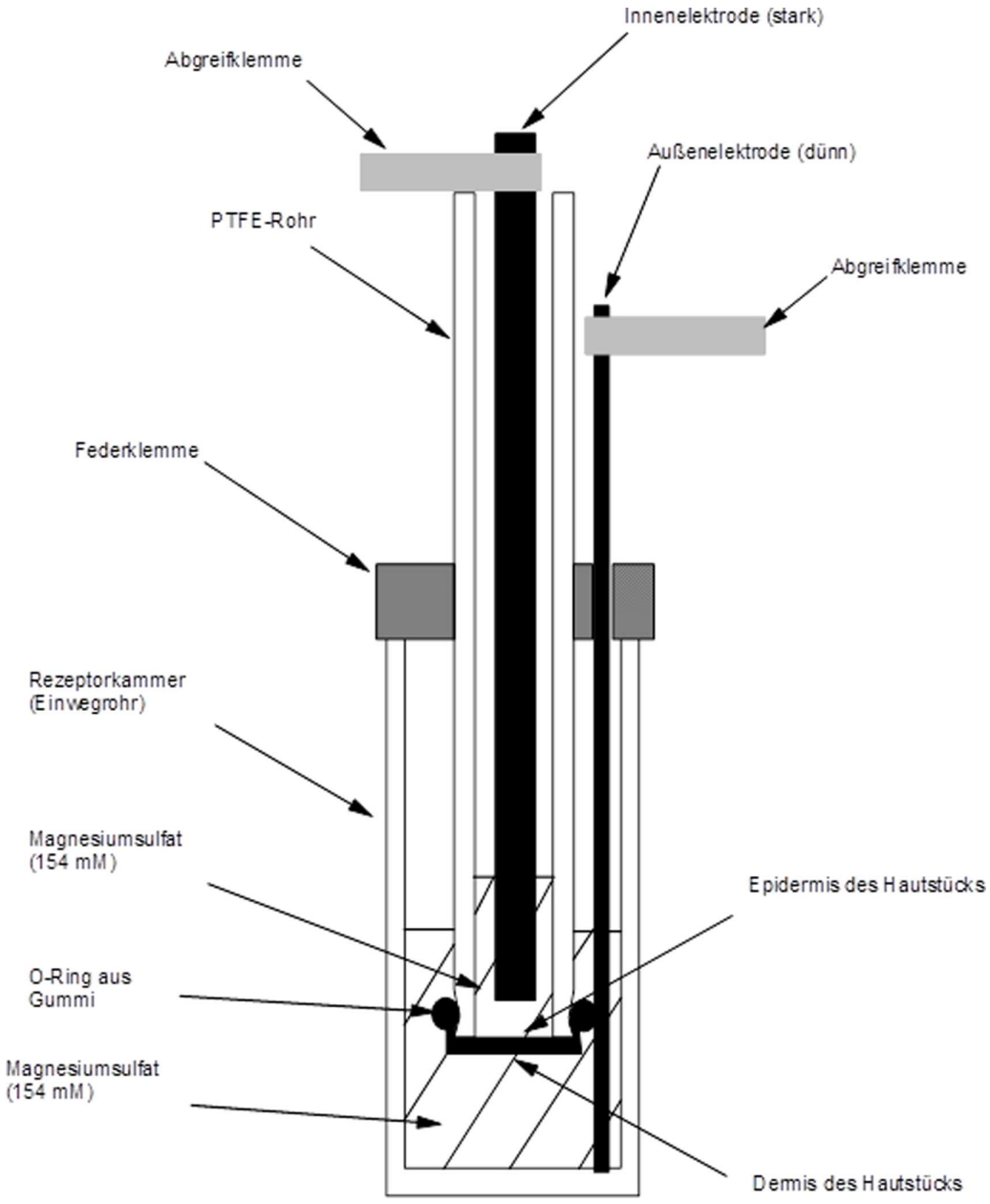
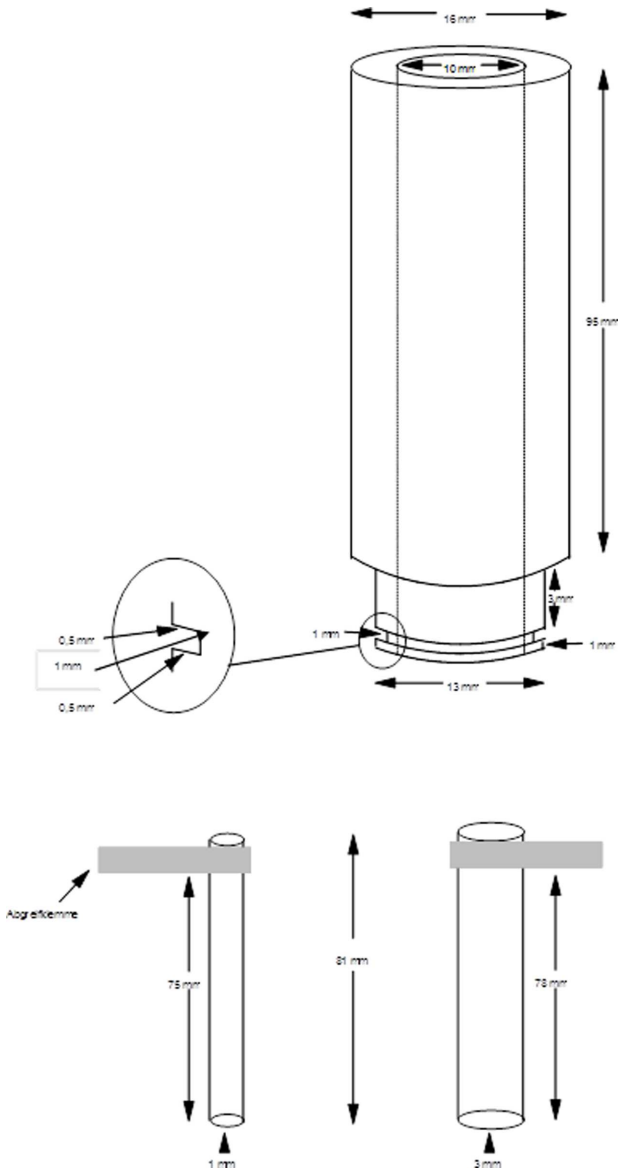


Abbildung 2

Abmessungen Der Polytetrafluorethylen- (PTFE-) und Rezeptorrohre und Der Verwendeten Elektroden



Kritische Faktoren der obigen Apparaturen:

— Innendurchmesser des PTFE-Rohrs,

— Länge der Elektroden in Relation zum PTFE-Rohr und zum Rezeptorrohr, so dass die Hautscheibe nicht mit den Elektroden in Kontakt kommen sollte und die Elektrode auf einer Standardlänge mit der $MgSO_4$-Lösung in Kontakt steht,

— die Menge an $MgSO_4$-Lösung im Rezeptorrohr muss in Relation zum Füllstand im PTFE-Rohr den in Abbildung 1 dargestellten Flüssigkeitsstand ergeben,

— das Hautstück muss so am PTFE-Rohr befestigt sein, dass der elektrische Widerstand ein richtiges Maß für die Hauteigenschaften darstellt.

Anlage

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

C: Hautätzend

Chemikalie: Ein Stoff oder ein Gemisch.

Einkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens 80 % w/w vorliegt.

Gemisch: Ein Gemisch oder eine Lösung, die aus zwei oder mehr Stoffen besteht.

Genauigkeit: Der Grad an Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von ‚Übereinstimmung' verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (20).

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung) (UN): Ein System zur Klassifizierung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) nach standardisierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und ökologischer Gefahren und zur entsprechenden Kennzeichnung durch Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenhinweise, Sicherheitshinweise und Sicherheitsdatenbögen, um zum Schutz des Menschen (einschließlich Arbeitgeber, Arbeiter, Spediteure, Verbraucher und Notfall-Einsatzkräfte) und der Umwelt Informationen über die schädlichen Wirkungen der betreffenden Chemikalien zu verbreiten (1).

Hautverätzung, *in vivo*: Das Auslösen einer irreversiblen Hautschädigung, d. h. einer sichtbaren, bis in das Corium reichenden Nekrose der Epidermis nach Applikation einer Prüfchemikalie für die Dauer von bis zu 4 Stunden. Verätzungsreaktionen sind gekennzeichnet durch Geschwüre, Blutungen, blutige Verschorfungen und am Ende des Beobachtungszeitraums von 14 Tagen durch eine auf ein Ausbleichen der Haut zurückzuführende Verfärbung, komplett haarlose Bereiche und Narben. Bei der Beurteilung fragwürdiger Schädigungen ist die Histopathologie mit zu berücksichtigen.

IATA: Integrated Approach to Testing and Assessment = integrierter Prüfungs- und Bewertungsansatz.

Leistungsstandards (PS): Auf einer validierten Prüfmethode beruhende Normen, auf deren Grundlage die Vergleichbarkeit einer vorgeschlagenen, mechanistisch und funktionell ähnlichen Prüfmethode bewertet werden kann. Sie umfassen (i) wesentliche Elemente der Prüfmethode; (ii) ein Mindestverzeichnis von Referenzchemikalien, ausgewählt aus den Chemikalien, die zum Nachweis der akzeptablen Leistung der validierten Referenzmethode verwendet werden; und (iii) je nach den für die validierte Referenzmethode erzielten Ergebnissen die vergleichbaren Zuverlässigkeits- und Genauigkeitswerte, die die vorgeschlagene Prüfmethode bei der Bewertung anhand des Mindestverzeichnisses von Referenzchemikalien demonstrieren sollte.

Mehrkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens ≥ 10 % w/w und < 80 % w/w vorliegt. Ein mehrkomponentiger Stoff ist das Ergebnis eines Herstellungsprozesses. Der Unterschied zwischen einem Gemisch und einem mehrkomponentigen Stoff besteht darin, dass ein Gemisch durch die Mischung von zwei oder mehr Stoffen ohne chemische Reaktion entsteht. Ein mehrkomponentiger Stoff wird durch eine chemische Reaktion gebildet.

NC: Nicht hautätzend

OD: Optische Dichte.

PK: Positivkontrolle, ein Replikat, das alle Komponenten eines Prüfsystems enthält und mit einem Stoff behandelt wird, der bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Um sicherzustellen, dass Abweichungen bei der Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

Prüflauf: Eine einzelne Prüfchemikalie, die gleichzeitig an mindestens drei Replikat-Hautstücken geprüft wird.

Relevanz: Dieser Begriff bezieht sich auf das Verhältnis zwischen der Prüfmethode und der betreffenden Wirkung und auf die Frage, ob er aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Er beschreibt das Ausmaß, in dem die Prüfmethode die untersuchte biologische Wirkung korrekt misst oder vorhersagt. Die Relevanz schließt eine Beurteilung der Genauigkeit (Übereinstimmung) einer Prüfmethode ein (20).

Sensitivität: Der Anteil aller positiven/wirkenden Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft werden. Die Sensitivität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (20).

Spezifizität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (20).

Stoff: Ein chemisches Element und seine Verbindungen in natürlicher Form oder gewonnen durch ein Herstellungsverfahren, einschließlich der zur Wahrung seiner Stabilität notwendigen Zusatzstoffe und der durch das angewandte Verfahren bedingten Verunreinigungen, aber mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können.

TER (Transcutaneous Electrical Resistance): Ein Maß für den elektrischen Widerstand der Haut, angegeben als Widerstand in Ohm. Ein einfaches und stabiles Verfahren zur Beurteilung der Barriere funktion, indem der Ionendurchtritt durch die Haut mithilfe einer Wheatstone-Messbrücke aufgezeichnet wird.

Übereinstimmung: Die Übereinstimmung ist ein Maß der Leistung einer Prüfmethode für Prüfverfahren mit kategorialen Ergebnissen und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird gelegentlich gleichbedeutend mit Genauigkeit verwendet und als Anteil aller geprüften Chemikalien definiert, die korrekt als positiv oder negativ eingestuft werden. Die Übereinstimmung hängt in hohem Maße von der Prävalenz positiver Ergebnisse bei den Typen der untersuchten Prüfchemikalien ab (20).

UVCB: Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Zuverlässigkeit: Maß der Verlässlichkeit der Reproduzierbarkeit der Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien in einem bestimmten Zeitintervall bei einheitlichem Protokoll. Die Zuverlässigkeit wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit bewertet (20).“

(6) In Teil B erhält Kapitel B.40bis folgende Fassung:

„B.*40bis* ***IN-VITRO*-PRÜFUNG AUF HAUTÄTZENDE WIRKUNG: PRÜFMETHODE MIT REKONSTRUIERTER HUMANER EPIDERMIS (RHE)**

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode (PM) entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 431 (2016). Als Hautverätzung wird das Auslösen einer irreversiblen Hautschädigung, d. h. einer sichtbaren, bis in das Corium reichenden Nekrose der Epidermis nach Applikation einer Prüfchemikalie [im Sinne der Definition des Global harmonisierten Systems zur Einstufung und Kennzeichnung von Gefahrstoffen der UN (GHS) (1) und der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (CLP-Verordnung) ([1])] bezeichnet. Diese aktualisierte Prüfmethode B.40bis besteht in einem *In-vitro*-Verfahren zur Identifizierung nicht ätzender und ätzender Stoffe und Gemische nach dem UN GHS und der CLP-Verordnung. Sie ermöglicht auch eine partielle Unterkategorisierung ätzender Chemikalien.

2. Die Bewertung des Hautverätzungspotenzials von Chemikalien erfolgte in der Regel unter Verwendung von Labortieren (PM B.4, entsprechend OECD TG 404, ursprünglich angenommen im Jahr 1981 und geändert in den Jahren 1992, 2002 und 2015) (2). Neben dieser Prüfmethode B.40bis wurden noch zwei weitere *In-vitro*-Prüfmethoden zur Untersuchung des Verätzungspotenzials von Chemikalien als Prüfmethode B.40 (entsprechend OECD TG 430) (3) und PM B.65 (entsprechend OECD TG 435) validiert und angenommen (4). Außerdem wurde die *In-vitro*-Prüfmethode B.46 (entsprechend OECD TG 439) (5) als Methode zur Untersuchung des Hautreizungspotenzials angenommen. In einem OECD-Leitliniendokument über integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA = Integrated Approaches to Testing and Assessment) zur Untersuchung von Hautverätzungen und -reizungen werden mehrere Module beschrieben, in denen Informationsquellen und Analyseinstrumente zu Gruppen zusammengefasst werden. Sie enthalten i) Leitlinien dazu, wie vorhandene Daten aus Untersuchungen und aus anderen Quellen integriert und verwendet werden können, um das Hautreizungs- und das Hautverätzungspotenzial von Chemikalien zu bewerten, und ii) einen Vorschlag zur Durchführung ggf. erforderlicher weiterer Untersuchungen (6).

3. Mit dieser Prüfmethode werden Hautverätzungen mit dem Endpunkt der menschlichen Gesundheit untersucht. Für die Prüfmethode wird (aus menschlichen, nicht transformierten Keratinozyten) rekonstruierte humane Epidermis (RhE) verwendet, die die histologischen, morphologischen, biochemischen und physiologischen Eigenschaften der menschlichen Oberhaut, d. h. der Epidermis weitgehend widerspiegelt. Die entsprechende OECD-Prüfrichtlinie wurde ursprünglich 2004 angenommen und 2013 unter Berücksichtigung weiterer Prüfmethoden unter Verwendung der RhE-Modelle und der Möglichkeit zur Verwendung der Methoden zur Unterstützung der Unterkategorisierung ätzender Chemikalien zunächst im Jahr 2013 und anschließend nochmals im Jahr 2015 unter Verweis auf das IATA-Leitliniendokument und unter Einführung der Verwendung eines alternativen Verfahrens zur Messung der Viabilität aktualisiert.

4. Bei dieser Prüfmethode kommen vier validierte im Handel erhältliche RhE-Modelle zum Einsatz. Nach Vorvalidierungsstudien (7) wurde an zwei dieser im Handel erhältichen Prüfmodelle – dem EpiSkin™-Standardmodell (SM) und dem EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (im Folgenden ‚validierte Referenzmodelle' (VRM) – eine förmliche Validierungsstudie zur Bewertung der Hautverätzung (8)(9)(10) durchgeführt (11) (12). Die Ergebnisse dieser Studien führten zur Empfehlung, dass die beiden genannten VRM für rechtliche Zwecke zur Unterscheidung zwischen ätzenden (C) und nicht ätzenden (NC) Stoffen verwendet werden können und dass mit EpiSkin™ zudem die Unterkategorisierung ätzender Stoffe unterstützt werden kann (13)(14)(15). Zwei weitere im Handel erhältliche *In-vitro*-Verfahren auf der Grundlage von RhE-Modellen zeigten nach Validierungsstudien auf Basis der Leistungsstandards ähnliche Ergebnisse wie das VRM EpiDerm™ (16)(17)(18): die RhE-Modelle SkinEthic™ ([2]) und epiCS® (früher auch als EST-1000 bezeichnet), die auch für rechtliche Zwecke zur Unterscheidung zwischen ätzenden und nicht ätzenden Stoffen verwendet werden können (19)(20). Post-Validierungsstudien der Hersteller des RhE-Modells in den Jahren 2012 bis 2014 mit einem verbesserten Protokoll, bei dem Interferenzen durch unspezifische MTT-Reduktion durch die Prüfchemikalien korrigiert werden, ermöglichten zum einen eine bessere Unterscheidung zwischen den Wirkungen C und NC und unterstützten zum anderen die Unterkategorisierung ätzender Chemikalien (21)(22). Die in der Post-Validierung mit dem EpiDerm™ SCT, der SkinEthic™ RHE und EpiCS® gewonnenen Daten wurden weiteren statistischen Analysen unterzogen, um alternative Vorhersagemodelle mit besserer Vorhersagefähigkeit für Unterkategorisierungen zu entwickeln (23).

([1]) Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

([2]) Die Abkürzung RhE (Reconstructed human Epidermis = rekonstruierte humane Epidermis) wird für alle auf der RhE-Technologie beruhenden Modelle verwendet. In Verbindung mit dem SkinEthic™-Modell wird die Abkürzung RHE im gleichen Sinn verwendet, jedoch ausschließlich in Großbuchstaben geschrieben, da sie in dieser Schreibung Bestandteil des Namens ist, unter dem diese spezifische Prüfmethode auf dem Markt angeboten wird.

5. Bevor eine vorgeschlagene ähnliche oder modifizierte *In-vitro*-RhE-Prüfmethode zur Untersuchung auf Hautverätzungen außer den VRM für rechtliche Zwecke verwendet werden kann, sollten nach den Anforderungen der nach den Grundsätzen des OECD-Leitliniendokuments Nr. 34 (25) entwickelten Leistungsstandards (24) die Verlässlichkeit, die Relevanz (Genauigkeit) und die Grenzen des Verfahrens für den vorgeschlagenen Verwendungszweck bestimmt werden, um sicherzustellen, dass es mit den VRM vergleichbar ist. Die gegenseitige Anerkennung der Daten wird erst dann garantiert, wenn vorgeschlagene neue oder aktualisierte Prüfmethoden auf der Grundlage der Leistungsstandards überprüft und in die entsprechende Prüfrichtlinie aufgenommen wurden. Die in diese Prüfrichtlinie aufgenommenen Prüfmodelle können verwendet werden, um sowohl länderbezogene Anforderungen an die Prüfergebnisse der *In-vitro*-Prüfmethode zur Untersuchung von Hautverätzungen zu erfüllen als auch die gegenseitige Anerkennung von Daten beanspruchen zu können.

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

6. Es gelten die Begriffsbestimmungen in Anlage 1.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

7. Diese Prüfmethode ermöglicht die Identifizierung nicht ätzender und ätzender Stoffe und Gemische nach dem UN GHS und der CLP-Verordnung. Außerdem unterstützt diese Prüfmethode die Zuordnung ätzender Stoffe und Gemische zur optionalen Unterkategorie 1A nach Maßgabe des UN GHS (1) sowie eine Kombination der Unterkategorien 1B und 1C (21)(22)(23). Eine Einschränkung bei dieser Prüfmethode besteht darin, dass bei Hautverätzungen wegen der begrenzten Auswahl gut bekannter Chemikalien der Unterkategorie 1C in *In-vivo*-Untersuchungen nicht zwischen den Unterkategorien 1B und 1C nach dem UN GHS und der CLP-Verordnung unterschieden werden kann. Mithilfe der Prüfmodelle EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE und epiCS® können Unterkategorisierungen (d. h. Unterscheidungen zwischen 1A und 1B-und-1C gegenüber NC) vorgenommen werden.

8. In der Validierung zur Unterstützung der in diese Prüfmethode einbezogenen Prüfmodelle zur Identifizierung nicht ätzender und ätzender Chemikalien wurden zahlreiche Chemikalien (in erster Linie Stoffe) geprüft, und die empirische Datenbank der Validierungsstudie umfasste 60 Chemikalien aus zahlreichen Chemikalienklassen (8)(9)(10). Zum Nachweis der Sensitivität, der Spezifizität, der Genauigkeit und der laborinternen Reproduzierbarkeit des Versuchs zur Unterkategorisierung haben die Entwickler der Prüfungen Untersuchungen durchgeführt; die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden von der OECD geprüft (21)(22)(23). Auf der Grundlage der insgesamt verfügbaren Daten ist festzustellen, dass die Prüfmethode bei zahlreichen Chemikalienklassen und Aggregatzuständen (u. a. Flüssigkeiten, halbfeste Stoffe, Feststoffe und Wachse) anwendbar ist. Flüssigkeiten können wässrig oder nicht wässrig und Feststoffe in Wasser löslich oder unlöslich sein. Sofern möglich, sollten Feststoffe vor der Applikation zu Feinpulver gemahlen werden; eine weitere Vorbehandlung der Probe ist nicht nötig. Wenn nachgewiesen werden kann, dass die in diese Prüfmethode einbezogenen Prüfmodelle bei einer bestimmten Kategorie von Prüfchemikalien nicht anwendbar sind, sollten sie bei dieser Kategorie von Prüfchemikalien nicht verwendet werden. Diese Prüfmethode kann jedoch nicht nur bei Stoffen verwendet werden, sondern wird auch als für Gemische geeignet betrachtet. Da Gemische allerdings vielfältigen Kategorien zuzurechnen sein und unterschiedliche Zusammensetzungen haben können, und da gegenwärtig nur begrenzte Informationen über die Prüfung von Gemischen verfügbar sind, sollten Prüfmethoden, bei denen nachgewiesen werden kann, dass sie für eine bestimmte Kategorie von Gemischen nicht geeignet sind (beispielsweise durch ein Verfahren entsprechend dem in (26) vorgeschlagenen Verfahren), für die betreffende Kategorie von Gemischen nicht verwendet werden. Bevor die Prüfmethode für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regulierungszweck verwendet wird, ist zu prüfen, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefern kann und, wenn dem so ist, warum. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs rechtlich vorgeschrieben ist. Gase und Aerosole wurden bislang noch nicht in Validierungsstudien bewertet (8)(9)(10). Obwohl deren Prüfung mit der RhE-Technologie prinzipiell vorstellbar ist, erlaubt die vorliegende Prüfmethode das Untersuchen von Gasen und Aerosolen nicht.

9. Prüfchemikalien, die Licht im selben Spektrum absorbieren können wie MTT-Formazan, und Prüfchemikalien, die in der Lage sind, den lebenswichtigen Farbstoff MTT zu reduzieren (zu MTT-Formazan), können die Messungen der Gewebeviabilität stören und erfordern die Verwendung geeigneter Kontrollen zur Korrektur. Die Art der möglicherweise erforderlichen geeigneten Kontrollen hängt von der Art der durch die Prüfchemikalie ausgelösten Interferenzen und vom Verfahren zur Messung von MTT-Formazan ab (Nummern 25-31).

10. Diese Prüfmethode vermittelt keine geeigneten Informationen über Hautreizungen; mit PM B.46, die auf demselben RhE-Prüfsystem (allerdings mit einem anderen Protokoll) beruht, werden jedoch gezielt die gesundheitlichen Auswirkungen von Hautreizungen *in vitro* untersucht (5). Eine umfassende Evaluierung lokaler Auswirkungen auf die Haut nach einer einmaligen dermalen Exposition ist dem OECD-Leitliniendokument über integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA) zu entnehmen (6). Dieser IATA-Ansatz umfasst die Durchführung von *In-vitro*-Prüfungen auf hautätzende Wirkung (wie sie in dieser Methode beschrieben werden) und auf Hautreizungen, bevor Prüfungen an lebenden Tieren in Betracht gezogen werden. Die Verwendung menschlicher Haut unterliegt anerkanntermaßen ethischen Überlegungen und Bedingungen auf nationaler und internationaler Ebene.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

11. Die Prüfchemikalie wird oberflächlich auf ein dreidimensionales RhE-Modell aufgetragen, das aus nicht veränderten humanen epidermalen Keratinozyten besteht, die zu einem mehrschichtigen, ausdifferenzierten Modell humaner Epidermis kultiviert wurden. Das Modell besteht aus geordneten Basal-, Stachel- und Körnerzellschichten und einer mehrlagigen Hornschicht (*stratum corneum*), die interzelluläre lamellare Fettschichten enthält, deren dominierende Lipidklassen dem *in vivo* gefundenen Lipidmuster entsprechen.

12. Diese RhE-Prüfmethode basiert auf der Voraussetzung, dass ätzende Chemikalien in der Lage sind, durch Diffusion oder Erosion die Hornhaut zu durchdringen, und darüber hinaus eine zytotoxische Wirkung auf die darunter liegenden Zellschichten ausüben. Die Zellviabilität wird durch Enzymkonversion des Vitalfarbstoffs MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, Thiazolyl-Blau-Tetrazoliumbromid; CAS-Nummer 298-93-1] zu einem blauen Formazan-Salz gemessen, das nach seiner Extraktion aus Geweben quantifiziert wird (27). Ätzende Chemikalien werden anhand ihrer Fähigkeit erkannt, die Zellviabilität unter vorgegebene Schwellenwerte zu senken (Nummern 35 und 36). Die Prüfmethode auf der Grundlage von RhE-Modellen zur Untersuchung von Hautverätzungen hat sich bei der Prüfung von Kaninchen nach PM B.4 (2) als für die Vorhersage von In-vivo-Hautkorrosionswirkungen geeignet erwiesen.

NACHWEIS DER LEISTUNGFÄHIGKEIT

13. Vor der routinemäßigen Anwendung eines der vier validierten RhE-Prüfmodelle nach dieser Prüfmethode sollten Labors die erforderliche technische Befähigung durch eine ordnungsgemäße Klassifizierung der zwölf in Tabelle 1 empfohlenen Leistungsstoffe nachweisen. Bei Verwendung der Methode zur Unterklassifizierung konnten zudem die richtigen Unterkategorien nachgewiesen werden. Wenn ein dort genannter Stoff nicht verfügbar ist bzw. wenn dies gerechtfertigt ist, kann ein anderer Stoff verwendet werden, für den geeignete *In-vivo*- und *In-vitro*-Referenzdaten verfügbar sind (z. B. aus der Liste der Referenzchemikalien (24)), sofern die in Tabelle 1 beschriebenen Auswahlkriterien angewendet werden.

Tabelle 1

Liste der Leistungsstoffe [1]

Stoff	CAS-Nr.	Chemikalienklasse [2]	UN-GHS-/CLP-Kat. nach *In-vivo*-Ergebnissen [3]	VRM Kat. nach *In-vitro*-Ergebnissen [4]	MTT-Reduktionsmittel [5]	Aggregat-zustand
Unterkategorie 1A *In vivo* ätzende Chemikalien						
Bromessigsäure	79-08-3	Organische Säure	1A	(3) 1A	—	S
Bortrifluoriddihydrat	13319-75-0	Anorganische Säure	1A	(3) 1A	—	L
Phenol	108-95-2	Phenol	1A	(3) 1A	—	S
Dichloracetylchlorid	79-36-7	Elektrophil	1A	(3) 1A	—	L
Kombination von *in vivo* ätzenden Chemikalien der Unterkategorien 1B-und-1C						
Glyoxylsäure-Monohydrat	563-96-2	Organische Säure	1B-und-1C	(3) 1B-und-1C	—	S

Stoff	CAS-Nr.	Chemikalienklasse ([2])	UN-GHS-/CLP-Kat. nach *In-vivo*-Ergebnissen ([3])	VRM Kat. nach *In-vitro*-Ergebnissen ([4])	MTT-Reduktionsmittel ([5])	Aggregat-zustand
Unterkategorie 1A *In vivo* ätzende Chemikalien						
Milchsäure	598-82-3	Organische Säure	1B-und-1C	(3) 1B-und-1C	—	L
Ethanolamin	141-43-5	Organische Base	1B	(3) 1B-und-1C	Y	Viskose
Chlorwasserstoffsäure (14,4 %)	7647-01-0	Anorganische Säure	1B-und-1C	(3) 1B-und-1C	—	L
In Vivo nicht ätzende Chemikalien						
Phenethylbromid	103-63-9 CIPAC-Nr.	Elektrophil	NC	(3) NC	Y	L
4-Amino-1,2,4-triazol	584-13-4	Organische Base	NC	(3) NC	—	S
4-(Methylthio)-Benzaldehyd	3446-89-7	Elektrophil	NC	(3) NC	Y	L
Laurinsäure	143-07-7	Organische Säure	NC	(3) NC	—	S

Abkürzungen: CAS-Nr. (CAS Registry Number = CAS-Registrierungsnummer); VRM = validierte Referenzmethode; NC = nicht ätzend; Y = Ja; S = fest; L = flüssig.

([1]) Die Leistungsstoffe wurden zunächst nach ätzenden und nicht ätzenden Stoffen, danach nach Unterkategorien ätzender Stoffe und schließlich nach Chemikalienklassen sortiert und unter den in den ECVAM-Validierungsstudien zur Bewertung von EpiSkin™ und EpiDerm™ (8) (9) (10) sowie aufgrund von Post-Validierungsstudien auf der Grundlage von Daten ausgewählt, die von den Entwicklern von EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ und epiCS® (23) bereitgestellt wurden. Wenn nicht anderweitig angegeben, wurden die Stoffe in der Reinheit geprüft, in der sie im Handel gekauft wurden (8)(10). Die Auswahl beinhaltet nach Möglichkeit Stoffe, die (i) repräsentativ für die Spanne der Ätzwirkungen sind (z. B. nicht ätzend, schwach ätzend usw. bis hin zu stark ätzend), die mit den VRM gemessen oder vorhergesagt werden können; (ii) repräsentativ für die in den Validierungsstudien verwendeten Chemikalienklassen sind; (iii) durch gut definierte chemische Strukturen gekennzeichnet sind; (iv) mit der VRM reproduzierbare Ergebnisse induzieren; (v) bei der *In-vivo* -Referenzprüfmethode klare Ergebnisse induzieren; (vi) im Handel erhältlich sind; (vii) nicht mit nicht tragbaren Entsorgungskosten verbunden sind.

([2]) Von Barratt u. a. zugewiesene Chemikalienklasse (8).

([3]) Den UN-GHS-/CLP-Kategorien 1A, 1B und 1C entsprechen die UN-Verpackungsgruppen I, II und III.

([4]) Die in dieser Tabelle angegebenen *In-vitro*-Vorhersagen aufgrund von VRM wurden in von den Entwicklern der Prüfmethoden durchgeführten Post-Validierungsprüfungen mit den Prüfmodellen EpiSkin™ und EpiDerm™ (VRM) ermittelt.

([5]) Bei den in den ECVAM-Validierungsstudien zu Hautverätzungen ermittelten Viabilitätswerten wurden keine Korrekturen unter Berücksichtigung der direkten MTT-Reduzierung vorgenommen. (In den Validierungsstudien wurden keine Kontrollen mit abgetötetem Gewebe durchgeführt.) Die in dieser Tabelle genannten und von den Entwicklern der Prüfmethode generierten Post-Validierungsdaten beruhen jedoch auf geeigneten Kontrollen (23).

14. Im Rahmen des Nachweises der Leistungsfähigkeit sollte der Benutzer die vom Hersteller des Hautmodells spezifizierten Barriereeigenschaften der Gewebe nach Erhalt überprüfen. Dies ist besonders dann wichtig, wenn die Gewebe über große Entfernungen/Zeiträume transportiert werden. Sobald eine Methode erfolgreich etabliert und ihre Leistungsfähigkeit demonstriert wurde, ist diese Überprüfung nicht mehr routinemäßig erforderlich. Allerdings empfiehlt es sich auch bei routinemäßig angewandten Prüfmethoden, die Barriereeigenschaften in regelmäßigen Abständen zu kontrollieren.

VERFAHREN

15. Im Folgenden werden die Elemente und die Verfahren der in dieser Prüfmethode verwendeten RhE-Prüfmodelle zur Bewertung von Hautverätzungen allgemein beschrieben. Die als zur Verwendung im Rahmen dieser Prüfmethode wissenschaftlich fundiert bewerteten und unterstützten RhE-Modelle (d. h. die Modelle EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE und epiCS®) (16)(17)(19)(28)(29)(30)(31)(32)(33) sind im Handel erhältlich. Standardarbeitsanweisungen (SOPs) für diese vier RhE-Modelle sind verfügbar (34)(35)(36)(37), und die jeweiligen wesentlichen Elemente der Prüfmethoden werden in Anlage 2 kurz beschrieben. Bei der Einführung und Verwendung eines dieser Modelle im Labor sollten die relevanten SOPs berücksichtigt werden. Die vier RhE-Prüfmodelle dieser Prüfmethode sollten die folgenden Anforderungen erfüllen:

ELEMENTE DER RHE-PRÜFMETHODE

Allgemeine Bedingungen

16. Die Epithelschicht sollte aus normalen menschlichen Keratinozyten gebildet werden. Unter der funktionsfähigen Hornschicht (*stratum corneum*) sollten mehrere Lagen lebensfähiger Epithelzellen (Basalzellschicht, *stratum spinosum, stratum granulosum*) vorhanden sein. Die Hornschicht sollte mehrlagig sein und das zur Erzeugung einer funktionsfähigen Barriere essenzielle Lipidprofil aufweisen und muss robust genug sein, um das schnelle Eindringen zytotoxischer Referenzchemikalien wie Natriumdodecylsulfat (SDS) oder Triton X-100 zu verhindern. Die Barrierefunktion kann entweder durch Bestimmung der Konzentration, bei der eine Referenzchemikalie die Viabilität der Gewebe nach einer vorgegebenen Expositionsdauer um 50 % verringert (IC_{50}), oder durch die Bestimmung der Expositionszeit bewertet werden, die erforderlich ist, um die Zellviabilität bei Anwendung der Referenzchemikalie in einer vorgegebenen festen Konzentration um 50 % zu reduzieren (ET_{50}) (Nummer 18). Die Rückhalteeigenschaften des RhE-Modells müssen ausschließen, dass Material rund um die Hornschicht in lebensfähiges Gewebe eindringt und die Modellierung der Hautexposition beeinträchtigt. Das RhE-Modell sollte nicht mit Bakterien, Viren, Mykoplasma oder Pilzen kontaminiert sein.

Funktionale Bedingungen

Viabilität

17. Die Größenordnung der Viabilität der Gewebe wird mit der MTT-Prüfung bestimmt (27). Die lebensfähigen Zellen des RhE-Gewebemodells reduzieren den lebenswichtigen Farbstoff MTT zu einem blauen MTT-Formazan-Niederschlag, der dann mit Isopropanol (oder einem ähnlichen Lösungsmittel) aus dem Gewebe extrahiert wird. Die optische Dichte (OD) des Extraktionslösungsmittels allein sollte ausreichend gering sein, d. h. OD < 0,1. Das extrahierte MTT-Formazan kann durch eine Standard-(OD)-Absorptionsmessung oder mit einem HPLC/UPLC-Spektrometrieverfahren (38) quantifiziert werden. Die Anwender des RhE-Modells sollten sicherstellen, dass jede Charge des verwendeten Modells die vorgegebenen Kriterien für die Negativkontrolle erfüllt. Der Entwickler/Hersteller des Hautmodells sollte eine Akzeptanzspanne (oberer und unterer Grenzwert) für die OD-Werte der Negativkontrolle festlegen. Die Akzeptanzspanne der OD-Werte der Negativkontrolle für die vier validierten RhE-Prüfmodelle dieser Prüfmethode sind Tabelle 2 zu entnehmen. Bei Durchführung einer HPLC/UPLC-Spektrophotometrie sollten die in Tabelle 2 genannten OD-Spannen der Negativkontrolle als Akzeptanzkriterium für die Negativkontrolle verwendet werden. Es sollte dokumentiert werden, dass die mit der Negativkontrolle behandelten Gewebe über die gesamte Dauer der Exposition stabil bleiben (bzw. vergleichbare OD-Messungen ergeben).

Tabelle 2

Akzeptanzspannen für OD-Werte der Negativkontrolle zur Kontrolle der Chargenqualität

	Untere Akzeptanzgrenze	Obere Akzeptanzgrenze
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

Barrierefunktion

18. Das *stratum corneum* und die Zusammensetzung seiner Fette sollten das schnelle Eindringen bestimmter zytotoxischer Referenzchemikalien wie z. B. SDS oder Triton X-100 verhindern. Dies wird durch die Ermittlung von IC_{50} oder ET_{50} bestimmt (Tabelle 3). Die Barrierefunktion der einzelnen Chargen des verwendeten RhE-Modells sollte nach der Lieferung der Gewebe an den Endverwender vom Entwickler/Hersteller des RhE-Modells nachgewiesen werden (Nummer 21).

Morphologie

19. Die histologische Untersuchung des RhE-Modells sollte unter Nachweis einer aus mehreren Lagen bestehenden und der menschlichen Hornschicht (*epidermis*) ähnelnden Struktur mit *stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum* und *stratum corneum* erfolgen; das Modell sollte ein Lipidprofil ähnlich dem Lipidprofil der menschlichen Epidermis aufweisen. Die histologische Untersuchung der einzelnen zum Nachweis einer geeigneten Morphologie der Gewebe verwendeten Chargen des RhE-Modells sollte jeweils nach der Lieferung der Gewebe an den Endverwender vom Entwickler/Hersteller des RhE-Modells nachgewiesen werden (Nummer 21).

Reproduzierbarkeit.

20. Die Anwender der Prüfmethode sollten die Reproduzierbarkeit der Prüfmethoden mit den Positiv- und den Negativkontrollen über längere Zeit nachweisen. Außerdem sollte die Prüfmethode nur dann verwendet werden, wenn der Entwickler/Hersteller des RhE-Modells Daten vorlegt, die die Reproduzierbarkeit mit ätzenden und mit nicht ätzenden Chemikalien z. B. aus der Liste der Leistungsstoffe (Tabelle 1) über längere Zeit belegen. Bei Verwendung einer Prüfmethode zur Unterkategorisierung sollte zudem die Reproduzierbarkeit in Bezug auf Unterkategorien nachgewiesen werden.

Qualitätskontrolle (QK)

21. Das RhE-Modell sollte nur dann verwendet werden, wenn der Entwickler/Hersteller nachweist, dass jede Charge des verwendeten Hautmodells bestimmten Freigabekriterien genügt, von denen die Kriterien der *Viabilität* (Nummer 17), der *Barrierefunktion* (Nummer 18) und der *Morphologie* (Nummer 19) die wichtigsten sind. Diese Daten werden den Anwendern der Prüfmethode zur Verfügung gestellt werden, damit diese sie in den Prüfbericht aufnehmen können. Nur mit freigegebenen Gewebechargen erzielte Ergebnisse können für eine zuverlässige Vorhersage für die Einstufung von Verätzungen akzeptiert werden. Der Entwickler/Hersteller des Hautmodells (oder – bei Verwendung eines hauseigenen Modells – der Prüfer) legt eine Akzeptanzspanne (oberer und unterer Grenzwert) für IC_{50} bzw. ET_{50} fest. Die Akzeptanzspannen der vier validierten Prüfmodelle sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3

Chargenfreigabekriterien im Rahmen der Qualitätskontrolle

	Untere Akzeptanzgrenze	Obere Akzeptanzgrenze
EpiSkin™ (SM) (18-stündige Behandlung mit SDS) (33)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (34)	ET50 = 4,0 h	ET50 = 8,7 h
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET50 = 4,0 h	ET50 = 10,0 h
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET50 = 2,0 h	ET50 = 7,0 h

Applikation der Prüf- und Kontrollchemikalien

22. Für jede Prüfchemikalie und für die Kontrollen sollten für jeden Expositionszeitraum mindestens zwei Gewebereplikate verwendet werden. Bei flüssigen und festen Chemikalien sollte eine ausreichende Menge der Prüfchemikalie gleichmäßig auf die gesamte Oberfläche der Epidermis aufgetragen werden; überschüssige Dosen sind zu vermeiden, d. h. es sollten mindestens 70 µl/cm^2 oder 30 mg/cm^2 verwendet werden. Je nach Modell sollte die Epidermis-Oberfläche vor der Applikation fester Chemikalien mit deionisiertem oder destilliertem Wasser angefeuchtet werden, um guten Hautkontakt zu gewährleisten (34)(35)(36)(37). Feststoffe sollten nach Möglichkeit als Feinpulver geprüft werden. Es ist eine für die Prüfchemikalie geeignete Applikationsmethode zu wählen (siehe z. B. Nummern 34-37). Am Ende des Expositionszeitraums sollte die Prüfchemikalie mit einer wässrigen

Pufferlösung oder 0,9 % NaCl von der Epidermis abgewaschen werden. Je nachdem, welches der vier validierten RhE-Prüfmodelle verwendet wird, werden pro Prüfchemikalie zwei oder drei Expositionszeiträume verwendet (für alle vier validen RhE-Modelle: 3 Minuten und 1 Stunde; bei EpiSkin™ eine zusätzliche Expositionszeit von nochmals 4 Stunden). Je nach verwendetem RhE-Prüfmodell und je nach bewertetem Expositionszeitraum kann die Inkubationstemperatur während der Exposition zwischen der Raumtemperatur und 37 °C liegen.

23. Bei jeder Studie sollten gleichzeitig Negativkontrollen und Positivkontrollen (PK) verwendet werden, um nachweisen zu können, dass die Viabilität (mit der NK), die Barrierefunktion und die daraus resultierende Empfindlichkeit der Gewebe (mit der PK) innerhalb einer vorgegebenen historischen Akzeptanzspanne liegen. Als PK-Chemikalien werden je nach verwendetem RhE-Modell Eisessigsäure oder 8N KOH vorgeschlagen. 8N KOH ist ein direktes MTT-Reduktionsmittel, für das möglicherweise geeignete Kontrollen benötigt werden wie in den Nummern 25 und 26 beschrieben. Für die Negativkontrollen wird 0,9 %ige (w/v) NaCl-Lösung oder Wasser empfohlen.

Zellviabilitätsmessungen

24. Die MTT-Prüfung sollte als quantitative Methode zur Messung der Zellviabilität nach dieser Prüfmethode verwendet werden (27). Die Gewebeprobe wird für 3 Stunden in eine MTT-Lösung mit geeigneter Konzentration (z. B. 0,3 oder 1 mg/ml) gelegt. Der blaue Formazan-Niederschlag wird sodann mit Hilfe eines Lösungsmittels (z. B. Isopropanol, Säure-Isopropanol) aus dem Gewebe extrahiert, und die Formazankonzentration wird durch Bestimmung des OD-Werts bei 570 nm innerhalb einer Filter-Bandbreite von maximal ± 30 nm oder mit einem HPLC/UPLC-Spektrophotometrieverfahren gemessen (Nummern 30 und 31) (38).

25. Prüfchemikalien können die MTT-Untersuchung durch direkte Reduzierung des MTT zu blauem Formazan und/oder Farbinterferenzen stören, wenn die Prüfchemikalie an sich oder infolge von Behandlungsverfahren in derselben OD-Spanne wie Formazan (570 ± 30 nm, hauptsächlich blaue und violette Chemikalien) absorbiert. Zusätzliche Kontrollen (z. B. die nicht spezifische MTT-Reduktionskontrolle (NSMTT) oder die nicht spezifische Farbkontrolle (NSC) sollten verwendet werden, um eine potenzielle Interferenz aufgrund dieser Prüfchemikalien zu erkennen und zu korrigieren (Nummern 26 bis 30). Dies ist besonders dann wichtig, wenn eine bestimmte Prüfchemikalie nicht vollständig aus dem Gewebe ausgewaschen wurde oder die Epidermis durchdringt und daher bei Durchführung der MTT-Viabilitätsprüfung auch in den Geweben enthalten ist. Für eine genaue Beschreibung der richtigen Durchführung der Korrektur der direkten MTT-Reduktion und der Interferenzen durch Färbemittel siehe die Standardarbeitsanweisungen für die Prüfmodelle (34) (35) (36) (37).

26. Um direkte MTT-Reduktionsmittel zu identifizieren, sollten die Prüfchemikalien jeweils zu frisch hergestelltem MTT-Medium hinzugegeben werden (34) (35) (36) (37). Wenn sich das MTT-Gemisch mit der Prüfchemikalie blau/violett verfärbt, ist davon auszugehen, dass die Prüfchemikalie das MTT direkt reduziert; anschließend sollte unabhängig von der Durchführung der Standardabsorptions-(OD-)Messung oder einer HPLC/UPLC-Spektrophotometrie eine weitere Funktionsprüfung vorgenommen werden. Bei dieser zusätzlichen Funktionsprüfung werden abgetötete Gewebe mit nur noch residualer metabolischer Aktivität eingesetzt, die die Prüfchemikalie in ähnlichem Umfang wie lebensfähige Gewebe absorbieren. Jede MTT reduzierende Chemikalie wird auf mindestens zwei abgetötete Gewebereplikate pro Expositionszeitraum aufgetragen, die der vollständigen Prüfung auf hautätzende Wirkungen unterzogen werden. Anschließend wird die tatsächliche Viabilität des Gewebes als Prozentanteil der bei lebenden Geweben nach Exposition gegenüber dem MTT-Reduktionsmittel gemessenen Viabilität abzüglich des Prozentanteils der nicht spezifischen MTT-Reduktion durch dasselbe MTT-Reduktionsmittel bei abgetöteten Geweben bezogen auf die gleichzeitig mit der zu korrigierenden Prüfung durchgeführte Negativkontrolle (%NSMTT) berechnet.

27. Um potenzielle Interferenzen durch Prüffarbstoffe oder durch Prüfchemikalien zu ermitteln, die sich verfärben, wenn sie mit Wasser oder mit Isopropanol in Berührung kommen, und um über die Notwendigkeit weiterer Kontrollen entscheiden zu können, sollte die Prüfchemikalie in Wasser (Umgebung während der Exposition) und/oder Isopropanol (Extraktionslösung) einer Spektralanalyse unterzogen werden. Wenn die Prüfchemikalie in Wasser und/oder Isopropanol Licht im Bereich von 570 ± 30 nm absorbiert, sollten weitere Farbkontrollen durchgeführt oder eine HPLC/UPLC-Spektrophotometrie vorgenommen werden. Im letztgenannten Fall sind diese Kontrollen nicht erforderlich (Nummern 30 und 31). Bei Durchführung der Standardabsorptions-(OD-)Messung wird jeder interferierende Prüffarbstoff auf mindestens zwei lebensfähige Gewebereplikate pro Expositionszeit aufgetragen; diese Replikate werden der vollständigen Prüfung auf Hautverätzungen unterzogen,

aber während der MTT-Inkubation nicht mit der MTT-Lösung, sondern mit einem Medium inkubiert, um eine nicht spezifische Farbkontrolle (NSC_{lebend}) herzustellen. Wegen der inhärenten Variabilität lebender Gewebe muss pro Expositionszeitraum und pro Prüffarbstoff (bei jedem Prüflauf) gleichzeitig die NSC_{lebend}-Kontrolle durchgeführt werden. Die tatsächliche Viabilität des Gewebes wird dann als Prozentanteil der ermittelten Viabilität bei lebendem Gewebe nach der Exposition gegenüber der interferierenden Prüfchemikalie und nach Inkubation mit der MTT-Lösung abzüglich des Prozentanteils der nicht spezifischen Farbe berechnet, die bei gleichzeitig mit der zu korrigierenden Prüfung untersuchten lebenden Geweben nach Exposition gegenüber der interferierenden Prüfchemikalie und nach Inkubation mit einem Medium ohne MTT entstanden ist ($\%NSC_{lebend}$).

28. Wenn festgestellt wurde, dass Prüfchemikalien sowohl eine direkte MTT-Reduktion (Nummer 26) als auch Farbinterferenzen (Nummer 27) bewirken, wird bei der Durchführung der Standardabsorptions-(OD-)Messung neben den in vorstehenden Nummern beschriebenen Kontrollen (NSMTT und NSC_{lebend}) eine dritte Kontrollreihe benötigt. Dies ist gewöhnlich bei dunklen Prüfchemikalien der Fall, die beim MTT-Versuch Interferenzen verursachen (z. B. blau, violett oder schwarz), weil deren Fähigkeit zur direkten MTT-Reduktion durch die inhärente Farbqualität dieser Chemikalien beeinträchtigt wird (Nummer 26). Diese Prüfchemikalien können Bindungen sowohl mit lebenden als auch mit abgetöteten Geweben eingehen. Daher kann bei der NSMTT-Kontrolle eine Korrektur nicht nur der potentiellen direkten MTT-Reduktion durch die Prüfchemikalie, sondern auch der Farbinterferenz infolge der Bindung der Prüfchemikalie an abgetötete Gewebe erfolgen. Dies kann eine doppelte Korrektur der Farbinterferenz zur Folge haben, da mit der NSC_{lebend}-Kontrolle bereits die Farbinterferenz aufgrund der Bindung der Prüfchemikalie an lebende Gewebe erfolgt. Um eine mögliche doppelte Korrektur von Farbinterferenzen zu vermeiden, muss eine dritte Kontrolle mit nicht spezifischen Farben mit abgetöteten Geweben ($NSC_{abgetötet}$) untersucht werden. Bei dieser zusätzlichen Kontrolle wird die Prüfchemikalie auf mindestens zwei abgetötete Gewebereplikate pro Expositionszeitraum aufgetragen, die dem vollständigen Prüfverfahren zu unterziehen sind, wobei die Gewebe jedoch während der MTT-Inkubation nicht mit der MTT-Lösung, sondern mit einem Medium inkubiert werden. Unabhängig von der Anzahl der durchgeführten unabhängigen Prüfungen/Prüfläufe ist pro Prüfchemikalie eine einzige $NSC_{abgetötet}$-Kontrolle hinreichend. Diese Kontrolle sollte jedoch gleichzeitig mit der NSMTT-Kontrolle sowie möglichst mit derselben Gewebecharge durchgeführt werden. Die tatsächliche Viabilität des Gewebes wird dann als Prozentanteil der ermittelten Viabilität bei lebendem Gewebe nach der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie abzüglich %NSMTT und abzüglich $\%NSC_{lebend}$ zuzüglich des Prozentanteils der nicht spezifischen Farbe berechnet, die nach Exposition der abgetöteten Gewebe gegenüber der interferierenden Prüfchemikalie und nach Inkubation mit einem Medium ohne MTT entstanden ist; dieser Prozentanteil wird bezogen auf die gleichzeitig mit der zu korrigierenden Prüfung untersuchte Kontrolle ($\%NSC_{abgetötet}$) ermittelt.

29. Wichtig ist die Feststellung, dass nicht spezifische MTT-Reduktionen und nicht spezifische Farbinterferenzen bei den Gewebextrakten Ergebnisse oberhalb der Linearitätsspanne des Photospektrometers begünstigen können. Daher sollte jedes Labor vor der Untersuchung von Prüfchemikalien für rechtliche Zwecke die Linearitätsspanne seines Spektrophotometers mit im Handel bezogenem MTT-Formazan (CAS-Nr. 57360-69-7) ermitteln. Insbesondere durch die Standardabsorptions-(OD-)Messung mit einem Spektrophotometer können direkte MTT-Reduktionsmittel und Farbinterferenzen verursachende Prüfchemikalien in den Fällen untersucht werden, in denen die mit einer Prüfchemikalie ermittelten und nicht um die direkte MTT-Reduktion und/oder um Farbinterferenzen korrigierten ODs der Gewebeextrakte innerhalb der Linearitätsspanne des Spektrophotometers liegen oder in denen eine Prüfchemikalie aufgrund des nicht korrigierten Prozentanteils der Viabilität bereits als hautätzend eingestuft wurde (Nummern 35 und 36). Ergebnisse bei Prüfchemikalien mit %NSMTT und/oder $\%NSC_{lebend} > 50\,\%$ der Negativkontrolle sind jedoch mit Sorgfalt zu bewerten.

30. Wenn die Ergebnisse von Prüffarbstoffen wegen übermäßiger Interferenzen beim MTT-Versuch mit der Standardabsorptions-(OD-)Messung nicht vereinbar sind, kann alternativ MTT-Formazan durch HPLC/UPLC-Spektrophotometrie gemessen werden (Nummer 31) (37). Bei der HPLC/UPLC-Spektrophotometrie kann das MTT-Formazan vor der Quantifizierung von der Prüfchemikalie getrennt werden (38). Daher werden unabhängig von der zu prüfenden Chemikalie keine NSC_{lebend}- oder $NSC_{abgetötet}$-Kontrollen benötigt, wenn eine HPLC/UPLC-Spektrophotometrie vorgenommen wird. NSMTT-Kontrollen sollten jedoch verwendet werden, wenn vermutet wird, dass eine Prüfchemikalie MTT direkt reduziert oder wenn die Farbe einer Prüfchemikalie die Beurteilung ihrer Fähigkeit zur direkten MTT-Reduktion beeinträchtigt (Nummer 26). Wenn MTT-Formazan durch HPLC/UPLC-Spektrophotometrie gemessen wird, ist der Prozentanteil der Viabilität des Gewebes als Prozentanteil der MTT-Formazan-Peak-Fläche, die mit lebenden Geweben nach Exposition gegenüber der Prüfchemikalie ermittelt wurde, bezogen auf die MTT-Formazan-Peak-Fläche der gleichzeitigen Negativkontrolle zu berechnen. Bei Prüfchemikalien, die MTT direkt reduzieren können, wird die tatsächliche Gewebeviabilität als Prozentanteil der

Gewebeviabilität von lebenden Geweben nach der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie abzüglich %NSMTT berechnet. Und schließlich ist festzustellen, dass auch direkte MTT-Reduktionsmittel (die nach der Behandlung in den Geweben gebunden sein und MTT so stark reduzieren können, dass es (bei Standard-OD-Messungen) zu ODs oder (bei der Untersuchung der Gewebeextracte durch UPLC-/HPLC-Spektrophotometrie) zu Peakflächen außerhalb der Linearitätsspanne des Spektrophotometers und zu Farbinterferenzen kommen kann) nicht bewertet werden können. Solche Fälle sind allerdings sehr selten.

31. MTT-Formazan-Messungen können bei allen Arten von Prüfchemikalien (gefärbt, nicht gefärbt, MTT-Reduktionsmittel und Mittel, die keine MTT-Reduktion bewirken) auch durch HPLC/UPLC-Spektrophotometrie vorgenommen werden (38). Wegen der Vielfalt der HPLC/UPLC-Spektrophotometriesysteme sollte die Eignung des jeweiligen HPLC/UPLC-Spektrophotometriesystems vor der Verwendung zur Quantifizierung von MTT-Formazan in Gewebextrakten durch Erfüllung der Akzeptanzkriterien für eine Reihe von Standard-Qualifikationsparametern auf der Grundlage der Branchenleitlinien der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) für die Validierung bioanalytischer Methoden nachgewiesen werden (38)(39). Diese Schlüsselparameter sowie die jeweiligen Akzeptanzkriterien sind Anlage 4 zu entnehmen. Wenn die in Anlage 4 beschriebenen Akzeptanzkriterien erfüllt sind, wird das betreffende HPLC/UPLC-Spektrophotometriesystem als geeignet für die Messung von MTT-Formazan unter den in dieser Prüfmethode beschriebenen Versuchsbedingungen betrachtet.

Akzeptanzkriterien

32. Bei allen Prüfmethoden unter Verwendung valider RhE-Modelle sollten die mit der Negativkontrolle behandelten Gewebe OD-Werte entsprechend der Qualität der Gewebe ergeben (siehe Tabelle 2) und die historisch ermittelten Grenzen nicht unterschreiten. Mit der PK, d. h. mit Eisessigsäure oder 8N KOH, behandelte Gewebe sollten unter den Bedingungen des Prüfmodells auf eine hautätzende Chemikalie reagieren können (siehe Anlage 2). Die Variabilität zwischen Gewebereplikaten für die Prüfchemikalie und/oder Kontrollchemikalien sollten innerhalb der akzeptierten Grenzen der Anforderungen des jeweiligen validen RhE-Modells liegen (siehe Anlage 2), d. h. beispielsweise die Differenz der Viabilität zwischen den beiden Gewebereplikaten sollte nicht mehr als 30 % betragen. Wenn die Negativ- oder die Positivkontrolle bei einem Prüflauf Werte außerhalb der akzeptierten Spannen ergibt, ist der Prüflauf als nicht geeignet zu betrachten und sollte wiederholt werden. Liegt die Variabilität von Prüfchemikalien außerhalb des definierten Bereichs, sollte sie nochmals geprüft werden.

Auswertung der Ergebnisse und Prädiktionsmodell

33. Die für jede Prüfchemikalie ermittelten OD-Werte sollten zur Berechnung einer prozentualen Viabilität im Vergleich zur Negativkontrolle herangezogen werden, die gleich 100 % gesetzt wird. Wenn eine HPLC/UPLC-Spektrophotometrie durchgeführt wird, ist der Prozentanteil der Viabilität des Gewebes als Prozentanteil der MTT-Formazan-Peak-Fläche, die mit lebenden Geweben nach Exposition gegenüber der Prüfchemikalie ermittelt wurde, bezogen auf die MTT-Formazan-Peak-Fläche der gleichzeitigen Negativkontrolle zu berechnen. Den folgenden Nummern 35 und 36 sind die prozentualen Schwellenwerte der Zellviabilität für die Prüfmodelle dieser Prüfmethode zu entnehmen, nach denen hautätzende von nicht hautätzenden Prüfchemikalien unterschieden werden (bzw. nach denen zwischen Unterkategorien hautätzender Chemikalien unterschieden wird). Diese Schwellenwerte sollten bei der Auswertung der Ergebnisse zugrunde gelegt werden.

34. Kann eine eindeutige Klassifizierung vorgenommen werden, so ist ein einziger, aus mindestens zwei Geweben bestehender Prüflauf ausreichend. Bei Grenzergebnissen, wie z. B. nicht übereinstimmenden Replikatmessungen, kann ein zweiter Prüflauf in Betracht gezogen werden bzw. ein dritter bei abweichenden Ergebnissen der ersten beiden Prüfläufe.

35. In der folgenden Tabelle 4 wird das Vorhersagemodell für die das Prüfmodell EpiSkin™ zur Feststellung von Hautätzungen (9)(34)(22) in Verbindung mit dem Klassifizierungssystem des UN GHS bzw. der CLP-Verordnung erläutert:

Tabelle 4

Vorhersagemodell EpiSkin™

Nach Expositionszeitpunkten (t=3, 60 und 240 Minuten) gemessene Viabilität	Zu berücksichtigende Vorhersage
< 35 % nach einer Expositionszeit von 3 min	**Hautätzend:** •Optionale Unterkategorie 1A (*)
≥ 35 % nach einer Expositionszeit von 3 min **UND** < 35 % nach einer Expositionszeit von 60 min **ODER** ≥ 35 % nach einer Expositionszeit von 60 min **UND** < 35 % nach einer Expositionszeit von 240 min	**Hautätzend:** •Eine Kombination der optionalen Unterkategorien 1B-und-1C
≥ 35 % nach einer Expositionszeit von 240 min	**Nicht hautätzend**

(*) Die zur Bewertung der Eignung der RhE-Prüfmodelle zur Unterkategorisierung generierten Daten haben gezeigt, dass etwa 22 % aller Ergebnisse der Unterkategorie 1A des Prüfmodells EpiSkin™ tatsächlich Stoffe/Gemische der Unterkategorien 1B oder 1C sein (und somit Überklassifizierungen darstellen) könnten (siehe Anlage 3).

36. Die Vorhersagemodelle der Prüfmodelle EpiDerm™ SCT (10)(23)(35), SkinEthic™ RHE (17)(18)(23)(36) und epiCS® (16)(23)(37) zur Bewertung von Hautverätzungen nach der Klassifizierung des UN GHS bzw. der CLP-Verordnung sind Tabelle 5 zu entnehmen:

Tabelle 5

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE und epiCS®

Nach Expositionszeitpunkten (t=3 und 60 Minuten) gemessene Viabilität	Zu berücksichtigende Vorhersage
SCHRITT 1 für EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE und epiCS®	
< 50 % nach einer Expositionszeit von 3 min	**Hautätzend**
≥ 50 % nach einer Expositionszeit von 3 min **UND** < 15 % nach einer Expositionszeit von 60 min	**Hautätzend**
≥ 50 % nach einer Expositionszeit von 3 min **UND**≥ 15 % nach einer Expositionszeit von 60 min	**Nicht hautätzend**
SCHRITT 2 für EpiDerm™ SCT – für Stoffe/Gemische, bei denen in Schritt 1 eine hautätzende Wirkung festgestellt wurde	
< 25 % nach einer Expositionszeit von 3 min	Optionale Unterkategorie 1A *

Nach Expositionszeitpunkten (t=3 und 60 Minuten) gemessene Viabilität	Zu berücksichtigende Vorhersage
SCHRITT 1 für EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE und epiCS®	
≥ 25 % nach einer Expositionszeit von 3 min	Eine Kombination der optionalen Unterkategorien 1B- und-1C
SCHRITT 2 für SkinEthic™ RHE – für Stoffe/Gemische, bei denen in Schritt 1 eine hautätzende Wirkung festgestellt wurde	
< 18 % nach einer Expositionszeit von 3 min	Optionale Unterkategorie 1A *
≥ 18 % nach einer Expositionszeit von 3 min	Eine Kombination der optionalen Unterkategorien 1B- und-1C
SCHRITT 2 für epiCS® – für Stoffe/Gemische, bei denen in Schritt 1 eine hautätzende Wirkung festgestellt wurde	
< 15 % nach einer Expositionszeit von 3 min	Optionale Unterkategorie 1A *
≥ 15 % nach einer Expositionszeit von 3 min	Eine Kombination der optionalen Unterkategorien 1B- und-1C

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

37. Für jede Prüfung sollten Daten aus einzelnen Gewebereplikaten (z. B. OD-Werte und Daten über die berechnete prozentuale Zellviabilität für jede Prüfchemikalie, einschließlich Einstufung), gegebenenfalls auch Daten aus Wiederholungsversuchen, tabellarisch zusammengefasst werden. Außerdem sollten die Mittelwerte und die Spannen der Viabilität und die Variationskoeffizienten zwischen Gewebereplikaten der einzelnen Prüfungen angegeben werden. Für jede geprüfte Chemikalie sollten zudem festgestellte Interaktionen mit dem MTT-Reagens durch direkte MTT-Reduktionsmittel oder Prüffarbstoffe berichtet werden.

Prüfbericht

38. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalien und Kontrollchemikalien

— Einkomponentiger Stoff: chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;

— mehrkomponentiger Stoff, UVCB und Gemische: So weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten;

— physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;

— Herkunft, Chargennummer, sofern vorhanden;

— Behandlung der Prüfchemikalien/Kontrollstoffe vor der Prüfung, sofern relevant (z. B. Erwärmen, Mahlen);

— Stabilität der Prüfchemikalie, letztes Verwendungsdatum oder Datum für erneute Analyse, soweit bekannt;

— Lagerungsbedingungen.

Verwendetes RhE-Modell und verwendetes Protokoll und Gründe für die Auswahl (wenn relevant)

Prüfbedingungen:

— Verwendetes RhE-Modell (einschließlich Chargennummer);

— Eichdaten für das zur Messung der Zellviabilität verwendete Messgerät (z. B. Spektrophotometer), Wellenlänge und Bandbreite (wenn relevant) für die Quantifizierung von MTT-Formazan und die Linearitätsspanne des Messgeräts;

— Beschreibung der verwendeten Methode zur Quantifizierung von MTT-Formazan;

— Beschreibung der Qualifizierung des HPLC/UPLC-Spektrophotometriesystems (wenn relevant);

— umfassende Begleitdokumentation für das betreffende Hautmodell, einschließlich seiner Leistung. Diese sollte unter anderem die folgenden Aspekte beinhalten:

i) Viabilität;

ii) Barrierefunktion;

iii) Morphologie;

iv) Reproduzierbarkeit und Vorhersagefähigkeit;

v) Qualitätskontrollen (QK) des Modells;

— Verweis auf historische Modelldaten. Dabei sollten unter anderem die folgenden Aspekte berücksichtigt werden:

— Akzeptanz der QK-Daten mit Verweis auf historische Chargendaten; Nachweis der Befähigung zur Durchführung der Prüfmethode vor der regelmäßigen Verwendung durch die Prüfung von Leistungsstoffen.

Prüfverfahren:

— Details zum verwendeten Prüfverfahren (einschließlich verwendeter Waschverfahren nach dem Expositionszeitraum);

— Dosierungen der verwendeten Prüf- und Kontrollchemikalien;

— Expositionszeitraum (-zeiträume) und -temperatur(en);

— Angabe verwendeter Kontrollen für direkte MTT-Reduktionsmittel und/oder Prüffarbstoffe (wenn relevant);

— Anzahl der pro Prüfchemikalie und pro Kontrolle (PK, Negativkontrolle und NSMTT, NSC_{lebend} und $NSC_{abgetötet}$, wenn relevant) und pro Expositionszeitraum verwendeten Gewebereplikate;

— Beschreibung der berücksichtigten Entscheidungskriterien und des verwendeten Vorhersagemodells auf der Grundlage des verwendeten RhE-Modells;

— Beschreibung etwaiger Änderungen am Prüfverfahren (einschließlich Waschverfahren).

Akzeptanzkriterien für Prüfläufe und Prüfungen

— Mittelwerte und Akzeptanzspannen der Positiv- und der Negativkontrollen auf der Grundlage historischer Daten;

— akzeptable Variabilität zwischen Gewebereplikaten für Positiv- und Negativkontrollen;

— akzeptable Variabilität zwischen Gewebereplikaten für die Prüfchemikalie.

Ergebnisse:

— Tabellarische Darstellung der Daten für die einzelnen Prüfchemikalien und Kontrollen, für die einzelnen Expositionszeiträume, Prüfläufe und Replikatmessungen einschließlich OD bzw. MTT-Formazan-Peakfläche, prozentuale Gewebeviabilität, mittlere prozentuale Gewebeviabilität, Unterschiede zwischen Replikaten, Standardabweichungen und/oder Variationskoeffizienten (wenn relevant);

— gegebenenfalls Ergebnisse verwendeter Kontrollen für direkte MTT-Reduktionsmittel und/oder Prüffarbstoffe einschließlich OD oder MTT-Formazan-Peakflächen, %NSMTT, $\%NSC_{lebend}$, $\%NSC_{abgetötet}$, Unterschiede zwischen Gewebereplikaten, Standardabweichungen und/oder Variationskoeffizienten (wenn relevant) und endgültige korrigierte prozentuale Gewebeviabilität;

— mit der Prüfchemikalie (den Prüfchemikalien) und den Kontrollchemikalien ermittelte Ergebnisse bezogen auf die definierten Akzeptanzkriterien für Prüfläufe und Prüfungen;

— Beschreibung anderer beobachteter Wirkungen;

— abgeleitete Einstufung mit Bezug auf das Vorhersagemodell und/oder angewandte Entscheidungskriterien.

Erörterung der Ergebnisse

Schlussfolgerungen

LITERATUR

(1) UN (2013). GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung) der Vereinten Nationen, fünfte überarbeitete Auflage, UN New York und Genf. Abrufbar unter:http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) Kapitel B.4 dieses Anhangs, Akute Hautreizung/-verätzung.

(3) Kapitel B.40 dieses Anhangs, *In-vitro*-Hautreizung:

(4) Kapitel B.65 dieses Anhangs, *In-vitro*-Methode zur Untersuchung der Membranbarriere.

(5) Kapitel B.46 dieses Anhangs, *In-vitro*-Hautreizung: Prüfmethode mit rekonstruierter humaner Epidermis.

(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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop *6.ATLA* 23:219-255.

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

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

(10) Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M. und 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, CA., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H. und Zucco, F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, ATLA 23:129-147.

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

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

(14) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), herausgegeben vom Wissenschaftlich Beratenden Ausschuss (ESAC) des ECVAM (ESAC10), 3. April 1998.

(15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, herausgegeben vom Wissenschaftlich Beratenden Ausschuss (ESAC) des ECVAM (ESAC14), 21. März 2000.

(16) Hoffmann, J., Heisler, E., Karpinski, S., Losse, J., Thomas, D., Siefken, W., Ahr, H.J., Vohr, H.W. und 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. und 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. und Fraissinette, A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0,5 cm^2 Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379-1385.

(19) EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, herausgegeben vom Wissenschaftlich Beratenden Ausschuss (ESAC) des ECVAM (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, herausgegeben vom Wissenschaftlich Beratenden Ausschuss (ESAC) des ECVAM (ESAC30), 12. Juni 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(22) Alépée, N., Grandidier, M.H. und 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. und 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(26) Eskes, C., u. a. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 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., u. a. (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro*. In: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier, A., Goldberg, A.M. und Maibach, H.I. (Hrsg.) 133-140.

(29) Cannon, C. L., Neal, P.J., Southee, J.A., Kubilus, J. und 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. und 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. und 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, C.J., Mason, V.S. und 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, S.R., Prosky, S.J., Meunier, S.F. und Parenteau, N.L. (1994). Development of a Bilayered Lebend Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8:747-756.

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

(35) EpiDerm™ SOP (Februar 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 (Januar 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.

(37) EpiCS® SOP (Januar 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. und 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. (Mai 2001). Abrufbar unter:[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Chemikalie: Ein Stoff oder ein Gemisch.

Einkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens 80 % w/w vorliegt.

ET_{50}: Kann durch Ermittlung der Expositionszeit abgeschätzt werden, die erforderlich ist, um die Zellviabilität bei Anwendung der Referenzchemikalie in vorgegebener fester Konzentration um 50 % zu reduzieren; siehe auch IC_{50}.

Genauigkeit: Der Grad an Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von ‚Übereinstimmung' verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (25).

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung): Ein System zur Klassifizierung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) nach standardisierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und ökologischer Gefahren und zur entsprechenden Kennzeichnung durch Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenhinweise, Sicherheitshinweise und Sicherheitsdatenbögen, um zum Schutz des Menschen (einschließlich Arbeitgeber, Arbeiter, Spediteure, Verbraucher und Notfall-Einsatzkräfte) und der Umwelt Informationen über die schädlichen Wirkungen der betreffenden Chemikalien zu verbreiten (1).

Hautverätzung, *in vivo*: Das Auslösen einer irreversiblen Hautschädigung, d. h. einer sichtbaren, bis in das Corium reichenden Nekrose der Epidermis nach Applikation einer Prüfchemikalie für die Dauer von bis zu 4 Stunden. Verätzungsreaktionen sind gekennzeichnet durch Geschwüre, Blutungen, blutige Verschorfungen und am Ende des Beobachtungszeitraums von 14 Tagen durch eine auf ein Ausbleichen der Haut zurückzuführende Verfärbung, komplett haarlose Bereiche und Narben. Bei der Beurteilung fragwürdiger Schädigungen ist die Histopathologie mit zu berücksichtigen.

HPLC: Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie.

IATA: Integrated Approach to Testing and Assessment = integrierter Prüfungs- und Bewertungsansatz.

IC_{50}: Kann durch Ermittlung der Konzentration abgeschätzt werden, bei der eine Referenzchemikalie die Viabilität der Gewebe nach einer vorgegebenen Expositionszeit um 50 % (IC_{50}) reduziert; siehe auch ET_{50}.

Leistungsstandards (PS): Auf einer validierten Prüfmethode beruhende Normen, auf deren Grundlage die Vergleichbarkeit einer vorgeschlagenen, mechanistisch und funktionell ähnlichen Prüfmethode bewertet werden kann. Sie umfassen (i) wesentliche Elemente der Prüfmethode; (ii) ein Mindestverzeichnis von Referenzchemikalien, ausgewählt aus den Chemikalien, die zum Nachweis der akzeptablen Leistung der validierten Referenzmethode verwendet werden; und (iii) je nach den für die validierte Referenzmethode erzielten Ergebnissen die vergleichbaren Zuverlässigkeits- und Genauigkeitswerte, die die vorgeschlagene Prüfmethode bei der Bewertung anhand des Mindestverzeichnisses von Referenzchemikalien demonstrieren sollte (25).

Mehrkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens ≥ 10 % w/w und < 80 % w/w vorliegt. Ein mehrkomponentiger Stoff ist das Ergebnis eines Herstellungsprozesses. Der Unterschied zwischen einem Gemisch und einem mehrkomponentigen Stoff besteht darin, dass ein Gemisch durch die Mischung von zwei oder mehr Stoffen ohne chemische Reaktion entsteht. Ein mehrkomponentiger Stoff wird durch eine chemische Reaktion gebildet.

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; Thiazolyl-Blau-Tetrazoliumbromid.

NC: Nicht hautätzend

$NSC_{abgetötet}$-Kontrolle: Nicht spezifische Farbkontrolle mit abgetöteten Geweben.

NSC_{lebend}-Kontrolle: Nicht spezifische Farbkontrolle mit lebenden Geweben.

NSMTT: Nicht spezifische MTT-Reduktion.

OD: Optische Dichte.

PK: Positivkontrolle, ein Replikat, das alle Komponenten eines Prüfsystems enthält und mit einer Chemikalie behandelt wird, die bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Um sicherzustellen, dass Abweichungen bei der Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

Prüflauf: Ein Prüflauf besteht aus einer oder mehreren Prüfchemikalien, die gleichzeitig mit einer Negativ- und einer Positivkontrolle geprüft werden.

Relevanz: Dieser Begriff bezieht sich auf das Verhältnis zwischen der Prüfmethode und der betreffenden Wirkung und auf die Frage, ob er aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Er beschreibt das Ausmaß, in dem die Prüfmethode die untersuchte biologische Wirkung korrekt misst oder vorhersagt. Die Relevanz schließt eine Beurteilung der Genauigkeit (Übereinstimmung) einer Prüfmethode ein (25).

Sensitivität: Der Anteil aller positiven/wirkenden Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft werden. Die Sensitivität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (25).

Spezifizität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (25).

Stoff: Ein chemisches Element und seine Verbindungen in natürlicher Form oder gewonnen durch ein Herstellungsverfahren, einschließlich der zur Wahrung seiner Stabilität notwendigen Zusatzstoffe und der durch das angewandte Verfahren bedingten Verunreinigungen, aber mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können.

Übereinstimmung: Die Übereinstimmung ist ein Maß der Leistung einer Prüfmethode für Prüfverfahren mit kategorialen Ergebnissen und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird gelegentlich gleichbedeutend mit Genauigkeit verwendet und als Anteil aller geprüften Chemikalien definiert, die korrekt als positiv oder negativ eingestuft werden. Die Übereinstimmung hängt in hohem Maße von der Prävalenz positiver Ergebnisse bei den Typen der untersuchten Prüfchemikalien ab (25).

Überschüssige Dosis: Die Menge der auf die Haut aufgetragenen Prüfchemikalie, die über die zur vollständigen und gleichmäßigen Bedeckung der Hautoberfläche erforderliche Menge hinausgeht. Ein Gemisch oder eine Lösung, die aus zwei oder mehr nicht reagierenden Stoffen besteht.

UPLC: Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie.

UVCB: Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Zellviabilität: Parameter zur Messung der Gesamtaktivität einer Zellpopulation, z. B. Fähigkeit zellulärer mitochondrialer Dehydrogenasen, den Vitalfarbstoff MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, Thiazolyl-Blau) zu reduzieren, der je nach gemessenem Endpunkt und angewandtem Prüfkonzept der Gesamtzahl und/oder der Vitalität lebender Zellen entspricht.

Zuverlässigkeit: Beschreibung der Beziehung zwischen der Prüfung und der untersuchten Wirkung und ob die Prüfung aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Sie wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit bewertet (25).

Anlage 2

HAUPTELEMENTE DER FÜR DIE PRÜFUNG VON HAUTVERÄTZUNGEN VALIDIERTEN RHE-PRÜFMODELLE

Prüfmodellelemente	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Modelloberfläche	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Anzahl der Gewebereplikate	Mindestens 2 pro Expositionszeitraum	2-3 pro Expositionszeitraum	Mindestens 2 pro Expositionszeitraum	Mindestens 2 pro Expositionszeitraum
Behandlungsdosierungen und Auftragung	Flüssigkeiten und viskose Flüssigkeiten: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm^2) Feststoffe: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 µl ± 5 µl NaCl solution (9 g/l) Wachsartig/klebrig: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) mit Nylon-Maschenfilter	Flüssigkeiten: 50 µl (79,4 µl/cm^2) mit oder ohne Nylon-Maschenfilter *Vorversuch mit Nylon-Maschenfilter zur Verwendbarkeit der Prüfchemikalie* Halbfeste Stoffe: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Feststoffe: 25 µl H_2O (bzw. erforderlichenfalls mehr) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Wachsartige Stoffe: Eine flache „Scheibe“ mit einem Durchmesser von 8 mm auf dem mit 15 µl H_2O befeuchteten Gewebe.	Flüssigkeiten und viskose Flüssigkeiten: 40 µl ± 3 µl (80 µl/cm^2) mit Nylon-Maschenfilter *Vorversuch mit Nylon-Maschenfilter zur Verwendbarkeit der Prüfchemikalie* Feststoffe: 20 µl ± 2µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Wachsartige/klebrige Stoffe: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) mit Nylon-Maschenfilter	Flüssigkeiten: 50 µl (83,3 µl/cm^2) mit Nylon-Maschenfilter *Vorversuch mit Nylon-Maschenfilter zur Verwendbarkeit der Prüfchemikalie* Halbfeste Stoffe: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Feststoffe: 25 mg (41.7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (bzw. erforderlichenfalls mehr) Wachsartige Stoffe: Eine flache „Scheibe“ mit einem Durchmesser von 8 mm auf dem mit 15 µl H_2O befeuchteten Gewebe.

Prüfmodellelemente	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Vorabprüfung auf direkte MTT-Reduktion	50 µl (Flüssigkeiten) oder 20 mg (Feststoffe)+ 2 ml MTT 0,3 mg/ml Lösung 180 ± 5 min bei 37 °C, 5 % CO_2, 95 % relative Luftfeuchtigkeit → Wenn die Lösung sich blau/violett färbt, sollten geeignete in Wasser abgetötete Kontrollen untersucht werden.	50 µl (Flüssigkeiten) oder 25 mg (Feststoffe)+ 1 ml MTT 1 mg/ml Lösung 60 min bei 37 °C, 5 % CO_2, 95 % relative Luftfeuchtigkeit → Wenn die Lösung sich blau/violett färbt, sollten durch Gefrieren abgetötete Kontrollen untersucht werden.	40 µl (Flüssigkeiten) oder 20 mg (Feststoffe)+ 1 ml MTT 1 mg/ml Lösung für 180 ± 15 min bei 37 °C, 5 % CO_2, 95 % relative Luftfeuchtigkeit → Wenn die Lösung sich blau/violett färbt, sollten durch Gefrieren abgetötete Kontrollen untersucht werden.	50 µl (Flüssigkeiten) oder 25 mg (Feststoffe)+ 1 ml MTT 1 mg/ml Lösung 60 min bei 37 °C, 5 % CO_2, 95 % relative Luftfeuchtigkeit → Wenn die Lösung sich blau/violett färbt, sollten durch Gefrieren abgetötete Kontrollen untersucht werden.
Vorabprüfung auf Farbinterferenzen	10 µl (Flüssigkeiten) bzw. 10 mg (Feststoffe) + 90 µl H_2O 15 min gemischt bei Raumtemperatur → Wenn sich die Lösung färbt, sollten Prüfungen an geeigneten lebenden Kontrollen durchgeführt werden.	50 µl (Flüssigkeiten) bzw. 25 mg (Feststoffe) + 300 µl H_2O 60 min bei 37 °C, 5 % CO_2, 95 % relative Luftfeuchtigkeit → Wenn sich die Lösung färbt, sollten Prüfungen an geeigneten lebenden Kontrollen durchgeführt werden.	40 µl (Flüssigkeiten) bzw. 20 mg (Feststoffe) + 300 µl H_2O 60 min gemischt bei Raumtemperatur → Wenn sich die Prüfchemikalie färbt, sollten Prüfungen an geeigneten lebenden Kontrollen durchgeführt werden.	50 µl (Flüssigkeiten) bzw. 25 mg (Feststoffe) + 300 µl H_2O 60 min bei 37 °C, 5 % CO_2, 95 % relative Luftfeuchtigkeit → Wenn sich die Lösung färbt, sollten Prüfungen an geeigneten lebenden Kontrollen durchgeführt werden.
Expositionszeitraum und-temperatur	3 min, 60 min (± 5 min) und 240 min (± 10 min) In belüftetem Schrank Raumtemperatur (RT) (18-28 °C)	3 min bei Raumtemperatur und 60 min bei 37 °C, 5 % CO_2, 95 % relative Luftfeuchtigkeit	3 min bei Raumtemperatur und 60 min bei 37 °C, 5 % CO_2, 95 % relative Luftfeuchtigkeit	3 min bei Raumtemperatur und 60 min bei 37 °C, 5 % CO_2, 95 % relative Luftfeuchtigkeit
Waschen	25 ml 1x PBS (2 ml/Prüflauf)	20x unter konstanter vorsichtiger Spülung mit 1x PBS	20x unter konstanter vorsichtiger Spülung mit 1x PBS	20x unter konstanter vorsichtiger Spülung mit 1x PBS

Prüfmodellelemente	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Negativkontrolle	50 µl NaCl-Lösung (9 g/l) Geprüft über alle Expositionszeiträume	50 µl H_2O Geprüft über alle Expositionszeiträume	40 µl H_2O Geprüft über alle Expositionszeiträume	50 µl H_2O Geprüft über alle Expositionszeiträume
Positivkontrolle	50 µl Eisessig Nur über 4 h geprüft	50 µl 8N KOH Geprüft über alle Expositionszeiträume	40 µl 8N KOH Nur über 1 h geprüft	50 µl 8N KOH Geprüft über alle Expositionszeiträume
MTT-Lösung	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT Inkubationszeit und-temperatur	180 min (± 15 min) bei 37 °C, 5 % CO_2, 95 % relative Luftfeuchtigkeit	180 min bei 37 °C, 5 % CO_2, 95 % relative Luftfeuchtigkeit	180 min (± 15 min) bei 37 °C, 5 % CO_2, 95 % relative Luftfeuchtigkeit	180 min bei 37 °C, 5 % CO_2, 95 % relative Luftfeuchtigkeit
Extraktionslösung	500 µl Isopropanol acidifiziert (0,04 N HCl in Isopropanol) (isoliertes Gewebe, vollständig eingelegt)	2 ml Isopropanol (Extraktion oben und unten aus dem Einsatz)	1,5 ml Isopropanol (Extraktion oben und unten aus dem Einsatz)	2 ml Isopropanol (Extraktion oben und unten aus dem Einsatz)
Expositionszeitraum und-temperatur	Über Nacht bei Raumtemperatur, vor Licht geschützt	Über Nacht ohne Schütteln bei Raumtemperatur oder 120 min mit Schütteln (~120 rpm) bei Raumtemperatur	Über Nacht ohne Schütteln bei Raumtemperatur oder 120 min mit Schütteln (~120 rpm) bei Raumtemperatur	Über Nacht ohne Schütteln bei Raumtemperatur oder 120 min mit Schütteln (~120 rpm) bei Raumtemperatur

Prüfmodellelemente	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
OD-Anzeige	570 nm (545 - 595 nm) ohne Referenzfilter	570 nm (oder 540 nm) ohne Referenzfilter	570 nm (540 - 600 nm) ohne Referenzfilter	540 - 570 nm ohne Referenzfilter
Kontrolle der Gewebequalität	18-stündige Behandlung mit SDS 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	Behandlung mit 1 % Triton X-100 4,08 h ≤ ET_{50} ≤ 8,7 h	Behandlung mit 1 % Triton X-100 4,0 h ≤ ET_{50} ≤ 10,0 h	Behandlung mit 1 % Triton X-100 2,0 h ≤ ET_{50} ≤ 7,0 h
Akzeptanzkriterien	1. Die mittlere OD der mit der Negativkontrolle (NaCl) behandelten Gewebereplikate sollte bei allen Expositionszeiträumen ≥ 0,6 und ≤ 1,5 sein. 2. Die prozentuale mittlere Viabilität der Gewebereplikate bezogen auf die Negativkontrolle sollte nach 4-stündiger Exposition gegenüber der Positivkontrolle (Eisessigsäure) ≤ 20 % sein. 3. Im Viabilitätsbereich von 20-100 % und bei ODs ≥ 0,3 sollten die Unterschiede der Viabilität zwischen den beiden Gewebereplikaten nicht mehr als 30 % betragen.	1. Die mittlere OD der mit der Negativkontrolle (H_2O) behandelten Gewebereplikate sollte bei allen Expositionszeiträumen ≥ 0,8 und ≤ 2,8 sein. 2. Die mittlere Viabilität der Gewebereplikate nach 1-stündiger Exposition gegenüber der Positivkontrolle (8N KOH), ausgedrückt in % der Negativkontrolle, sollte < 15 % sein. 3. Bei einer Viabilität von 20-100 % sollte der Variationskoeffizient (VK) zwischen den Gewebereplikaten bei ≤ 30 % liegen.	1. Die mittlere OD der mit der Negativkontrolle (H_2O) behandelten Gewebereplikate sollte bei allen Expositionszeiträumen ≥ 0,8 und ≤ 3,0 sein. 2. Die mittlere Viabilität der Gewebereplikate nach 1-stündiger (bzw. ggf. 4-stündiger) Exposition gegenüber der Positivkontrolle (8N KOH), ausgedrückt in % der Negativkontrolle, sollte < 15 % sein. 3. Im Viabilitätsbereich von 20-100 % und bei ODs ≥ 0,3 sollten die Unterschiede der Viabilität zwischen den beiden Gewebereplikaten nicht mehr als 30 % betragen.	1. Die mittlere OD der mit der Negativkontrolle (H_2O) behandelten Gewebereplikate sollte bei allen Expositionszeiträumen ≥ 0,8 und ≤ 2,8 sein. 2. Die mittlere Viabilität der Gewebereplikate nach 1-stündiger Exposition gegenüber der Positivkontrolle (8N KOH), ausgedrückt in % der Negativkontrolle, sollte < 20 % sein. 3. Im Viabilitätsbereich von 20-100 % und bei ODs ≥ 0,3 sollten die Unterschiede der Viabilität zwischen den beiden Gewebereplikaten nicht mehr als 30 % betragen.

Anlage 3

LEISTUNG DER PRÜFMODELLE ZUR UNTERKATEGORISIERUNG

Die folgende Tabelle bietet einen Überblick über die Leistung der vier Prüfmodelle, die auf der Grundlage einer Reihe von 80 von den vier Entwicklern der Prüfmodelle geprüften Chemikalien berechnet wurde. Die Berechnungen wurden vom OECD-Sekretariat vorgenommen und von einer Experten-Untergruppe geprüft und angenommen (21) (23).

Mithilfe der Prüfmodelle EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ und epiCS® können Unterkategorisierungen (d. h. Unterscheidungen zwischen 1A und 1B-und-1C gegenüber NC) vorgenommen werden.

Die Leistungsangaben, die Überklassifizierungsraten, die Unterqualifizierungsraten und die Genauigkeit (Vorhersagefähigkeit) der vier Prüfmodelle beruhen auf einer Reihe von 80 Chemikalien, die für jedes Prüfmodell jeweils in 2 oder 3 Prüfläufen untersucht wurden:

STATISTIKEN ZU VORHERSAGEN AUFGRUND DER GESAMTEN CHEMIKALIENREIHE

(n= 80 Chemikalien, die über 2 getrennte Prüfläufe mit epiCS® bzw. mit 3 getrennten Prüfläufen mit EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ und SkinEthic™ RHE untersucht wurden, d. h. insgesamt 159 (*) bzw. 240 Klassifikationen)

	EpiSkin™	EpiDerm ™	SkinEthic™	epiCS®
Überklassifizierungen:				
1B-und-1C überklassifiziert als 1A	21,5 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
Negativkontrolle überklassifiziert als 1B-und-1C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
Negativkontrolle überklassifiziert als 1A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Überklassif. Korr.	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Allgemeine Überklassifizierungsrate (alle Kategorien)	**17,9 %**	**23,3 %**	**24,5 %**	**25,8 %**
Unterklassifizierungen:				
1A unterklassifiziert als 1B-und-1C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A unterklassifiziert als Negativkontrolle	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B-und-1C unterklassifiziert als Negativkontrolle	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Allgemeine Unterklassifizierungsrate (alle Kategorien)	**3,3 %**	**2,5 %**	**5,4 %**	**4,4 %**
Korrekte Klassifizierungen:				
1A korrekt klassifiziert	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
1B-und-/1C korrekt klassifiziert	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
Negativkontrolle korrekt klassifiziert	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Gesamtgenauigkeit	**78,8 %**	**74,2 %**	**70 %**	**69,8 %**

NC: Nicht hautätzend

(*) Eine Chemikalie wurde infolge mangelnder Verfügbarkeit einmal mit epiCS® untersucht (23).

Anlage 4

Schlüsselparameter und Akzeptanzkriterien für die Qualifizierung eines HPLC/UPLC-Spektrophotometriesystems zur Messung von aus RhE-Gewebe extrahiertem MTT-Formazan

Parameter	Protokoll abgeleitet aus FDA-Leitlinie (37)(38)	Akzeptanzkriterien
Selektivität	Analyse von Isopropanol, Blindprobe lebend (Isopropanol-Extrakt aus lebenden RhE-Geweben ohne Behandlung), Blindprobe abgetötet (Isopropanol-Extrakt aus abgetöteten RhE-Geweben ohne Behandlung)	$Fläche_{Interferenz} \leq 20\ \%\ Fläche_{LLOQ}$ [1]
Präzision	Qualitätskontrollen (d. h. MTT-Formazan bei 1,6 µg/ml, 16 µg/ml und 160 µg/ml) in Isopropanol (n=5)	VK ≤ 15 % bzw. ≤ 20 % für LLOQ
Genauigkeit	Qualitätskontrollen mit Isopropanol (n=5)	% Abw. ≤ 15 % bzw. ≤ 20 % für LLOQ
Matrixeffekt	Qualitätskontrollen mit Blindprobe lebend (n=5)	85 % ≤ Matrixeffekt % ≤ 115 %
Übertragung	Analyse Isopropanol nach einem $ULOQ^2$-Standard [2]	$Fläche_{Interferenz} \leq 20\ \%\ Fläche_{LLOQ}$
Reproduzierbarkeit (innerhalb eines Tages)	3 unabhängige Eichkurven (aufgrund von 6 aufeinander folgenden Verdünnungen von MTT-Formazan in Isopropanol im Verhältnis 1:3 beginnend mit der ULOQ, d. h. 200 µg/ml); Qualitätskontrollen in Isopropanol (n=5)	Eichkurven: % Abw. ≤ 15 % bzw. ≤ 20 % für LLOQ Qualitätskontrollen: % Abw. ≤ 15 % und VK ≤ 15 %
Reproduzierbarkeit (innerhalb eines Tages)	Tag 1: 1 Eichkurve und Qualitätskontrollen in Isopropanol (n=3) Tag 2: 1 Eichkurve und Qualitätskontrollen in Isopropanol (n=3) Tag 3: 1 Eichkurve und Qualitätskontrollen in Isopropanol (n=3)	
Kurzzeitstabilität von MTT-Formazan in RhE-Gewebeextrakt	Qualitätskontrollen in Blindproben lebend (n=3), die am Tag der Vorbereitung sowie nach 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur analysiert wurden.	% Abw. ≤ 15 %
Langzeitstabilität von MTT-Formazan in RhE-Gewebeextrakt (erforderlichenfalls)	Qualitätskontrollen in Blindproben lebend (n=3), die am Tag der Vorbereitung sowie nach mehrtägiger Lagerung bei einer spezifizierten Temperatur (z. B. 4 °C, -20 °C, -80 °C) analysiert wurden.	% Abw. ≤ 15 %

[1] LLOQ Untere Quantifizierungsgrenze, definiert als Gewebeviabilität von 1-2 %, d. h. 0,8 µg/ml.
[2] ULOQ Obere Quantifizierungsgrenze, definiert als mindestens zweimal so hoch wie die erwartete MTT-Formazan-Konzentration in Isopropanol-Extrakten aus Negativkontrollen, d. h. 200 µg/ml."

(7) In Teil B erhält Kapitel B.46 folgende Fassung:

„B.46 ***IN VITRO*-HAUTREIZUNG: PRÜFMETHODE MIT REKONSTRUIERTER HUMANER EPIDERMIS**

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode (PM) entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 439 (2015). Als Hautreizung wird das Auslösen einer reversiblen Hautschädigung nach Applikation einer Prüfchemikalie für die Dauer von bis zu 4 Stunden [Definition nach dem Global Harmonisierten System (GHS) zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (UN)](1) und nach Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (CLP-Verordnung) ([1]) bezeichnet. Die vorliegende Prüfmethode besteht in einem *In-vitro*-Verfahren, das zur Ermittlung schädlicher Wirkungen von hautreizenden Chemikalien (Stoffen und Gemischen) gemäß UN GHS und CLP-Verordnung Kategorie 2 (2) verwendet werden kann. In Regionen, in denen die optionale UN-GHS-Kategorie 3 (leichte Reizstoffe) nicht übernommen wurde, kann diese Prüfmethode auch zur Identifizierung nicht klassifizierter Chemikalien verwendet werden. Je nach Rechtsrahmen und verwendetem Klassifizierungssystem kann diese Prüfmethode daher im Rahmen einer Prüfstrategie zur Ermittlung des Hautreizungspotenzials von Chemikalien entweder als eigenständige Ersatzprüfung zur *In-vivo*-Untersuchung auf Hautreizungen oder als teilweise Ersatzprüfung verwendet werden (3).
2. Die Bewertung von Hautreizungen erfolgte in der Regel unter Verwendung von Labortieren [PM B.4, entsprechend OECD TG 404, ursprünglich angenommen im Jahr 1981 und geändert in den Jahren 1992, 2002 und 2015] (4). Für die Untersuchung auf Hautverätzungen wurden drei validierte *In-vitro*−Prüfmethoden als EU PM B.40 (entsprechend OECD TG 430), PM B.40bis (entsprechend OECD TG 431) und PM B.65 (entsprechend OECD TG 435) angenommen (5) (6) (7). In einem OECD-Leitliniendokument über integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA = Integrated Approaches to Testing and Assessment) zur Untersuchung von Hautverätzungen und -reizungen werden mehrere Module beschrieben, in denen Informationsquellen und Analyseinstrumente zu Gruppen zusammengefasst werden. Sie enthalten i) Leitlinien dazu, wie vorhandene Daten aus Prüfungen und aus anderen Quellen integriert und verwendet werden können, um das Hautreizungs- und das Hautverätzungspotenzial von Chemikalien zu bewerten, und ii) einen Vorschlag zur Durchführung ggf. erforderlicher weiterer Prüfungen (3).
3. Mit dieser Prüfmethode werden Hautreizungen mit dem Endpunkt der menschlichen Gesundheit untersucht. Sie beruht auf dem *In-vitro*-Prüfsystem zur Untersuchung rekonstruierter humaner Epidermis (RhE), die die biochemischen und physiologischen Eigenschaften der menschlichen Oberhaut (d. h. der Epidermis) weitgehend widerspiegelt. Im RhE-Prüfsystem werden menschliche nicht transformierte Keratinozyten als zelluläres Ausgangsmaterial zur Rekonstruktion eines Epidermismodells mit repräsentativer Histologie und Zellarchitektur verwendet. Leistungsstandards (PS) erleichtern die Validierung und Bewertung ähnlicher und modifizierter Prüfmethoden, die auf der Verwendung von RhE und der Einhaltung der Grundsätze des OECD-Leitliniendokuments Nr. 34 beruhen (8)(9). Die entsprechende OECD-Prüfrichtlinie wurde ursprünglich 2010 angenommen und 2013 unter Berücksichtigung weiterer Prüfmethoden unter Verwendung von RhE-Modellen zunächst im Jahr 2013 und anschließend nochmals im Jahr 2015 unter Verweis auf das IATA-Leitliniendokument und unter Einführung der Verwendung eines alternativen Verfahrens zur Messung der Viabilität aktualisiert.
4. Zu vier im Handel erhältlichen *In-vitro*-Prüfmodellen wurden auf dem RhE-Prüfsystem (Sensitivität 80 %, Spezifizität 70 % und Genauigkeit 75 %) beruhende Vorvalidierungs-, Optimierungs- und Validierungsstudien durchgeführt (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Diese vier Prüfmodelle werden in diese Prüfmethode aufgenommen und in Anlage 2 genannt, die auch Informationen zur Art der zur Validierung der jeweiligen Prüfmethoden verwendeten Validierungsstudien enthält. Wie in Anlage 2 erläutert, wurden diese Prüfmethode und die Leistungsstandards mit der validierten Referenzmethode (VRM) entwickelt (8).
5. Die gegenseitige Anerkennung der Daten gemäß dem OECD-Übereinkommen wird nur dann für nach den Leistungsstandards (8) validierte Prüfmodelle garantiert, wenn diese Prüfmodelle von der OECD geprüft und angenommen wurden. Die in diese Prüfmethode aufgenommenen Prüfmodelle und die entsprechende OECD TG können gleichermaßen verwendet werden, um sowohl länderbezogene Anforderungen an die Prüfergebnisse der *In-vitro*-Prüfmethoden zur Untersuchung von Hautreizungen zu erfüllen als auch die gegenseitige Anerkennung von Daten beanspruchen zu können.
6. In diesem Dokument gelten die Begriffsbestimmungen in Anlage 1.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

7. Eine Begrenzung der Prüfmethode, wie durch die umfassende prospektive Validierungsstudie zur Bewertung und Beschreibung von RhE-Prüfmethoden (16) nachgewiesen, besteht insofern, als keine Einstufung von Stoffen in die optionale Kategorie 3 (leichte Reizstoffe) des UN-GHS-Systems möglich ist (1). Daher wird mit dem Rechtsrahmen in den Mitgliedstaaten festgelegt, wie diese Prüfmethode zu verwenden ist. Die EU hat Kategorie 3 nicht in die CLP-Verordnung aufgenommen. Eine umfassende Evaluierung lokaler Auswirkungen auf die Haut nach einer einmaligen dermalen Exposition ist dem OECD-Leitliniendokument über integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA) zu entnehmen (3). Die Verwendung menschlicher Haut unterliegt anerkanntermaßen ethischen Überlegungen und Bedingungen auf nationaler und internationaler Ebene.

([1]) Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

8. Mit dieser Prüfmethode werden Hautreizungen mit dem Endpunkt der menschlichen Gesundheit untersucht. Obwohl diese Prüfmethode keine angemessenen Informationen über Hautätzungen liefert, wird darauf hingewiesen, dass PM B.40bis (entsprechend OECD-Prüfrichtlinie 431) über Hautätzung auf demselben Prüfsystem auf der Grundlage eines RhE-Modells beruht, aber ein anderes Protokoll vorsieht (Kapitel 6). Die vorliegende Prüfmethode beruht auf Modellen unter Verwendung menschlicher Keratinozyten, die *in vitro* das Zielorgan der zu schützenden Spezies repräsentieren. Darüber hinaus bildet sie den Anfangsschritt der Entzündungskaskade bzw. des Wirkmechanismus ab (Zell- und Gewebeschädigung mit resultierendem lokalisiertem Trauma), der während der Reizung *in vivo* auftritt. Für die dieser Prüfmethode zugrunde liegende Validierung wurden Chemikalien unterschiedlicher Klassen untersucht. In der dieser Prüfmethode zugrunde liegenden Validierung wurden zahlreiche Chemikalien geprüft, und die Datenbank der Validierungsstudie umfasste insgesamt 58 Chemikalien (16) (18) (23). Die Prüfmethode ist auf Feststoffe, Flüssigkeiten, halbfeste Stoffe und Wachse anwendbar. Flüssigkeiten können wässrig oder nicht wässrig und Feststoffe in Wasser löslich oder unlöslich sein. Sofern möglich, sollten Feststoffe vor der Applikation zu Feinpulver gemahlen werden; eine weitere Behandlung der Probe ist nicht nötig. Gase und Aerosole wurden bislang in keiner Validierungsstudie bewertet (29). Obwohl deren Prüfung mit der RhE-Technologie prinzipiell vorstellbar ist, erlaubt die vorliegende Prüfmethode das Untersuchen von Gasen und Aerosolen nicht.

9. Bevor die Prüfmethode für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regulierungszweck verwendet wird, ist zu prüfen, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefern kann und, wenn dem so ist, warum. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs rechtlich vorgeschrieben ist. Da Gemische jedoch vielfältigen Kategorien zuzurechnen sein und unterschiedliche Zusammensetzungen haben können, und da gegenwärtig nur begrenzte Informationen über die Prüfung von Gemischen verfügbar sind, sollten Prüfmethoden, bei denen nachgewiesen werden kann, dass sie für eine bestimmte Kategorie von Gemischen nicht geeignet sind (beispielsweise durch ein Verfahren entsprechend dem von Eskes u. a. 2012 vorgeschlagenen Verfahren (30)), für die betreffende Kategorie von Gemischen nicht verwendet werden. Vorsicht ist ebenfalls geboten, wenn festgestellt wird, dass diese Prüfmethode für spezifische Chemikalienklassen oder physikalisch-chemische Eigenschaften nicht geeignet ist.

10. Prüfchemikalien, die Licht im selben Spektrum absorbieren können wie MTT-Formazan, und Prüfchemikalien, die in der Lage sind, den lebenswichtigen Farbstoff MTT zu reduzieren (zu MTT-Formazan), können die Messungen der Zellviabilität stören und erfordern die Verwendung geeigneter Kontrollen zur Korrektur (Nummern 28-34).

11. Vorausgesetzt die Prüfung liefert ein eindeutiges Ergebnis, genügt ein einziger Prüflauf mit drei parallel geprüften Replikat-Geweben. Bei Grenzergebnissen, wie z. B. nicht übereinstimmenden Replikatmessungen und/oder einer mittleren prozentualen Viabilität von 50 ± 5 %, sollte ein zweiter Prüflauf in Betracht gezogen werden bzw. ein dritter bei abweichenden Ergebnissen der ersten beiden Prüfläufe.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

12. Die Prüfchemikalie wird oberflächlich auf ein dreidimensionales RhE-Modell aufgetragen, das aus nicht veränderten humanen epidermalen Keratinozyten besteht, die zu einem mehrschichtigen, ausdifferenzierten Modell humaner Epidermis kultiviert wurden. Das Modell besteht aus geordneten Basal-, Stachel- und Körnerzellschichten und einer mehrlagigen Hornschicht (*stratum corneum*), die interzelluläre lamellare Fettschichten enthält, deren dominierende Lipidklassen dem *in vivo* gefundenen Lipidmuster entsprechen.

13. Durch Chemikalien hervorgerufene Reizungen der Haut manifestieren sich hauptsächlich als Erytheme und Ödeme. Diese Symptome sind das Ergebnis einer Kaskade von Ereignissen, an deren Beginn das Eindringen der Chemikalien in das *stratum corneum* steht, in dem die Chemikalien die darunter liegenden Keratinozytenschichten schädigen können. Die beschädigten Zellen können entweder Entzündungsmediatoren freisetzen oder eine Entzündungskaskade induzieren, die auch auf die Zellen der Dermis wirken, insbesondere auf die Stromal- und Endothelzellen der Blutgefäße. Die Dilation und erhöhte Durchlässigkeit der Endothelzellen erzeugen letztendlich das festgestellte Erythem bzw. Ödem (29). Mit den Prüfmethoden unter Verwendung von RhE (ohne Vaskularisierung im *In-vitro*-Prüfsystem) werden anhand der Zellviabilität die auslösenden Ereignisse in der Kaskade (z. B. Zell- bzw. Gewebeschäden) (16) (17) gemessen.

14. Die Zellviabilität an Modellen rekonstruierter menschlicher Epidermis wird durch Enzymkonversion des Vitalfarbstoffs MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, Thiazolyl-Blau; CAS-Nummer 298-93-1] zu einem blauen Formazan-Salz gemessen, das nach seiner Extraktion aus Geweben quantifiziert wird (31). Reizstoffe werden anhand ihrer Fähigkeit erkannt, die Zellviabilität unter vorgegebene Schwellenwerte zu senken (d. h. ≤ 50 % bei Reizstoffen der UN-GHS-/CLP-Kategorie 2). Je nach Rechtsrahmen und Anwendbarkeit der Prüfmethode können Chemikalien, die eine Zellviabilität oberhalb des vorgegebenen Grenzwerts erzeugen, als nicht-reizend eingestuft werden (d. h. > 50 %, keine Einstufung).

NACHWEIS DER LEISTUNGFÄHIGKEIT

15. Vor der routinemäßigen Anwendung eines der vier validierten RhE-Prüfmodelle nach dieser Prüfmethode (Anlage 2) sollten Labors die erforderliche technische Befähigung durch eine ordnungsgemäße Klassifizierung der zehn in Tabelle 1 empfohlenen Leistungsstoffe nachweisen. Wenn beispielsweise ein dort genannter Stoff nicht verfügbar ist, kann ein anderer Stoff verwendet werden, für den geeignete *In-vivo*- und *In-vitro*-Referenzdaten verfügbar sind (z. B. aus der Liste der Referenzchemikalien (8)), sofern die in Tabelle 1 beschriebenen Auswahlkriterien angewendet werden. Die Verwendung alternativer Leistungsstoffe sollte gerechtfertigt sein.

16. Im Rahmen des Nachweises der Leistungsfähigkeit sollten die Benutzer die vom Hersteller des Hautmodells spezifizierten Barriereeigenschaften der Gewebe nach Erhalt überprüfen. Dies ist besonders dann wichtig, wenn die Gewebe über große Entfernungen/Zeiträume transportiert werden. Sobald eine Methode erfolgreich etabliert und ihre Leistungsfähigkeit festgestellt und nachgewiesen wurde, ist diese Überprüfung nicht mehr routinemäßig erforderlich. Allerdings empfiehlt es sich auch bei routinemäßig angewandten Prüfmethoden, die Barriereeigenschaften in regelmäßigen Abständen zu kontrollieren.

Tabelle 1

Leistungsstoffe [1]

Stoff	CAS-Nr.	*In-vivo*-Punktzahl [2]	Aggregatzustand	UN-GHS-Kategorie
NICHT KLASSIFIZIERTE STOFFE (UN GHS KEINE EINSTUFUNG)				
Naphthalen-Essigsäure	86-87-3	0	Feststoff	Keine Einst.
Isopropanol	67-63-0	0,3	Flüssigkeit	Keine Einst.
Methylstearat	112-61-8	1	Feststoff	Keine Einst.
Heptyl-Butyrat	5870-93-9	1,7	Flüssigkeit	Keine Einst. (*wahlfrei Kat. 3*) [3]
Hexyl-Salicylat	6259-76-3	2	Flüssigkeit	Keine Einst. (*wahlfrei Kat. 3*) [3]
KLASSIFIZIERTE STOFFE (UN-GHS-KATEGORIE 2)				
Cyclamenaldehyd	103-95-7	2,3	Flüssigkeit	Kat. 2
1-Bromhexan	111-25-1	2,7	Flüssigkeit	Kat. 2
Kaliumhydroxid (5 % aq.)	1310-58-3	3	Flüssigkeit	Kat. 2
1-Methyl-3-phenyl-1-piperazin;	5271-27-2	3,3	Feststoff	Kat. 2
Heptanal	111-71-7	3,4	Flüssigkeit	Kat. 2

(1) Die Leistungsstoffe bestehen aus einer Untergruppe der in der Validierungsstudie verwendeten Stoffe, und die Auswahl basiert auf den folgenden Kriterien: i) die Chemikalien sind im Handel erhältlich; ii) sie repräsentieren die volle Bandbreite der Draize-Reizstufen (von nicht reizend bis stark reizend); iii) sie haben eine klar definierte chemische Struktur; iv) sie sind repräsentativ für die im Validierungsprozess verwendete chemische Funktionalität; v) sie führten bei mehreren Prüfungen und in mehreren Labors zu reproduzierbaren *In-vitro*-Ergebnissen; (vi) sie wurden *in vitro* korrekt vorhergesagt; (vii) sie weisen kein extrem toxisches Profil auf (z. B. krebserregend oder toxisch für das Reproduktionssystem) und sind nicht mit nicht tragbaren Entsorgungskosten verbunden.

(2) *In-vivo*-Punktzahl nach PM B.4 (4).

(3) Im Rahmen dieser Prüfmethode wird die wahlfreie UN-GHS-Kategorie 3 (leichte Reizstoffe) (1) als Keine Einstufung betrachtet.

VERFAHREN

17. Im Folgenden werden die Elemente und Verfahren einer RhE-Prüfmethode zur Bewertung von Hautreizungen beschrieben. (Zu den Parametern der einzelnen Prüfmodelle siehe auch Anlage 3.) Für die vier Modelle, die die Anforderungen dieser Prüfmethode erfüllen, sind Standardarbeitsweisen (SOPs) verfügbar (32) (33) (34) (35).

ELEMENTE DER RHE-PRÜFMETHODE

Allgemeine Bedingungen

18. Die Epithelschicht sollte aus normalen menschlichen Keratinozyten gebildet werden. Unter der funktionsfähigen Hornschicht (*stratum corneum*) sollten mehrere Lagen lebensfähiger Epithelzellen (Basalzellschicht, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*) vorhanden sein. Die Hornschicht sollte mehrlagig sein und das zur Erzeugung einer funktionsfähigen Barriere essenzielle Lipidprofil aufweisen. Die Barriere muss robust genug sein, um das schnelle Eindringen zytotoxischer Referenzchemikalien wie Natriumdodecylsulfat (SDS) oder Triton X-100 zu verhindern. Die Barrierefunktion kann entweder durch Bestimmung der Konzentration, bei der eine Referenzchemikalie die Viabilität der Gewebe nach einer vorgegebenen Expositionsdauer um 50 % verringert (IC_{50}), oder durch die Bestimmung der Expositionszeit bewertet werden, die erforderlich ist, um die Zellviabilität bei Anwendung der Referenzchemikalie in einer vorgegebenen festen Konzentration um 50 % zu reduzieren (ET_{50}). Die Rückhalteeigenschaften des RhE-Modells müssen ausschließen, dass Material rund um die Hornschicht in lebensfähiges Gewebe eindringt und die Modellierung der Hautexposition beeinträchtigt. Das RhE-Modell sollte nicht mit Bakterien, Viren, Mykoplasma oder Pilzen kontaminiert sein.

Funktionale Bedingungen

Viabilität

19. Die Größenordnung der Viabilität wird mit der MTT-Prüfung bestimmt (31). Die lebensfähigen Zellen des RhE-Gewebemodells können den lebenswichtigen Farbstoff MTT zu einem blauen MTT-Formazan-Niederschlag reduzieren, der dann mit Isopropanol (oder einem ähnlichen Lösungsmittel) aus dem Gewebe extrahiert wird. Die optische Dichte (OD) des Extraktionslösungsmittels allein sollte ausreichend gering sein, d. h. OD < 0,1. Das extrahierte MTT-Formazan kann durch eine Standard-(OD)-Absorptionsmessung oder mit einem HPLC/UPLC-Spektrometrieverfahren (36) quantifiziert werden. Die Anwender des RhE-Modells sollten sicherstellen, dass jede Charge des verwendeten Modells die vorgegebenen Kriterien für die Negativkontrolle erfüllt. Der Entwickler/Hersteller des Hautmodells sollte eine Akzeptanzspanne (oberer und unterer Grenzwert) für die OD-Werte der Negativkontrolle (unter den Bedingungen der Prüfmethode zur Untersuchung von Hautreizungen) festlegen. Die Akzeptanzspanne der OD-Werte für die vier validierten RhE-Prüfmodelle dieser Prüfmethode sind Tabelle 2 zu entnehmen. Bei Durchführung einer HPLC/UPLC-Spektrophotometrie sollten die in Tabelle 2 genannten OD-Spannen der Negativkontrolle als Akzeptanzkriterium für die Negativkontrolle verwendet werden. Es sollte dokumentiert werden, dass die mit der Negativkontrolle behandelten Gewebe über den gesamten Expositionszeitraum stabil bleiben (bzw. vergleichbare Viabilitätsmessungen ergeben).

Tabelle 2

Akzeptanzbereiche für OD-Werte der Negativkontrolle der Prüfmodelle dieser Prüfmethode

	Untere Akzeptanzgrenze	Obere Akzeptanzgrenze
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

Barrierefunktion

20. Das *stratum corneum* und die Zusammensetzung seiner Fette sollten das schnelle Eindringen zytotoxischer Referenzchemikalien wie z. B. SDS oder Triton X-100 verhindern. Dies ist anhand der Werte für IC_{50} oder ET_{50} abzuschätzen (Tabelle 3).

Morphologie

21. Bei der histologischen Untersuchung des RhE-Modells sollte nachgewiesen werden, dass das Modell eine der menschlichen Epidermis ähnliche Struktur (einschließlich mehrlagigem *stratum corneum*) aufweist.

Reproduzierbarkeit

22. Die Ergebnisse der Positivkontrolle und der Negativkontrollen der Prüfmethode sollen die Reproduzierbarkeit über längere Zeit belegen.

Qualitätskontrolle (QK)

23. Das RhE-Modell sollte nur dann verwendet werden, wenn der Entwickler/Hersteller nachweist, dass jede Charge des verwendeten Hautmodells bestimmten Freigabekriterien genügt, von denen die Kriterien der *Viabilität* (Nummer 19), der *Barrierefunktion* (Nummer 20) und der *Morphologie* (Nummer 21) die wichtigsten sind. Diese Daten sollten den Benutzern der Prüfmethode zur Verfügung gestellt werden, damit diese sie in ihre Prüfberichte aufnehmen können. Der Entwickler/Hersteller des Hautmodells (oder – bei Verwendung eines hauseigenen Modells – der Prüfer) sollte eine Akzeptanzspanne (oberer und unterer Grenzwert) für IC_{50} bzw. ET_{50} festlegen. Nur mit geeigneten Geweben erzielte Ergebnisse können für eine zuverlässige Vorhersage für die Einstufung von Reizwirkungen akzeptiert werden. Die Akzeptanzspanne der vier RhE-Prüfmodelle dieser Prüfmethode sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3

Beispiele für Chargenfreigabekriterien der Prüfmodelle dieser Prüfmethode im Rahmen der Qualitätskontrolle

	Untere Akzeptanzgrenze	Obere Akzeptanzgrenze
EpiSkin™ (SM) (18-stündige Behandlung mit SDS) (32)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (33)	ET_{50} = 4,0 h	ET_{50} = 8,7 h
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 h	ET_{50} = 10,0 h
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18-stündige Behandlung mit SDS) (35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

Applikation der Prüf- und Kontrollchemikalien

24. Für jede Prüfchemikalie und für die Kontrollen bei jedem Prüflauf sollten mindestens drei Replikate verwendet werden. Bei flüssigen und festen Chemikalien sollte eine ausreichende Menge der Prüfchemikalie gleichmäßig auf die gesamte Oberfläche der Epidermis aufgetragen werden; überschüssige Dosen sind zu vermeiden, d. h. es sollten 26 bis 83 µl/cm^2 bzw. mg/cm^2 verwendet werden (siehe Anlage 3). Bei festen Chemikalien sollte die Epidermis-Oberfläche vor der Applikation mit deionisiertem oder destilliertem Wasser angefeuchtet werden, um guten Hautkontakt zu gewährleisten. Feststoffe sollten nach Möglichkeit als Feinpulver geprüft werden. In manchen Fällen kann ein Nylon-Maschenfilter zum gleichmäßigen Verteilen verwendet werden (siehe Anlage 3). Am Ende der Expositionszeit sollte die Prüfchemikalie mit wässriger Pufferlösung oder 0,9 % NaCl von der Hautoberfläche abgewaschen werden. Je nach verwendeten RhE-Prüfmodellen betragen die Expositionszeiträume zwischen 15 und 60 Minuten bei einer Inkubationstemperatur zwischen 20 und 37 °C. Diese Expositionszeiträume und -temperaturen wurden für die jeweiligen RhE-Prüfmethoden optimiert und tragen den unterschiedlichen inhärenten Merkmalen der Prüfmodelle (z. B. der Barrierefunktion) Rechnung (siehe Anlage 3).

25. Bei jedem Prüflauf sollten gleichzeitig Negativkontrollen und Positivkontrollen (PK) verwendet werden, um nachweisen zu können, dass die Viabilität (mit der NK), die Barrierefunktion und die daraus resultierende Empfindlichkeit der Gewebe (mit der PK) innerhalb einer vorgegebenen historischen Akzeptanzspanne liegen. Als PK-Chemikalie wird 5 %iges wässriges SDS empfohlen. Als NK empfehlen sich Wasser oder Phosphatpuffer (PBS).

Zellviabilitätsmessungen

26. Bei dem Prüfverfahren ist von wesentlicher Bedeutung, dass die Viabilitätsmessung nicht unmittelbar nach der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie, sondern nach einer ausreichend langen Inkubationszeit des gewaschenen Gewebes (nach der Behandlung) in einem frischen Medium erfolgt. Während dieser Zeit kann sich das Gewebe von milden zytotoxischen Wirkungen erholen bzw. deutliche zytotoxische Effekte können sich herausbilden. Bei der Optimierung von zwei der RhE-Prüfmodelle dieser Prüfmethode hat sich eine 42-stündige Inkubation nach der Behandlung als optimal erwiesen (11) (12) (13) (14) (15).

27. Die MTT-Prüfung ist eine standardisierte quantitative Methode, die zur Messung der Zellviabilität nach dieser Prüfmethode angewandt werden sollte. Sie ist zur Anwendung in einem dreidimensionalen Gewebemodell geeignet. Die Gewebeprobe wird für 3 Stunden in eine MTT-Lösung mit geeigneter Konzentration (z. B. 0,3-1 mg/ml) gelegt. Das MTT wird von den lebensfähigen Zellen in blaues Formazan umgewandelt. Der blaue Formazan-Niederschlag wird sodann mit Hilfe eines Lösungsmittels (z. B. Isopropanol, Säure-Isopropanol) aus dem Gewebe extrahiert, und die Formazankonzentration wird durch Bestimmung des OD-Werts bei 570 nm innerhalb einer Filter-Bandbreite von maximal ± 30 nm oder mit einem HPLC/UPLC-Spektrophotometrieverfahren gemessen (Nummer 34) (36).

28. Optische Eigenschaften der Prüfchemikalie oder ihre chemische Wirkung auf MTT (z. B. die Tatsache, dass Chemikalien Färbungen nicht nur bewirken, sondern auch verhindern oder umkehren können) können die Versuche beeinträchtigen und damit zu falschen Viabilitätsschätzungen führen. Dies kann der Fall sein, wenn eine bestimmte Prüfchemikalie nicht komplett von dem Gewebe abgewaschen wurde oder wenn sie in die Epidermis eindringt. Wirkt sich die Prüfchemikalie unmittelbar auf MTT aus (MTT-Reduktionsmittel), ist sie natürlich gefärbt oder verfärbt sie sich während der Gewebebehandlung, so sollten zum Nachweis und zur Korrektur einer etwaigen Interferenz der Prüfchemikalie mit der Viabilitätsmesstechnik zusätzliche Kontrollen verwendet werden (Nummern 29 und 33). Für eine genaue Beschreibung der richtigen Durchführung der Korrektur der direkten MTT-Reduktion und der Interferenzen durch Färbemittel siehe die Standardarbeitsanweisungen für die vier validierten Prüfmodelle dieser Prüfmethode (32) (33) (34) (35).

29. Um direkte MTT-Reduktionsmittel zu identifizieren, sollten die Prüfchemikalien jeweils zu frisch hergestellter MTT-Lösung hinzugegeben werden. Wenn sich das MTT-Gemisch mit der Prüfchemikalie blau/violett verfärbt, ist davon auszugehen, dass die Prüfchemikalie das MTT direkt reduziert; anschließend sollte unabhängig von der Durchführung der Standardabsorptions-(OD-)Messung oder einer HPLC/UPLC-Spektrophotometrie eine weitere Funktionsprüfung der nicht lebensfähigen RhE-Gewebe vorgenommen werden. Bei dieser zusätzlichen Funktionsprüfung werden abgetötete Gewebe mit nur noch residualer metabolischer Aktivität eingesetzt, die die Prüfchemikalie in ähnlicher Weise wie lebensfähige Gewebe absorbieren. Jede MTT reduzierende Prüfchemikalie wird auf mindestens zwei abgetötete Gewebereplikate aufgetragen, die dem gesamten Prüfverfahren unterzogen werden, um eine nicht spezifische MTT-Reduktion (NSMTT) zu bewirken (32) (33) (34) (35). Pro Prüfchemikalie ist unabhängig von der Anzahl der durchgeführten unabhängigen Prüfungen/Prüfläufe eine einzelne NSMTT-Kontrolle ausreichend. Anschließend wird die tatsächliche Viabilität des Gewebes als Prozentanteil der bei lebenden Geweben nach Exposition gegenüber dem MTT-Reduktionsmittel gemessenen Viabilität abzüglich des Prozentanteils der nicht spezifischen MTT-Reduktion durch dasselbe MTT-Reduktionsmittel bei abgetöteten Geweben bezogen auf die gleichzeitig mit der zu korrigierenden Prüfung durchgeführte Negativkontrolle (%NSMTT) berechnet.

30. Um potenzielle Interferenzen durch Prüffarbstoffe oder durch Prüfchemikalien zu ermitteln, die sich verfärben, wenn sie mit Wasser oder mit Isopropanol in Berührung kommen, und um über die Notwendigkeit weiterer Kontrollen entscheiden zu können, sollte die Prüfchemikalie in Wasser (Umgebung während der Exposition) und/oder Isopropanol (Extraktionslösung) einer Spektralanalyse unterzogen werden. Wenn die Prüfchemikalie in Wasser und/oder Isopropanol Licht im Bereich von 570 ± 30 nm absorbiert, sollten weitere Farbkontrollen durchgeführt oder eine HPLC/UPLC-Spektrophotometrie vorgenommen werden. Im letztgenannten Fall sind diese Kontrollen nicht erforderlich (Nummern 33 und 34). Bei Durchführung der Standardabsorptions-(OD-)Messung wird jeder interferierende Prüffarbstoff auf mindestens zwei lebensfähige Gewebereplikate aufgetragen; diese Replikate werden dem vollständigen Prüfverfahren unterzogen, aber während der MTT-Inkubation nicht mit der MTT-Lösung, sondern mit einem Medium inkubiert, um eine nicht spezifische Farbkontrolle (NSC_{lebend}) herzustellen. Die NSC_{lebend}-Kontrolle muss gleichzeitig mit der Prüfung der gefärbten Prüfchemikalie durchgeführt werden, und bei mehreren Prüfungen ist wegen der inhärenten biologischen Variabilität lebender Gewebe für jede durchgeführte Prüfung (bei jedem Prüflauf) eine unabhängige NSC_{lebend}-Kontrolle durchzuführen. Die tatsächliche Viabilität des Gewebes wird dann als Prozentanteil der ermittelten Viabilität bei lebendem Gewebe nach der Exposition gegenüber der interferierenden Prüfchemikalie und nach Inkubation mit der MTT-Lösung abzüglich des Prozentanteils der nicht spezifischen Farbe berechnet, die bei gleichzeitig mit der zu korrigierenden Prüfung untersuchten lebenden Geweben nach Exposition gegenüber der interferierenden Prüfchemikalie und nach Inkubation mit einem Medium ohne MTT entstanden ist ($\%NSC_{lebend}$).

31. Wenn festgestellt wurde, dass Prüfchemikalien sowohl eine direkte MTT-Reduktion (Nummer 29) als auch Farbinterferenzen (Nummer 30) bewirken, wird bei der Durchführung der Standardabsorptions-(OD-)Messung neben den in vorstehenden Nummern beschriebenen Kontrollen (NSMTT und NSC_{lebend}) eine dritte Kontrollreihe benötigt. Dies ist gewöhnlich bei dunklen Prüfchemikalien der Fall, die beim MTT-Versuch Interferenzen verursachen (z. B. blau, violett oder schwarz), weil deren Fähigkeit zur direkten MTT-Reduktion durch die inhärente Farbqualität dieser Chemikalien beeinträchtigt wird (Nummer 29). Diese Prüfchemikalien können Bindungen sowohl mit lebenden als auch mit abgetöteten Geweben eingehen. Daher kann bei der NSMTT-Kontrolle eine Korrektur nicht nur der potentiellen direkten MTT-Reduktion durch die Prüfchemikalie, sondern auch der Farbinterferenz infolge der Bindung der Prüfchemikalie an abgetötete Gewebe erfolgen. Dies kann eine doppelte Korrektur der Farbinterferenz zur Folge haben, da

mit der NSC_{lebend}-Kontrolle bereits die Farbinterferenz aufgrund der Bindung der Prüfchemikalie an lebende Gewebe erfolgt. Um eine mögliche doppelte Korrektur von Farbinterferenzen zu vermeiden, muss eine dritte Kontrolle mit nicht spezifischen Farben mit abgetöteten Geweben ($NSC_{abgetötet}$) untersucht werden. Bei dieser zusätzlichen Kontrolle wird die Prüfchemikalie auf mindestens zwei abgetötete Gewebereplikate aufgetragen, die dem vollständigen Prüfverfahren zu unterziehen sind, wobei die Gewebe jedoch während der MTT-Inkubation nicht mit der MTT-Lösung, sondern mit einem Medium inkubiert werden. Unabhängig von der Anzahl der durchgeführten unabhängigen Prüfungen/Prüfläufe ist pro Prüfchemikalie eine einzige $NSC_{abgetötet}$-Kontrolle hinreichend. Diese Kontrolle sollte jedoch gleichzeitig mit der NSMTT-Kontrolle sowie möglichst mit derselben Gewebecharge durchgeführt werden. Die tatsächliche Viabilität des Gewebes wird dann als Prozentanteil der ermittelten Viabilität bei lebendem Gewebe nach der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie abzüglich %NSMTT und abzüglich $\%NSC_{lebend}$ zuzüglich des Prozentanteils der nicht spezifischen Farbe berechnet, die nach Exposition der abgetöteten Gewebe gegenüber der interferierenden Prüfchemikalie und nach Inkubation mit einem Medium ohne MTT entstanden ist; dieser Prozentanteil wird bezogen auf die gleichzeitig mit der zu korrigierenden Prüfung untersuchte Kontrolle ($\%NSC_{abgetötet}$) ermittelt.

32. Wichtig ist die Feststellung, dass nicht spezifische MTT-Reduktionen und nicht spezifische Farbinterferenzen bei den Gewebextrakten Ergebnisse oberhalb der Linearitätsspanne des Photospektrometers begünstigen können. Daher sollte jedes Labor vor der Untersuchung von Prüfchemikalien für rechtliche Zwecke die Linearitätsspanne seines Spektrophotometers mit im Handel bezogenem MTT-Formazan (CAS-Nr. 57360-69-7) ermitteln. Durch die Standardabsorptions-(OD-)Messung mit einem Spektrophotometer können direkte MTT-Reduktionsmittel und Farbinterferenzen verursachende Prüfchemikalien in den Fällen untersucht werden, in denen die mit einer Prüfchemikalie ermittelten und nicht um die direkte MTT-Reduktion und/oder um Farbinterferenzen korrigierten ODs der Gewebeextrakte innerhalb der Linearitätsspanne des Spektrophotometers liegen oder in denen der nicht korrigierte Prozentanteil der Viabilität der Prüfchemikalie bereits ≤ 50 % ist. Ergebnisse bei Prüfchemikalien mit %NSMTT und/oder $\%NSC_{lebend}$ > 50 % der Negativkontrolle sind jedoch mit Sorgfalt zu bewerten, da dies der Schwellenwert ist, nach dem zwischen klassifizierten und nicht klassifizierten Chemikalien unterschieden wird (Nummer 36).

33. Wenn die Ergebnisse von Prüffarbstoffen wegen übermäßiger Interferenzen beim MTT-Versuch mit der Standardabsorptions-(OD-)Messung nicht vereinbar sind, kann alternativ MTT-Formazan durch HPLC/UPLC-Spektrophotometrie gemessen werden (Nummer 34) (36). Bei der HPLC/UPLC-Spektrophotometrie kann das MTT-Formazan vor der Quantifizierung von der Prüfchemikalie getrennt werden (36). Daher werden unabhängig von der zu prüfenden Chemikalie keine NSC_{lebend}- oder $NSC_{abgetötet}$-Kontrollen benötigt, wenn eine HPLC/UPLC-Spektrophotometrie vorgenommen wird. NSMTT-Kontrollen sollten jedoch verwendet werden, wenn vermutet wird, dass eine Prüfchemikalie MTT direkt reduziert oder wenn die Farbe einer Prüfchemikalie die Beurteilung ihrer Fähigkeit zur direkten MTT-Reduktion beeinträchtigt (Nummer 29). Wenn MTT-Formazan durch HPLC/UPLC-Spektrophotometrie gemessen wird, ist der Prozentanteil der Viabilität des Gewebes als Prozentanteil der MTT-Formazan-Peak-Fläche, die mit lebenden Geweben nach Exposition gegenüber der Prüfchemikalie ermittelt wurde, bezogen auf die MTT-Formazan-Peak-Fläche der gleichzeitigen Negativkontrolle zu berechnen. Bei Prüfchemikalien, die MTT direkt reduzieren können, wird die tatsächliche Gewebeviabilität als Prozentanteil der Gewebeviabilität von lebenden Geweben nach der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie abzüglich %NSMTT berechnet. Und schließlich ist festzustellen, dass auch direkte MTT-Reduktionsmittel (die nach der Behandlung in den Geweben gebunden sein und MTT so stark reduzieren können, dass es (bei Standard-OD-Messungen) zu ODs oder (bei der Untersuchung der Gewebeextracte durch UPLC-/HPLC-Spektrophotometrie) zu Peakflächen außerhalb der Linearitätsspanne des Spektrophotometers und zu Farbinterferenzen kommen kann) nicht bewertet werden können. Solche Fälle sind allerdings sehr selten.

34. MTT-Formazan-Messungen können bei allen Arten von Prüfchemikalien (gefärbt, nicht gefärbt, MTT-Reduktionsmittel und Mittel, die keine MTT-Reduktion bewirken) auch durch HPLC/UPLC-Spektrophotometrie vorgenommen werden (36). Wegen der Vielfalt der HPLC/UPLC-Spektrophotometriesysteme sollte die Eignung des jeweiligen HPLC/UPLC-Spektrophotometriesystems vor der Verwendung zur Quantifizierung von MTT-Formazan in Gewebextrakten durch Erfüllung der Akzeptanzkriterien für eine Reihe von Standard-Qualifikationsparametern auf der Grundlage der Branchenleitlinien der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) für die Validierung bioanalytischer Methoden nachgewiesen werden (36)(37). Diese Schlüsselparameter sowie die jeweiligen Akzeptanzkriterien sind Anlage 4 zu entnehmen. Wenn die in Anlage 4 beschriebenen Akzeptanzkriterien erfüllt sind, wird das betreffende HPLC/UPLC-Spektrophotometriesystem als geeignet für die Messung von MTT-Formazan unter den in dieser Prüfmethode beschriebenen Versuchsbedingungen betrachtet.

Akzeptanzkriterien

35. Bei jeder Prüfung mit validen Chargen des betreffenden RhE-Modells (siehe Absatz 23) sollten mit der Negativkontrolle behandelte Gewebe OD-Werte aufweisen, die die Gewebequalität nach abgeschlossenen Beförderungs- und Annahmevorgängen und sämtlichen Schritten des Protokolls belegen. Die OD-Werte der Kontrollen sollten nicht unter historisch etablierten unteren Grenzwerten liegen. Ähnlich sollte auch nachgewiesen werden, dass mit der PK, d. h. mit 5 %igem wässrigen SDS, behandelte Gewebe unter den Bedingungen der Prüfmethode (siehe Anlage 3 sowie die Standardarbeitsanweisungen für die vier Prüfmodelle dieser Prüfmethode (32) (33) (34) (35)) auf eine hautreizende Chemikalie reagieren können. Entsprechende und geeignete Maße der Variabilität zwischen Gewebereplikaten (d. h. Standardabweichungen (SD)) sollten innerhalb der für das verwendete Prüfmodell festgelegten Akzeptanzgrenzen liegen (siehe Anlage 3).

Auswertung der Ergebnisse und Prädiktionsmodell

36. Die für jede Prüfchemikalie erhaltenen OD-Werte können zur Berechnung einer prozentualen Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle, die auf 100 % festgesetzt ist, herangezogen werden. Wenn eine HPLC/UPLC-Spektrophotometrie durchgeführt wird, ist der Prozentanteil der Viabilität des Gewebes als Prozentanteil der MTT-Formazan-Peak-Fläche, die mit lebenden Geweben nach Exposition gegenüber der Prüfchemikalie ermittelt wurde, bezogen auf die MTT-Formazan-Peak-Fläche der gleichzeitigen Negativkontrolle zu berechnen. Der Grenzwert der prozentualen Zellviabilität, der zwischen Reizstoff und bisher nicht klassifizierten Prüfchemikalien unterscheidet, und das (die) statistische(n) Verfahren zur Auswertung der Ergebnisse und zur Identifizierung von Reizstoffen sollten genau definiert und dokumentiert werden und nachweislich geeignet sein (weitere Informationen siehe Standardarbeitsanweisungen zu den Prüfmodellen). Die Grenzwerte für die Vorhersage der Reizung sind nachstehend angegeben:

— Für die Prüfchemikalie ist festzustellen, dass eine Einstufung und Kennzeichnung nach dem UN GHS bzw. der CLP-Verordnung (Kategorie 2 oder Kategorie 1) erforderlich ist, wenn die prozentuale mittlere Gewebeviabilität nach der Exposition und der Inkubation nach der Behandlung kleiner oder gleich (≤) 50 % ist. Da die RhE-Prüfmodelle dieser Prüfmethode nicht zwischen den UN-GHS-/CLP-Kategorien 1 und 2 unterscheiden können, werden weitere Informationen über Hautverätzungen benötigt, um über die endgültige Einstufung der Chemikalien zu entscheiden [siehe auch OECD-Leitliniendokument zu IATA (3)]. Wenn festgestellt wird, dass die Prüfchemikalie nicht ätzend ist (z. B. mit den Prüfmethoden 40, B.40bis oder B.65) und die Gewebeviabilität nach der Exposition und nach Inkubation nach der Behandlung kleiner oder gleich (≤) 50 % ist, wird die Prüfchemikalie als hautreizend nach UN-GHS-/CLP-Kategorie 2 betrachtet.

— Je nach dem Rechtsrahmen der Mitgliedstaaten gilt die Prüfchemikalie als nicht hautreizend im Sinne der Kategorie Keine Einstufung nach UN GHS/CLP, wenn die Gewebeviabilität nach der Exposition und der Inkubation nach der Behandlung mehr als (>) 50 % beträgt.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

37. Für jeden Prüflauf sollten Daten aus einzelnen Replikatgeweben (z. B. OD-Werte und Daten über die berechnete prozentuale Zellviabilität für jede Prüfchemikalie, einschließlich Einstufung), gegebenenfalls auch Daten aus Wiederholungsversuchen, tabellarisch zusammengefasst werden. Darüber hinaus sollten für jeden Prüflauf die Mittelwerte ± Standardabweichung übermittelt werden. Außerdem sollten für jede geprüfte Chemikalie festgestellte Interaktionen mit dem MTT-Reagens und Prüffarbstoffen berichtet werden.

Prüfbericht

38. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalien und Kontrollchemikalien

— Einkomponentiger Stoff: chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;

— mehrkomponentiger Stoff, UVCB und Gemische: So weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten;

— physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;

— Herkunft, Chargennummer, sofern vorhanden;

— Behandlung der Prüf-/Kontrollchemikalien vor der Prüfung, sofern relevant (z. B. Erwärmen, Mahlen);

— Stabilität der Prüfchemikalie, letztes Verwendungsdatum oder Datum für erneute Analyse, soweit bekannt;

— Lagerungsbedingungen.

Verwendetes RhE-Modell und verwendetes Protokoll und Gründe für die Auswahl (wenn relevant)

Prüfbedingungen:

— Verwendetes RhE-Modell (einschließlich Chargennummer);

— Eichdaten für das zur Messung der Zellviabilität verwendete Messgerät (z. B. Spektrophotometer), Wellenlänge und Bandbreite (wenn relevant) für die Quantifizierung von MTT-Formazan und die Linearitätsspanne des Messgeräts; Beschreibung der Methode zur Quantifizierung von MTT-Formazan;

— Beschreibung der Qualifizierung des HPLC/UPLC-Spektrophotometriesystems (wenn relevant); umfassende Begleitdokumentation für das betreffende Hautmodell, einschließlich seiner Leistung. Diese sollte unter anderem die folgenden Aspekte beinhalten:

  i) Viabilität;

  ii) Barrierefunktion;

  iii) Morphologie;

  iv) Reproduzierbarkeit und Vorhersagbarkeit;

  v) Qualitätskontrollen (QK) des Modells;

— Verweis auf historische Modelldaten. Dabei sollte unter anderem die Akzeptanz der QK-Daten unter Einbeziehung historischer Chargendaten berücksichtigt werden;

— Nachweis der Befähigung zur Durchführung der Prüfmethode vor der regelmäßigen Verwendung durch die Prüfung von Leistungsstoffen.

Prüfverfahren:

— Details zum verwendeten Prüfverfahren (einschließlich verwendeter Waschverfahren nach dem Expositionszeitraum); Dosierung der Prüfchemikalien und der Kontrollen;

— Expositionszeitraum und -temperatur und Inkubationszeitraum nach der Exposition;

— Angabe verwendeter Kontrollen für direkte MTT-Reduktionsmittel und/oder Prüffarbstoffe (wenn relevant);

— Anzahl der pro Prüfchemikalie und pro Kontrolle (PK, Negativkontrolle und NSMTT, NSC_{lebend} und $NSC_{abgetötet}$, wenn relevant) und der verwendeten Gewebereplikate;

— Beschreibung der berücksichtigten Entscheidungskriterien und des verwendeten Vorhersagemodells auf der Grundlage des verwendeten RhE-Modells;

— Beschreibung etwaiger Änderungen der Prüfverfahren (einschließlich Waschverfahren).

Akzeptanzkriterien für Prüfläufe und Prüfungen:

— Mittelwerte und Akzeptanzspannen der Positiv- und der Negativkontrollen auf der Grundlage historischer Daten; akzeptable Variabilität zwischen Gewebereplikaten für Positiv- und Negativkontrollen;

— akzeptable Variabilität zwischen Gewebereplikaten für die Prüfchemikalie.

Ergebnisse:

— Tabellarische Darstellung der Daten für die einzelnen Prüfchemikalien, für die einzelnen Prüfläufe und Replikatmessungen einschließlich OD bzw. MTT-Formazan-Peakfläche, prozentuale Gewebeviabilität, mittlere prozentuale Gewebeviabilität und Standardabweichungen;

— gegebenenfalls Ergebnisse verwendeter Kontrollen für direkte MTT-Reduktionsmittel und/oder Prüffarbstoffe einschließlich OD oder MTT-Formazan-Peakflächen, %NSMTT, $\%NSC_{lebend}$, $\%NSC_{abgetötet}$, Standardabweichung und endgültige korrigierte prozentuale Gewebeviabilität;

— mit der Prüfchemikalie (den Prüfchemikalien) und den Kontrollen ermittelte Ergebnisse bezogen auf die definierten Akzeptanzkriterien für Prüfläufe und Prüfungen;

— Beschreibung anderer beobachteter Wirkungen;

— abgeleitete Einstufung mit Bezug auf das Vorhersagemodell und/oder angewandte Entscheidungskriterien.

Erörterung der Ergebnisse

Schlussfolgerungen

LITERATUR

(1) Vereinte Nationen (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), fünfte überarbeitete Ausgabe, UN New York und Genf, 2013. Abrufbar unter:http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) EURL-ECVAM (2009). Erklärung zur „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", herausgegeben vom Wissenschaftlich Beratenden Ausschuss (ESAC) des ECVAM (ESAC31), 9. April 2009. Abrufbar unter: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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(4) Kapitel B.4 dieses Anhangs, Akute Hautreizung/-verätzung.

(5) Kapitel B.40 dieses Anhangs, *In-vitro*-Hautverätzung: TER-Prüfmethode.

(6) Kapitel B.40bis dieses Anhangs, *In-vitro*-Hautverätzung: Prüfmethode mit rekonstruierter humaner Epidermis (RHE).

(7) Kapitel B.65 dieses Anhangs, *In-vitro*-Methode zur Untersuchung der Membranbarriere.

(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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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. und 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. und 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. und 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. und 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. und Rubinsteen, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329-349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. und 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. und Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.

(17) Hoffmann, S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α.

(18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. und Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603-619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. und 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. Abrufbar unter: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. *Hinweis: Dies sind die ursprünglichen Leistungsstandards für die Validierung von zwei Prüfmethoden. Diese Leistungsstandards sollten nicht mehr verwendet werden, da inzwischen eine aktualisierte Fassung (8) verfügbar ist.*

(22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5. November 2008.https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf.

(23) OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 137), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. und 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. und 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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. und 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. und 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., u. a. (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™ (Februar 2009). SOP, Version 1.8ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals

(33) EpiDerm™ (geändert im März 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. und 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. Manuskript in Vorbereitung.

(37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Mai 2001. Abrufbar unter:[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

(38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K. und Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, in: Practical Contact Dermatitis, S. 7-18 (Hrsg. 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). *Hinweis: Dies ist die aktuelle Fassung der ECVAM-Leistungsstandards, aktualisiert im Jahr 2009 angesichts der Einführung des UN GHS. Diese Leistungsstandards sollten nicht mehr verwendet werden, da inzwischen eine aktualisierte Fassung (8) verfügbar ist.*

(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. Juli 2009.

(41) EG (2001). Richtlinie 2001/59/EG der Kommission vom 6. August 2001 zur 28. Anpassung der Richtlinie 67/548/EWG des Rates zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe an den technischen Fortschritt, Amtsblatt der Europäischen Union L 255, S. 1.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Chemikalie: Ein Stoff oder ein Gemisch.

Einkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens 80 % w/w vorliegt.

Ersatzprüfung: Eine Prüfung, die eine routinemäßig angewandte Prüfung zur Identifikation von Gefahren und/oder zur Risikobewertung ersetzen soll, und die im Vergleich zur akzeptierten Prüfung nachweislich in allen möglichen Prüfsituationen und mit allen Stoffen einen gleichwertigen oder besseren Schutz der Gesundheit von Mensch oder Tier oder der Umwelt gewährleistet, je nachdem, was zutrifft (9).

ET_{50}: Kann durch Ermittlung der Expositionszeit abgeschätzt werden, die erforderlich ist, um die Zellviabilität bei Anwendung der Referenzchemikalie in vorgegebener fester Konzentration um 50 % zu reduzieren; siehe auch IC_{50}.

Gemisch: Ein Gemisch oder eine Lösung, die aus zwei oder mehr Stoffen besteht.

Genauigkeit: Anteil aller positiven/aktiven Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt klassifiziert werden. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von ‚Übereinstimmung' verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (9).

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung) der Vereinten Nationen (UN): Ein System zur Klassifizierung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) nach standardisierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und ökologischer Gefahren und zur entsprechenden Kennzeichnung durch Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenhinweise, Sicherheitshinweise und Sicherheitsdatenbögen, um zum Schutz des Menschen (einschließlich Arbeitgeber, Arbeiter, Spediteure, Verbraucher und Notfall-Einsatzkräfte) und der Umwelt Informationen über die schädlichen Wirkungen der betreffenden Chemikalien zu verbreiten (1).

Hautreizung *in vivo*: Das Auslösen einer reversiblen Hautschädigung nach Applikation einer Prüfchemikalie für die Dauer von bis zu 4 Stunden. Eine Hautreizung ist eine lokal auftretende Reaktion des betroffenen Hautgewebes, die kurz nach der Stimulation eintritt (38). Sie wird durch eine lokale Entzündungsreaktion unter Beteiligung des angeborenen (nicht spezifischen) Immunsystems des Hautgewebes verursacht. Ihr Hauptmerkmal ist ihr umkehrbarer Prozess, der mit Entzündungsreaktionen und den bei Entzündungen gängigsten klinischen Reizsymptomen (Erythema, Ödeme, Juckreiz und Schmerzen) einhergeht.

HPLC: Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie.

IATA: Integrated Approach to Testing and Assessment = integrierter Prüfungs- und Bewertungsansatz.

IC_{50}: Kann durch Ermittlung der Konzentration abgeschätzt werden, bei der eine Referenzchemikalie die Viabilität der Gewebe nach einer vorgegebenen Expositionszeit um 50 % (IC_{50}) reduziert; siehe auch ET_{50}.

Leistungsstandards (PS): Auf einer validierten Prüfmethode beruhende Normen, auf deren Grundlage die Vergleichbarkeit einer vorgeschlagenen, mechanistisch und funktionell ähnlichen Prüfmethode bewertet werden kann. Sie umfassen (i) wesentliche Elemente der Prüfmethode; (ii) ein Mindestverzeichnis von Referenzchemikalien, ausgewählt aus den Chemikalien, die zum Nachweis der akzeptablen Leistung der validierten Referenzmethode verwendet werden; und (iii) je nach den für die validierte Referenzmethode erzielten Ergebnissen die vergleichbaren Genauigkeits- und Zuverlässigkeitswerte, die die vorgeschlagene Prüfmethode bei der Bewertung anhand des Mindestverzeichnisses von Referenzchemikalien demonstrieren sollte (9).

Mehrkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens ≥ 10 % w/w und < 80 % w/w vorliegt. Ein mehrkomponentiger Stoff ist das Ergebnis eines Herstellungsprozesses. Der Unterschied zwischen einem Gemisch und einem mehrkomponentigen Stoff besteht darin, dass ein Gemisch durch die Mischung von zwei oder mehr Stoffen ohne chemische Reaktion entsteht. Ein mehrkomponentiger Stoff wird durch eine chemische Reaktion gebildet.

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; Thiazolyl-Blau-Tetrazoliumbromid.

$NSC_{abgetötet}$: Nicht spezifische Farbkontrolle mit abgetöteten Geweben.

NSC_{lebend}: Nicht spezifische Farbkontrolle mit lebenden Geweben.

NSMTT: Nicht spezifische MTT-Reduktion.

PK: Positivkontrolle, ein Replikat, das alle Komponenten eines Prüfsystems enthält und mit einer Chemikalie behandelt wird, die bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Um sicherzustellen, dass Abweichungen bei der Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

Prüflauf: Ein Prüflauf besteht aus einer oder mehreren Prüfchemikalien, die gleichzeitig mit einer Negativ- und einer Positivkontrolle geprüft werden.

Relevanz: Dieser Begriff bezieht sich auf das Verhältnis zwischen der Prüfmethode und der betreffenden Wirkung und auf die Frage, ob er aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Er beschreibt das Ausmaß, in dem die Prüfung die untersuchte biologische Wirkung korrekt misst oder vorhersagt. Die Relevanz schließt eine Beurteilung der Genauigkeit (Übereinstimmung) einer Prüfmethode ein (9).

Sensitivität: Der Anteil aller positiven/wirkenden Prüfchemikalien, die durch die Prüfung korrekt eingestuft werden. Die Sensitivität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (9).

Spezifizität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Prüfchemikalien, die durch die Prüfung korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (9).

Stoff: Ein chemisches Element und seine Verbindungen in natürlicher Form oder gewonnen durch ein Herstellungsverfahren, einschließlich der zur Wahrung seiner Stabilität notwendigen Zusatzstoffe und der durch das angewandte Verfahren bedingten Verunreinigungen, aber mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können.

Übereinstimmung: Die Übereinstimmung ist ein Maß der Leistung für Prüfmodelle mit kategorialen Ergebnissen und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird gelegentlich gleichbedeutend mit Genauigkeit verwendet und als Anteil aller geprüften Chemikalien definiert, die korrekt als positiv oder negativ eingestuft werden. Die Übereinstimmung hängt in hohem Maße von der Prävalenz positiver Ergebnisse bei den Typen der untersuchten Prüfchemikalien ab (9).

Überschüssige Dosis: Die Menge der auf die Haut aufgetragenen Prüfchemikalie, die über die zur vollständigen und gleichmäßigen Bedeckung der Hautoberfläche erforderliche Menge hinausgeht.

UPLC: Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie.

UVCB: Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Zellviabilität: Parameter zur Messung der Gesamtaktivität einer Zellpopulation, z. B. Fähigkeit zellulärer mitochondrialer Dehydrogenasen, den Vitalfarbstoff MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, Thiazolyl-Blau) zu reduzieren, der je nach gemessenem Endpunkt und angewandtem Prüfkonzept der Gesamtzahl und/oder der Vitalität lebender Zellen entspricht.

Zuverlässigkeit: Beschreibung der Beziehung zwischen der Prüfung und der untersuchten Wirkung und ob die Prüfung aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Sie wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit bewertet (9).

Anlage 2

PRÜFMODELLE DIESER PRÜFMETHODE

Nr.	Prüfmodell	Art der Validierungsstudie	Literatur
1	EpiSkin™	Umfassende prospektive Validierungsstudie (2003-2007). Die Elemente dieses Modells wurden zur Beschreibung der wesentlichen Elemente der Prüfmethode der ursprünglichen und der aktualisierten ECVAM-Leistungsstandards verwendet (39) (40) (21) (*). Außerdem bildeten die Daten der Methode in Bezug auf die Unterscheidung zwischen nicht klassifizierten und klassifizierten Stoffen die wesentliche Grundlage für die Beschreibung der Spezifizitäts- und Sensitivitätswerte der ursprünglichen Leistungsstandards (*).	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*ursprünglich*): Ursprünglich wurde das Prüfmodell in den Jahren 2003-2007 gemeinsam mit Nr. 1 einer umfassenden prospektiven Validierung unterzogen. Die Elemente dieses Modells wurden zur Beschreibung der wesentlichen Elemente der Prüfmethoden der ursprünglichen und der aktualisierten ECVAM-Leistungsstandards verwendet (39) (40) (21) (*). **EpiDerm™ SIT (EPI-200):** Eine modifizierte Form des ursprünglichen Modells EpiDerm™ wurde im Jahr 2008 unter Verwendung der ursprünglichen ECVAM-Leistungsstandards validiert (21) (*)	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Validierungssstudie auf der Grundlage der ursprünglichen ECVAM-Leistungsstandards (21) im Jahr 2008 (*) .	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Validierungsstudie (2011-2012) basierend auf den Leistungsstandards (PS) der OECD TG 439 (8), die wiederum auf den aktualisierten ECVAM-PS (*) (39) (40) beruhen.	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) und PS dieser Prüfrichtlinie (8) (*)

(*) Die ursprünglichen Leistungsstandards (PS) des ECVAM (21) wurden im Jahr 2007 nach Abschluss der prospektiven Validierungsstudie (16) entwickelt, in der die Leistung der Prüfmodelle Nr. 1 und 2 im Hinblick auf das Klassifizierungssystem bewertet wurden, wie in der 28. Änderung der Gefahrstoffrichtlinie (41) beschrieben. Im Jahr 2008 wurden das UN GHS (1) eingeführt und die CLP-Verordnung der EU angenommen; damit wurde der *In-vivo*-Schwellenwert für die Unterscheidung zwischen klassifizierten und nicht klassifizierten Stoffen von 2,0 auf 2,3 angehoben. Zur Anpassung an diese geänderte rechtliche Anforderung wurden im Jahr 2009 die Genauigkeitswerte und die Liste der Referenzchemikalien aktualisiert (2) (39) (40). Ebenso wie die ursprünglichen PS beruhten auch die aktualisierten PS weitgehend auf Daten aufgrund der Modelle Nr. 1 und 2 (16). Außerdem wurden jedoch Daten zu Referenzchemikalien aus Modell Nr. 3 verwendet. Im Jahr 2010 wurden die aktualisierten ECVAM-PS als Grundlage für die Festlegung der PS für diese Prüfrichtlinie angenommen (8). Für die Zwecke dieser Prüfmethode wird EpiSkin™ als VRM betrachtet, da alle Kriterien des PS ausgehend von diesem Modell entwickelt wurden. Detaillierte Informationen über die Validierungsstudien sowie eine Zusammenstellung der generierten Daten und Hintergrundinformationen zu den erforderlichen Anpassungen der PS infolge der Einführung des UN GHS bzw. der Annahme der CLP-Verordnung sind dem erläuternden Hintergrunddokument des ECVAM/BfR zur entsprechenden OECD TG 439 zu entnehmen (23).

SIT: Prüfung auf Hautreizung

RHE: Rekonstruierte humane Epidermis

Anlage 3

SPEZIFISCHE PROTOKOLLPARAMETER DER EINZELNEN PRÜFMODELLE DIESER PRÜFMETHODE

Für die RhE-Modelle gelten sehr ähnliche Protokolle, und bei allen RhE-Modellen beträgt die Inkubationszeit nach der Behandlung 42 Stunden (32) (33) (34) (35). Die Variationen betreffen in erster Linie drei Parameter im Zusammenhang mit den verschiedenen Barrierefunktionen der Prüfmodelle: A) Vorinkubationszeit und Menge, B) Auftragung von Prüfchemikalien und C) Volumen nach der Inkubation.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Vor der Inkubation				
Inkubationszeit	18-24 Stunden	18-24 Stunden	< 2 Stunden	15-30 Stunden
Volumen des Mediums	2 ml	0,9 ml	0,3 oder 1 ml	0,5 ml
B) Auftragung der Prüfchemikalie				
Für flüssige Stoffe	10 µl (26 µl/cm^2)	30 µl oder 47 µl/cm^2)	16 µl oder 32 µl/cm^2)	25 µl oder 83 µl/cm^2)
Für feste Stoffe	10 mg (26 mg/cm^2) + DW (5 µl)	25 mg (39 mg/cm^2) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm^2) + DW (10 µl)	25 mg (83 mg/cm^2) + DW (25 µl)
Verwendung eines Nylon-Maschenfilters	Nicht verwendet	Wenn erforderlich	Aufgebracht	Nicht verwendet
Gesamtdauer der Aufbringung	15 Minuten	60 Minuten	42 Minuten	15 Minuten
Aufbringungstemperatur	Raumtemperatur (RT)	a) 25 min bei RT b) 35 min bei 37 °C	Raumtemperatur (RT)	RT
C) Volumen nach der Inkubation				
Volumen des Mediums	2 ml	0,9 ml × 2	2 ml	1 ml
D) Maximale Akzeptanzvariabilität				
Standardabweichung (SD) zwischen Gewebereplikaten	SD18	SD18	SD18	SD18

RT: Raumtemperatur
DW: destilliertes Wasser
DPBS: Dulbecco-Phosphatpuffer

Anlage 4

SCHLÜSSELPARAMETER UND AKZEPTANZKRITERIEN FÜR DIE QUALIFIZIERUNG EINES HPLC/UPLC-SPEKTROPHOTOMETRIESYSTEMS ZUR MESSUNG VON AUS RHE-GEWEBEN EXTRAHIERTEM MTT-FORMAZAN

Parameter	Protokoll abgeleitet aus FDA-Leitlinie (36) (37)	Akzeptanzkriterien
Selektivität	Analyse von Isopropanol, Blindprobe lebend (Isopropanol-Extrakt aus lebenden RhE-Geweben ohne Behandlung), Blindprobe abgetötet (Isopropanol-Extrakt aus abgetöteten RhE-Geweben ohne Behandlung)	$Fläche_{Interferenz} \leq 20\ \%\ Fläche_{LLOQ}$ [1]
Präzision	Qualitätskontrollen (d. h. MTT-Formazan bei 1,6 µg/ml, 16 µg/ml und 160 µg/ml) in Isopropanol (n=5)	VK ≤ 15 % bzw. ≤ 20 % für LLOQ
Genauigkeit	Qualitätskontrollen bei Isopropanol (n=5)	% Abw. ≤ 15 % bzw. ≤ 20 % für LLOQ
Matrixeffekt	Qualitätskontrollen bei Blindprobe lebend (n=5)	85 % ≤ Matrixeffekt % ≤ 115 %
Übertragung	Analyse Isopropanol nach einem ULOQ [2]-Standard	$Fläche_{Interferenz} \leq 20\ \%\ Fläche_{LLOQ}$
Reproduzierbarkeit (innerhalb eines Tages)	3 unabhängige Eichkurven (aufgrund von 6 aufeinander folgenden Verdünnungen von MTT-Formazan in Isopropanol im Verhältnis 1:3 beginnend mit der ULOQ, d. h. 200 µg/ml); Qualitätskontrollen bei Isopropanol (n=5)	
Reproduzierbarkeit (innerhalb eines Tages)	Tag 1: 1 Eichkurve und Qualitätskontrollen in Isopropanol (n=3) Tag 2: 1 Eichkurve und Qualitätskontrollen in Isopropanol (n=3) Tag 3: 1 Eichkurve und Qualitätskontrollen in Isopropanol (n=3)	Eichkurven: % Abw. ≤ 15 % bzw. ≤ 20 % für LLOQ Qualitätskontrollen: % Abw. ≤ 15 % und VK ≤ 15 %
Kurzzeitstabilität von MTT-Formazan in RhE-Gewebeextrakt	Qualitätskontrollen in Blindproben lebend (n=3), die am Tag der Vorbereitung sowie nach 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur analysiert wurden.	% Abw. ≤ 15 %
Langzeitstabilität von MTT-Formazan in RhE-Gewebeextrakt (erforderlichenfalls)	Qualitätskontrollen in Blindproben lebend (n=3), die am Tag der Vorbereitung sowie nach mehrtägiger Lagerung bei einer spezifizierten Temperatur (z. B. 4 °C, -20 °C, -80 °C) analysiert wurden.	% Abw. ≤ 15 %

[1] LLOQ: Untere Quantifizierungsgrenze, definiert als Gewebeviabilität von 1-2 %, d. h. 0,8 µg/ml.
[2] ULOQ: Obere Quantifizierungsgrenze, definiert als mindestens zweimal so hoch wie die erwartete MTT-Formazan-Konzentration in Isopropanol-Extrakten aus Negativkontrollen, d. h. 200 µg/ml."

(8) In Teil B werden die folgenden Kapitel angefügt:

„B.63 **SCREENING-PRÜFUNG ZUR BEWERTUNG DER REPRODUKTIONS-/ENTWICKLUNGSTOXIZITÄT**

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 421 (2016). Die OECD-Richtlinien für die Prüfung von Chemikalien werden regelmäßig unter Berücksichtigung des wissenschaftlichen Fortschritts überarbeitet. Die ursprüngliche Screening-Prüfrichtlinie 421 wurde im Jahr 1995 angenommen. Sie beruhte auf einem Protokoll für einen Vorversuch zur Bewertung der Reproduktionstoxizität, der in zwei Expertensitzungen im Jahr 1990 in London (1) und im Jahr 1992 in Tokio (2) erörtert wurde.

2. Diese Prüfmethode wurde als Folgemaßnahme der 1998 bei der OECD eingeleiteten prioritären Maßnahme zur Änderung bestehender Prüfrichtlinien und zur Entwicklung neuer Prüfrichtlinien für das Screening und die Prüfung potenzieller endokriner Disruptoren unter Festlegung von für einen endokrinen Disruptor relevanten Endpunkten aktualisiert (3). OECD TG 407 (28-Tage-Toxizitätsstudie mit wiederholter oraler Verabreichung an Nagern, Kapitel B.7 dieses Anhangs) beispielsweise wurde 2008 um geeignete Parameter zum Nachweis einer endokrinen Wirkung von Prüfchemikalien aktualisiert. Ziel der Aktualisierung von TG 421 war die Einbeziehung einiger für endokrine Disruptoren relevanter Endpunkte in Screening-TGs, bei denen die Expositionszeiträume einige der empfindlichsten Entwicklungszeiträume (Zeiträume vor oder kurz nach der Geburt) beinhalten.

3. Die ausgewählten für endokrine Disruptoren relevanten zusätzlichen Endpunkte, die Bestandteil auch von TG 443 (Erweiterte Eingenerationen-Prüfung auf Reproduktionstoxizität, Kapitel B.56 dieses Anhangs) sind, wurden auf der Grundlage einer Machbarkeitsstudie zur Untersuchung wissenschaftlicher und technischer Fragen im Zusammenhang mit deren Berücksichtigung sowie mit möglichen Anpassungen des für deren Einbeziehung erforderlichen Prüfprotokolls in TG 421 aufgenommen (4).

4. Mit dieser Prüfmethode sollen begrenzte Informationen über die Wirkungen einer Prüfchemikalie auf die Reproduktionsleistung männlicher und weiblicher Tiere (Funktion der Keimdrüsen, Paarungsverhalten, Empfängnis, Entwicklung des Conceptus, Geburt usw.) ermittelt werden. Sie ist nicht als alternative Prüfmethode und auch nicht als Ersatz für die bereits existierenden Prüfmethoden B.31, B.34, B.35 und B.56 zu betrachten.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

5. Diese Screening-Prüfmethode kann verwendet werden, um erste Informationen über mögliche reproduktions- und/oder entwicklungsrelevante Auswirkungen entweder bereits früh bei der Bewertung toxikologischer Eigenschaften von Chemikalien oder bei Besorgnis erregenden Chemikalien zu erhalten. Außerdem kann sie als Teil einer Reihe von Vorversuchen für existierende Chemikalien verwendet werden, für die nur wenig oder keinerlei toxikologische Informationen verfügbar sind, oder beispielsweise als Dosisfindungsstudie im Zusammenhang mit umfassenderen Reproduktions-/Entwicklungsstudien dienen. Bei der Prüfung sollten die im ‚OECD Guidance Document no 19 on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation' (5) genannten Grundsätze und Erwägungen beachtet werden.

6. Diese Prüfmethode liefert keine umfassenden Informationen über sämtliche Reproduktions- und Entwicklungsaspekte. Insbesondere bietet sie nur beschränkte Möglichkeiten zur Erkennung postnataler Ausprägungen einer pränatalen Exposition oder zur Feststellung von Wirkungen, die bei postnataler Exposition induziert werden können. Aufgrund (unter anderem) der verhältnismäßig geringen Anzahl an Versuchstieren in den Dosisgruppen sowie der Selektivität der Endpunkte und der kurzen Dauer der Studie werden mit dieser Methode keine Nachweise dafür erlangt, dass keine Wirkungen eintreten. Wenn keine Daten aus anderen Prüfungen zur Bewertung der Reproduktions-/Entwicklungstoxizität vorliegen, sind positive Ergebnisse zudem hilfreich für eine erste Gefährdungsabschätzung und können in Entscheidungen über die Notwendigkeit und die zeitliche Gestaltung weiterer Prüfungen beitragen.

7. Die Ergebnisse in Bezug auf die endokrinen Parameter sind im Kontext des ‚OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals' (6) auszuwerten. Dieser Conceptual Framework enthält die verbesserte OECD TG 421 in Niveau 4 als *In-vivo*-Prüfung zur Erlangung von Daten über negative Wirkungen auf endokrin relevante Endpunkte. Ein endokrin relevantes Signal kann jedoch nicht an sich als hinreichender Beleg dafür betrachtet werden, dass die betreffende Prüfchemikalie als endokriner Disruptor wirkt.

8. Bei dieser Prüfmethode wird angenommen, dass die Prüfchemikalie oral verabreicht wird. Bei anderen Expositionswegen können Änderungen erforderlich sein.

9. Bevor die Prüfmethode an einem Gemisch für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regulierungszweck verwendet wird, ist zu prüfen, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefern kann und, wenn dem so ist, warum. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs rechtlich vorgeschrieben ist.

10. Die Definitionen der verwendeten Begriffe sind Anlage 1 zu entnehmen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

11. Die Prüfchemikalie wird verschiedenen Gruppen von männlichen und weiblichen Tieren in abgestuften Dosen verabreicht. Männlichen Tieren sollte die Prüfchemikalie mindestens vier Wochen bis zum Tag vor der vorgesehenen Tötung (einschließlich) verabreicht werden. (Dieser Zeitraum umfasst mindestens zwei Wochen vor der Paarung, die Paarungszeit und etwa zwei Wochen nach der Paarung). Wegen des begrenzten Verabreichungszeitraums vor der Paarung ist die Fruchtbarkeit bei männlichen Tieren möglicherweise kein besonders empfindlicher Indikator für eine testikuläre Toxizität. Daher ist eine eingehende histologische Untersuchung der Hoden von wesentlicher Bedeutung. Die Kombination eines Verabreichungszeitraums von zwei Wochen mit anschließenden Beobachtungen des Paarungsverhaltens und der Fertilität mit einem Verabreichungszeitraum von insgesamt mindestens vier Wochen und einer anschließenden detaillierten Histopathologie der männlichen Keimdrüsen wird als ausreichend für den Nachweis der meisten Wirkungen auf die männliche Fruchtbarkeit und die Spermatogenese betrachtet.

12. Weiblichen Tieren sollte die Prüfchemikalie während der gesamten Dauer der Studie verabreicht werden. Dazu zählen zwei Wochen vor der Paarung (damit mindestens zwei vollständige Östruszyklen erfasst werden), die variable Zeit bis zur Empfängnis und die Dauer der Gravidität sowie mindestens 13 Tage nach der Geburt bis zum Tag vor der vorgesehenen Tötung (einschließlich).

13. Die Dauer der Studie nach der Eingewöhnung und einer Bewertung des Östruszyklus vor der Verabreichung der Prüfchemikalie hängt von der Leistungsfähigkeit des weiblichen Tiers ab; im Allgemeinen beträgt sie etwa 63 Tage [mindestens 14 Tage vor der Paarung, (bis zu) 14 Tage Paarungszeit, 22 Tage Gravidität, 13 Tage Laktation].

14. Während des Verabreichungszeitraums werden die Tiere täglich sorgfältig auf Toxizitätszeichen beobachtet. Tiere, die während der Dauer der Prüfung sterben, und vorzeitig getötete Tiere werden seziert; die nach Abschluss der Prüfung überlebenden Tiere werden getötet und ebenfalls seziert.

BESCHREIBUNG DER METHODE

Auswahl von Versuchstierarten

15. Diese Prüfmethode ist für die Verwendung von Ratten ausgelegt. Wenn die in dieser Prüfmethode genannten Parameter an einer anderen Nagetierart untersucht werden, ist dies ausführlich zu begründen. Im internationalen Validierungsprogramm für den Nachweis von endokrinen Disruptoren in OECD TG 407 (entsprechend Kapitel B.7 in diesem Anhang) wurden ausschließlich Ratten als Versuchstiere verwendet. Stämme mit geringer Fruchtbarkeit oder bekannter hoher Häufigkeit von Entwicklungsdefekten sind nicht zu verwenden. Es sind gesunde jungfräuliche Tiere zu verwenden, die zuvor nicht in anderen Versuchen eingesetzt wurden. Die Versuchstiere sind nach Tierart, Tierstamm, Geschlecht, Gewicht und Alter auszuwählen. Bei Beginn der Studie sollten die Gewichtsunterschiede der Tiere möglichst gering sein und 20 % des geschlechtsspezifischen Durchschnittsgewichts nicht überschreiten. Wenn die Studie als Vorstudie zu einer Langzeitstudie oder einer Eingenerationsstudie durchgeführt wird, sollten in beiden Studien vorzugsweise Tiere desselben Stamms und derselben Herkunft verwendet werden.

Haltung und Fütterung

16. Bei allen Verfahren sind die örtlichen Standards der Versuchstierpflege einzuhalten. Die Temperatur im Tierversuchsraum muss 22 °C (± 3 °) betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit sollte mindestens 30 % betragen und – außer beim Reinigen des Raums - 70 % nicht überschreiten; anzustreben ist ein Wert von 50-60 %. Die Beleuchtung sollte künstlich sein, und die Hell- und Dunkelphasen sollten sich im Abstand von 12 Stunden abwechseln. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist. Die Auswahl des Futters wird eventuell dadurch beeinflusst, dass eine geeignete Beimischung der Prüfchemikalie sichergestellt werden muss, wenn die Prüfchemikalie auf diese Art verabreicht werden soll.

17. Die Tiere sollten in kleinen gleichgeschlechtlichen Gruppen untergebracht werden; sie können auch einzeln gehalten werden, wenn dies wissenschaftlich gerechtfertigt ist. Bei Gruppenhaltung sollten maximal fünf Tiere in einem Käfig untergebracht sein. Die Verpaarung erfolgt in für diesen Zweck geeigneten Käfigen. Trächtigen weiblichen Tieren sollte in Einzelhaltung Material für den Nestbau bereitgestellt werden. Säugende weibliche Tiere werden in Käfigen einzeln mit ihren Nachkommen gehalten.

18. Das Futter ist regelmäßig auf Schadstoffe zu analysieren. Eine Probe des Futters ist bis zur Fertigstellung des Abschlussberichts aufzubewahren.

Vorbereitung der Versuchstiere

19. Gesunde und geschlechtsreife junge Tiere werden randomisiert und den einzelnen Kontroll- bzw. Behandlungsgruppen zugeteilt. Die Käfige sind so aufzustellen, dass etwaige standortbedingte Auswirkungen möglichst gering sind. Die Tiere werden eindeutig gekennzeichnet und vor Beginn der Studie in ihren Käfigen über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt.

Vorbereitung der Dosierung

20. Die Prüfchemikalie sollte oral verabreicht werden, wenn nicht andere Verabreichungswege als besser geeignet erscheinen. Auf oralem Weg wird die Prüfchemikalie gewöhnlich mit einer Sonde verabreicht. Alternativ können Prüfchemikalien aber auch über die Nahrung oder das Trinkwasser zugeführt werden.

21. Bei Bedarf wird die Prüfchemikalie in einem geeigneten Vehikel gelöst oder suspendiert. Es empfiehlt sich, nach Möglichkeit zunächst die Verwendung einer wässrigen Lösung/Suspension, dann eine Lösung/Emulsion in Öl (z. B. Maisöl) und erst dann eine Lösung in einem anderen Vehikel in Betracht zu ziehen. Bei anderen Vehikeln als Wasser müssen deren toxische Merkmale bekannt sein. Die Stabilität und die Homogenität der Prüfchemikalie in dem Vehikel sind zu bestimmen.

VERFAHREN

Anzahl und Geschlecht der Versuchstiere

22. Jede Gruppe sollte mit mindestens 10 männlichen und 12-13 weiblichen Tieren begonnen werden. Bei den weiblichen Tieren wird vor der Exposition der Östruszyklus untersucht, und Tiere, bei denen nicht der typische Zyklus von 4-5 Tagen festzustellen ist, werden nicht in die Studie einbezogen. Daher wird die Vorhaltung weiterer weiblicher Tiere empfohlen, damit pro Gruppe tatsächlich 10 weibliche Tiere verfügbar sind. Außer bei ausgeprägten toxischen Wirkungen dürften dann pro Gruppe mindestens 8 Graviditäten entstehen; dies ist gewöhnlich die erforderliche Mindestzahl an trächtigen Tieren pro Gruppe. So soll gewährleistet werden, dass genügend Graviditäten und Nachkommen erzeugt werden, um eine aussagekräftige Bewertung des Schädigungspotenzials der Prüfchemikalie in Bezug auf die Fertilität, die Gravidität, das Verhalten des Muttertiers, das Säugen, das Wachstum und die Entwicklung der F_1-Generation von der Empfängnis bis zu Tag 13 nach der Geburt vornehmen zu können.

Dosierung

23. Im Allgemeinen sollten mindestens drei Versuchsgruppen und eine Kontrollgruppe gewählt werden. Die Dosierungen können auf Informationen aus akuten Toxizitätsprüfungen oder auf Ergebnissen von Studien mit Wiederholungsdosen beruhen. Abgesehen von der Behandlung mit der Prüfchemikalie sollen die Tiere in der Kontrollgruppe unter identischen Bedingungen behandelt werden wie die Versuchstiere in der Prüfgruppe. Wird die Prüfchemikalie mit einem Vehikel verabreicht, muss die Kontrollgruppe das Vehikel mit dem höchsten verwendeten Volumen erhalten.

24. Bei der Wahl der Dosisstufen sollten sämtliche vorliegenden Daten zur Toxizität und (Toxiko)kinetik berücksichtigt werden. Außerdem sollte berücksichtigt werden, dass trächtige und nicht trächtige Tiere unterschiedlich empfindlich sein können. Die höchste Dosis sollte so gewählt werden, dass zwar toxische Wirkungen, aber keine Todesfälle oder schweres Leiden hervorgerufen werden. Anschließend soll eine absteigende Folge von Dosierungsstufen ausgewählt werden, um dosisabhängige Wirkungen und die niedrigste Dosis ohne zu beobachtende schädliche Wirkungen (NOAEL) zu bestimmen. Zwei- bis vierfache Abstände erweisen sich häufig als optimale Dosisabstufungen, gegenüber der Verwendung sehr großer Intervalle (z. B. mehr als Faktor 10) ist die Hinzunahme einer vierten Prüfgruppe häufig vorzuziehen.

25. Bei allgemeiner Toxizität (z. B. vermindertes Körpergewicht, Wirkungen auf Leber, Herz, Lungen oder Nieren usw.) oder anderen Veränderungen, die möglicherweise keine toxischen Reaktionen darstellen (z. B. verminderte Futteraufnahme, Lebervergrößerung), sind die beobachteten Wirkungen auf endokrine Endpunkte mit Vorsicht zu bewerten.

Limit-Prüfung

26. Ergibt eine orale Prüfung mit einer einzigen Dosierung von mindestens 1 000 mg/kg Körpergewicht/Tag oder bei Verabreichung in Futter oder Trinkwasser ein gleichwertiger prozentualer Anteil im Futter oder Trinkwasser nach den für diese Studie beschriebenen Verfahren keine wahrnehmbare Toxizität und ist aufgrund von Daten strukturverwandter Stoffe keine Toxizität zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie mit verschiedenen Dosisabstufungen gegebenenfalls verzichtet werden. Die Limit-Prüfung kann angebracht sein, es sei denn, die Exposition beim Menschen lässt die Prüfung bei einer höheren oralen Dosis angezeigt erscheinen. Bei anderen Verabreichungsformen, z. B. Inhalation oder dermale Applikation, wird die maximal erzielbare Konzentration in vielen Fällen durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfchemikalien bestimmt.

Verabreichung der Dosen

27. Den Tieren wird die Prüfchemikalie für die Dauer einer Woche (7 Tage) täglich verabreicht. Wird die Prüfchemikalie über eine Sonde verabreicht, so sollte dies in einer einmaligen Dosis unter Verwendung einer Magensonde oder einer geeigneten Intubationskanüle erfolgen. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das einem Versuchstier jeweils verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Das Volumen sollte 1 ml/100 g Körpergewicht nicht überschreiten, bei wässrigen Lösungen kommen aber auch 2 ml/100 g Körpergewicht in Betracht. Außer für Reizungen auslösende oder ätzende Prüfchemikalien, die in der Regel bei höheren Konzentrationen eine Verschlimmerung bewirken, sollte die Variabilität des Prüfvolumens durch Anpassung der Konzentration möglichst gering gehalten werden, um ein konstantes Volumen bei allen Dosen zu gewährleisten.
28. Bei mit dem Futter oder dem Trinkwasser verabreichten Prüfchemikalien ist unbedingt sicherzustellen, dass die Mengen der jeweiligen Prüfchemikalie die normale Nahrungsaufnahme oder den Wasserhaushalt nicht beeinträchtigen. Wenn die Prüfchemikalie im Futter verabreicht wird, kann entweder eine konstante Konzentration im Futter (ppm) oder eine konstante Dosis, bezogen auf das Körpergewicht des Tieres, verwendet werden; die jeweils gewählte Verfahrensweise sollte angegeben werden. Eine mit einer Magensonde verabreichte Dosis soll jeweils zu denselben Tageszeiten gegeben und mindestens einmal pro Woche so angepasst werden, dass eine konstante Dosis im Verhältnis zum Körpergewicht aufrechterhalten wird.

Versuchsplan

29. Die Verabreichung sollte für beide Geschlechter mindestens 2 Wochen vor der Paarung beginnen, nachdem sich die Tiere mindestens 5 Tage lang eingewöhnt haben und nachdem die weiblichen Tiere auf einen normalen Östruszykus (in einem 2-wöchigen Zeitraum vor der Behandlung) untersucht wurden. Die Studie sollte so geplant werden, dass mit der Bewertung des Östruszykus bald nach Erreichen der vollständigen Geschlechtsreife begonnen wird. Der Beginn dieser Zeiträume kann je nach Rattenstämmen in den einzelnen Labors leicht variieren und beispielsweise bei Sprague-Dawley-Ratten bei einem Alter von 10 Wochen und bei Wistar-Ratten etwa bei einem Alter von 12 Wochen liegen. Muttertiere sollten an Tag 13 nach der Geburt oder kurz darauf getötet werden. Der Tag der Geburt (d. h. der Tag, an dem der Geburtsvorgang abgeschlossen wurde) wird als Tag 0 nach der Geburt bezeichnet. Weibliche Tiere, bei denen keine Besamung festzustellen ist, werden 24-26 Tage nach dem letzten Tag der Paarungszeit getötet. Die Verabreichung wird bei beiden Geschlechtern während der Paarungszeit fortgesetzt. Männliche Tiere werden auch nach der Paarungszeit noch mindestens über den vollständigen Verabreichungszeitraum von 28 Tagen behandelt. Anschließend werden sie getötet oder alternativ weiter gehalten und behandelt, damit eine zweite Paarung erfolgen kann, wenn dies als angemessen betrachtet wird.
30. Die tägliche Behandlung der weiblichen Muttertiere sollte während der Gravidität sowie mindestens bis zu Tag 13 nach der Geburt bzw. zum Tag vor der Tötung (einschließlich) fortgesetzt werden. Bei Studien, bei denen die Prüfchemikalie durch Inhalation oder dermal verabreicht wird, sollte die Verabreichung mindestens bis zu Tag 19 der Trächtigkeit (einschließlich) fortgesetzt und so bald wie möglich (spätestens PND 4) wieder aufgenommen werden.
31. Der Versuchsplan ist in Anlage 2 in einem Diagramm dargestellt.

Verpaarung

32. In der Regel sollten bei dieser Studie männliche und weibliche Tiere im Verhältnis 1:1 (ein männliches auf ein weibliches Tier) eingesetzt werden. Ausnahmen können sich gelegentlich ergeben, wenn männliche Tiere sterben. Das weibliche Tier sollte mit demselben männlichen Tier gehalten werden, bis Anzeichen für eine Paarung festgestellt werden bzw. bis zwei Wochen vergangen sind. Jeden Morgen werden die weiblichen Tiere auf Sperma oder Vaginalpfröpfe untersucht. Tag 0 der Trächtigkeit wird als der Tag festgelegt, an dem die Besamung (durch Vaginalpfropf oder Spermaspuren) nachgewiesen werden kann. Bei einer erfolglosen Verpaarung kann gegebenenfalls die erneute Verpaarung weiblicher Tiere mit bewährten männlichen Tieren der gleichen Gruppe erwogen werden.

Wurfgröße

33. Am PND 4 kann die Größe eines jeden Wurfs angepasst werden, indem überschüssige Jungtiere nach dem Zufallsprinzip aussortiert werden, um je nach normalem Umfang eines Wurfs beim verwendeten Rattenstamm pro Wurf nach Möglichkeit vier oder fünf Jungtiere pro Geschlecht und Wurf zu erhalten. Von zwei der überschüssigen Jungtiere sollten Blutproben entnommen, in Pools zusammengefasst und zur Bestimmung von Serumspiegeln (T4) verwendet werden. Die selektive Eliminierung von Jungtieren, z. B. auf der Grundlage des Körpergewichts oder des anogenitalen Abstands (AGD), wird nicht empfohlen. Wenn es wegen der Anzahl männlicher bzw. weiblicher Jungtiere nicht möglich ist, pro Wurf jeweils vier oder fünf Jungtiere eines jeden Geschlechts zu erhalten, ist auch eine grobe Anpassung (beispielsweise sechs männliche und vier weibliche Tiere) akzeptabel. Wenn die Anzahl der Tiere eines Wurfs die Eliminierungsgrenze (8 oder 10 Jungtiere pro Wurf) unterschreitet, werden keine Jungtiere aussortiert. Wenn die Anzahl der Jungtiere um nur ein Tier über der Eliminierungsgrenze liegt, wird nur ein Jungtier aussortiert und zur Blutentnahme für mögliche Bewertungen der Serumspiegel (T4) verwendet.
34. Wenn die Größe des Wurfs nicht geändert wird, werden an Tag 4 nach der Geburt zwei Jungtiere pro Wurf human getötet und Blutproben zur Bestimmung der Konzentration der Schilddrüsenhormone im Serum entnommen. Nach Möglichkeit sollten diese zwei Jungtiere je Wurf weibliche Jungtiere sein, damit männliche Jungtiere zur Prüfung der Brustwarzenretention für den Fall aufgespart werden können, dass nach dem Aussortieren dieser Jungtiere keine weiblichen Tiere zur abschließenden Bewertung mehr verbleiben würden. Wenn ein Wurf weniger als 8 bzw. 10 Jungtiere hat (je nach Größe eines normalen Wurfs beim betreffenden Rattenstamm), werden keine Jungtiere aussortiert. Wenn die Anzahl der Jungtiere um nur ein Tier über der normalen Größe eines Wurfs liegt, wird nur ein Jungtier aussortiert und zur Blutentnahme für mögliche Bewertungen der Serumspiegel (T4) verwendet.

Beobachtungen am lebenden Tier

Klinische Beobachtungen

35. Während der gesamten Versuchsdauer sollten allgemeine klinische Beobachtungen mindestens einmal täglich durchgeführt werden, bei Anzeichen für Toxizität häufiger. Die Beobachtungen sollen vorzugsweise jeden Tag zur gleichen Uhrzeit erfolgen, wobei die Zeit der nach der Verabreichung erwarteten maximalen Wirkungen zu berücksichtigen ist. Auffallende Verhaltensstörungen und Anzeichen einer schweren oder verzögerten Geburt sowie alle Vergiftungserscheinungen einschließlich Mortalität sind aufzuzeichnen. In den Aufzeichnungen sind auch der Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens, des Umfangs und der Dauer der Anzeichen für eine Toxizität zu vermerken.

Körpergewicht und Futter-/Trinkwasserverbrauch

36. Männliche und weibliche Tiere der P-Generation müssen am ersten Tag der Behandlung und anschließend mindestens in wöchentlichen Abständen sowie bei Versuchsende gewogen werden. Während der Gravidität sollten weibliche Tiere an den Tagen 0, 7, 14 und 20 sowie innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt (Tag 0 oder Tag 1 nach der Geburt) und mindestens an den Tagen 4 und 13 nach der Geburt gewogen werden. Diese Beobachtungen sind für jedes ausgewachsene Tier einzeln zu protokollieren.
37. Vor der Paarung, vor der Gravidität und vor der Laktation sollte die Futteraufnahme mindestens einmal wöchentlich gemessen werden. Die Messung der Futteraufnahme während der Paarungszeit ist fakultativ. Wenn die Prüfchemikalie mit dem Trinkwasser verabreicht wird, sollte in diesen Zeiträumen auch die Wasseraufnahme gemessen werden.

Östruszyklen

38. Östruszyklen sollten vor Beginn der Behandlung überwacht werden, damit für die Studie weibliche Tiere mit regelmäßigem Zyklus ausgewählt werden können (Nummer 22). Außerdem sollten ab Beginn des Behandlungszeitraums bis zu Anzeichen für eine Besamung täglich Vaginalabstriche untersucht werden. Wenn Bedenken hinsichtlich akuter Auswirkungen von Stress bestehen, die bei Beginn der Verabreichung die Östruszyklen verändern könnten, können die Versuchstiere in den Labors zwei Wochen behandelt werden, um anschließend die Östruszyklen vor der Paarungszeit über mindestens zwei Wochen und anschließend bis zu Anzeichen für eine Besamung in der Paarungszeit anhand täglicher Vaginalabstriche zu überwachen. Bei der Entnahme vaginaler/zervikaler Zellen ist sorgfältig darauf zu achten, dass die Schleimhaut nicht gereizt und eine Pseudogravidität eingeleitet werden könnte (7) (8).

Parameter für die Nachkommen

39. Die Trächtigkeitsdauer wird vom Tag 0 der Gravidität an berechnet und sollte vermerkt werden. Jeder Wurf ist so bald wie möglich nach der Geburt zu untersuchen, um die Anzahl und das Geschlecht der Nachkommen, Totgeburten, Lebendgeburten und Kümmerlinge (Jungtiere, die erheblich kleiner sind als Jungtiere einer vergleichbaren Kontrollgruppe) sowie auffallende Anomalien feststellen zu können.

40. Innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt (Tag 0 oder Tag 1 nach der Geburt) und mindestens an den Tagen 4 und 13 nach der Geburt sollten lebende Jungtiere gezählt und nach Geschlechtern unterschieden und die Würfe jeweils gewogen werden. Zusätzlich zu den in Nummer 35 genannten Beobachtungen sollte ungewöhnliches Verhalten der Nachkommen vermerkt werden.

41. Der anogenitale Abstand (AGD) sollte bei jedem Jungtier zwischen PND 0 und PND 4 am selben Tag gemessen werden. Das Körpergewicht des Jungtiers wird am Tag der Messung des AGD erfasst, der auf Jungtiergröße – vorzugsweise die Quadratwurzel des Körpergewichts – genormt sein sollte (9). Die Anzahl Brustwarzen/Warzenhöfe bei männlichen Jungtieren ist wie in OECD GD 151 empfohlen am PND 12 oder 13 zu kontrollieren (10).

Klinisch-biochemische Untersuchungen

42. Nach dem folgenden Plan werden Blutproben an einer vorgegebenen Stelle entnommen:

— von mindestens zwei Jungtieren pro Wurf an Tag 4 nach der Geburt, wenn die Anzahl der Jungtiere dies zulässt (Nummern 33 und 34),

— von allen Muttertieren und von mindestens zwei Jungtieren pro Wurf bei Beendigung des Versuchs an Tag 13 und

— von allen adulten männlichen Tieren bei Beendigung des Versuchs.

Alle Blutproben werden unter geeigneten Bedingungen gelagert. Bei Blutproben der Jungtiere vom Tag 13 sowie bei Blutproben der adulten männlichen Tiere werden die Serumspiegel auf Schilddrüsenhormone (T4) untersucht. Wenn relevant, wird außerdem eine Bewertung von T4 bei Blutproben der Muttertiere sowie bei Jungtieren an Tag 4 vorgenommen. Ebenfalls wenn relevant können auch weitere Hormone gemessen werden. Das Blut der Jungtiere kann zur Analyse der Schilddrüsenhormone nach Würfen zu Pools zusammengefasst werden. Die Schilddrüsenhormone (T4 und TSH) sollten vorzugsweise „insgesamt" gemessen werden.

43. Die folgenden Faktoren können die Variabilität und die absoluten Konzentrationen der Hormonbestimmungen beeinflussen:

— der Zeitpunkt der Tötung wegen Schwankungen der Hormonkonzentrationen im Tagesverlauf,

— Methode der Tötung, die gewählt wird, um übermäßigen Stress für die Tiere zu vermeiden, der die Hormonkonzentrationen beeinflussen könnte,

— Prüfkits für Hormonbestimmungen mit unterschiedlichen Standardkurven.

44. Plasmaproben, die speziell zur Hormonbestimmung vorgesehen sind, sollten immer zur gleichen Tageszeit gewonnen werden. Die verschiedenen im Handel erhältlichen Assay-Kits können bei der Analyse der Hormonkonzentration unterschiedliche numerische Werte ergeben.

Pathologie

Autopsie

45. Zum Zeitpunkt der Tötung oder bei vorzeitigem Tod im Verlauf der Studie sind die adulten Tiere makroskopisch auf etwaige Anomalien oder pathologische Veränderungen zu untersuchen. Dabei ist besonders auf die Organe des Fortpflanzungssystems zu achten. Die Anzahl der Implantationsstellen sollte vermerkt werden. Am Morgen des Tags der Sektion ist ein Vaginalabstrich zu untersuchen, um das Stadium des Östruszyklus zu bestimmen und eine Korrelation zur histopathologischen Untersuchung der Ovarien zu ermöglichen.

46. Die Hoden und die Nebenhoden sowie die Prostata und die Samenbläschen zusammen mit den Koagulationsdrüsen aller adulter männlicher Tiere sollten ggf. von anhaftendem Gewebe befreit und möglichst umgehend nach der Sektion gewogen werden, bevor das Material eintrocknet. Als Organgewichte können ferner die Gewichte des Muskelkomplex Levator ani/bulbospongiosus, der Cowperschen Drüsen und der Glans penis bei männlichen Tieren sowie der Ovarien (Nassgewicht) und des Uterus mit Zervix bei weiblichen Tieren gemessen werden; wenn diese Gewichte berücksichtigt werden sollen, sollten die Messungen möglichst umgehend nach der Sektion vorgenommen werden.

47. Tote Jungtiere und Jungtiere, die an Tag 13 nach der Geburt oder kurz danach getötet wurden, sollten zumindest äußerlich sorgfältig auf auffallende Anomalien untersucht werden. Besondere Beachtung erfordern die externen Genitalien, die auf Anzeichen für eine veränderte Entwicklung zu untersuchen sind. An Tag 13 sollte die Schilddrüse eines männlichen und eines weiblichen Jungtieres pro Wurf konserviert werden.

48. Bei allen adulten Tieren sollten die Ovarien, Hoden, akzessorischen Geschlechtsorgane (Uterus und Zervix, Nebenhoden, Prostata, Samenbläschen und Koagulationsdrüsen), Schilddrüse und alle Organe mit makroskopischen Veränderungen konserviert werden. Eine Fixation in Formalin ist für die regelmäßige Prüfung von Hoden und Nebenhoden nicht zu empfehlen. Eine annehmbare Methode besteht in der Verwendung von Bouinscher Lösung oder modifizierter Davidson-Lösung für diese Gewebe (11). Um ein rasches Eindringen des Fixierungsmittels zu ermöglichen, kann die Tunica albuginea an beiden Enden des Organs vorsichtig und flach mit einer Nadel punktiert werden.

Histopathologie

49. Bei den Tieren der höchsten Dosisgruppe und der Kontrollgruppe sollten die Ovarien, Hoden und Nebenhoden (unter besonderer Berücksichtigung der Stadien der Spermatogenese und der Histopathologie der interstitiellen testikuären Zellstruktur) einer detaillierten histologischen Untersuchung unterzogen werden. Die übrigen konservierten Organe einschließlich der Schilddrüse von Jungtieren und von adulten Tieren können erforderlichenfalls untersucht werden. Das Gewicht der Schilddrüse kann nach der Fixierung bestimmt werden. Anhaftendes Gewebe ist sehr vorsichtig und erst nach der Fixierung zu entfernen, um Gewebeschäden zu vermeiden. Eine Gewebeschädigung könnte die histopathologische Analyse beeinträchtigen. Die Untersuchungen sind auch auf die Tiere anderer Dosisgruppen auszudehnen, wenn in der Gruppe mit der höchsten Dosis Veränderungen festgestellt werden. Der Leitfaden zur Histopathologie (11) enthält zusätzliche Informationen zur Sektion, Fixierung, Schnittherstellung und Histopathologie endokriner Gewebe.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

50. Es sollen Daten zu den einzelnen Tieren bereitgestellt werden. Außerdem sollten sämtliche Daten in tabellarischer Form zusammengefasst werden; dabei werden für jede Prüfgruppe die Anzahl der Tiere zu Beginn der Prüfung, die Anzahl der während der Prüfung tot aufgefundenen Tiere beziehungsweise der aus humanen Gründen getöteten Tiere, der jeweilige Zeitpunkt des Todes beziehungsweise der Tötung, die Anzahl der fruchtbaren Tiere, die Anzahl der trächtigen weiblichen Tiere, die Anzahl der Tiere mit Anzeichen von Toxizität, eine Beschreibung der beobachteten Anzeichen von Toxizität, einschließlich des Zeitpunkts, zu dem die toxischen Wirkungen eingetreten sind, deren Dauer und Schweregrad, die Arten von histopathologischen Veränderungen und alle relevanten Daten zu den Würfen angegeben. Anlage 3 enthält ein tabellarisches Berichtsformat, das sich als sehr hilfreich für die Evaluierung der reproduktions- bzw. entwicklungstoxischen Auswirkungen erwiesen hat.

51. Wegen des begrenzten Umfangs der Studie sind statistische Analysen in Form von „Signifikanztests“ für viele Endpunkte, insbesondere für reproduktionsbezogene Endpunkte, nur von begrenzter Bedeutung. Wenn statistische Analysen durchgeführt werden, sollte die gewählte Methode der Verteilung der zu untersuchenden Variable angemessen sein und vor Beginn der Studie festgelegt werden. Statistische Analysen des AGD und der Brustwarzenretention sollten auf den Daten einzelner Jungtiere unter Berücksichtigung wurfbedingter Auswirkungen beruhen. Gegebenenfalls sind die jeweiligen Würfe als Analyseeinheit anzunehmen. Statistische Analysen des Körpergewichts der Jungtiere sollten auf den Daten einzelner Jungtiere unter Berücksichtigung der Wurfgröße beruhen. In Anbetracht des geringen Umfangs der Gruppe kann ggf. auch die Einbeziehung historischer Kontrolldaten (z. B. für die Wurfgröße) bei der Auswertung der Studie hilfreich sein.

Auswertung der Ergebnisse

52. Die Befunde dieser Toxizitätsstudie sind im Hinblick auf die beobachteten Wirkungen sowie auf Nekropsie- und Mikroskopiebefunde zu bewerten. Die Bewertung beinhaltet den vorhandenen beziehungsweise nicht vorhandenen Zusammenhang zwischen der Dosierung der Prüfchemikalie und vorhandenen Anomalien sowie deren Häufigkeit und Schwere, einschließlich makroskopischer Läsionen, identifizierter Zielorgane, Unfruchtbarkeit, klinischer Anomalien, beeinträchtigter Reproduktions- und Wurfleistungen, Körpergewichtsveränderungen, Auswirkungen auf die Mortalität und etwaiger sonstiger toxischer Auswirkungen.

53. Wegen der kurzen Dauer der Behandlung der männlichen Tiere sollte bei der Bewertung der reproduktionstoxischen Auswirkungen die Histopathologie der Hoden und der Nebenhoden zusammen mit den Fertilitätsdaten berücksichtigt werden. Die Einbeziehung verfügbarer historischer Kontrolldaten zur Reproduktions-/Entwicklungstoxizität (z. B. für Wurfgröße, AGD, Brustwarzenretention und Serumspiegel (T4)) kann bei der Auswertung der Studie ebenfalls hilfreich sein.

54. Für die Qualitätskontrolle wird vorgeschlagen, historische Kontrolldaten zu sammeln und Variationskoeffizienten für numerische Daten zu berechnen, insbesondere für die Parameter, die mit dem Nachweis der Störung des endokrinen Systems zusammenhängen. Diese Daten können für Vergleichszwecke verwendet werden, wenn tatsächliche Studien bewertet werden.

Prüfbericht

55. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalie:

— Herkunft, Chargennummer, ggf. begrenztes Verwendungsdatum;

— Stabilität der Prüfchemikalie, falls bekannt.

Einkomponentiger Stoff:

— physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;

— chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:

— so weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

Vehikel (wenn verwendet):

— Begründung der Auswahl des Vehikels, falls kein Wasser verwendet wurde;

Versuchstiere:

— Tierart/Stamm;

— Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;

— Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.;

— Gewicht der einzelnen Tiere bei Versuchsbeginn;

— Begründung für die Wahl einer anderen Art als der Ratte.

Prüfbedingungen:

— Begründung der gewählten Dosisstufen;

— Angaben zur Zubereitungsform der Prüfchemikalie/des Futters, der erreichten Konzentrationen, Stabilität und Homogenität der Zubereitung,

— Angaben zur Verabreichung der Prüfchemikalie;

— gegebenenfalls Angaben zur Umrechnung der Konzentration der Prüfchemikalie im Futter/Wasser (ppm) in die entsprechende Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag),

— Angaben über Futter- und Wasserqualität;

— genaue Beschreibung des Verfahrens für die Zufallsauswahl von Jungtieren zwecks Tötung (wenn Jungtiere getötet werden).

Ergebnisse:

— Körpergewicht/Änderungen des Körpergewichts,

— Angaben zur Futter- und Wasseraufnahme (wenn verfügbar);

— Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Dosierung, einschließlich Fruchtbarkeit, Trächtigkeit und sonstige Anzeichen von Toxizität;

— Graviditätslänge;

— toxische oder sonstige Wirkungen auf Reproduktion, Nachkommen, postnatales Wachstum usw.;

— Art, Schweregrad und Dauer der klinischen Beobachtungen (mit Angaben zur Reversibilität);

— Zahl adulter weiblicher Tiere mit normalem oder abnormalem Östruszyklus sowie Zyklusdauer;

— Anzahl der Lebendgeburten und der Postimplantationsverluste;

— Angaben zum Körpergewicht der Jungtiere;

— AGD aller Jungtiere (und Körpergewicht am Tag der AGD-Messung);

— Brustwarzenretention bei männlichen Jungtieren;

— Schilddrüsenhormonspiegel, Jungtiere an Tag 13 und adulte männliche Tiere (sowie Muttertiere und Jungtiere an Tag 4, wenn gemessen)

— Anzahl der Jungtiere mit sichtbaren erheblichen Anomalien, allgemeine Bewertung externer Genitalien, Anzahl der Kümmerlinge;

— Zeitpunkt des Todes im Verlauf der Studie oder Angabe, ob Tiere bis zum Schluss überlebt haben;

— Anzahl der Implantate, Wurfgröße und Wurfgewichte zum Zeitpunkt der Aufzeichnung;

— Körpergewicht bei Tötung sowie Organgewichtsdaten für die Elterntiere;

— Sektionsbefunde,

— ausführliche Beschreibung aller histopathologischen Befunde;

— Absorptionsdaten, soweit vorhanden;

— statistische Auswertung der Ergebnisse, wenn möglich.

Erörterung der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen

Auswertung der Ergebnisse

56. Mit der Studie wird die Reproduktions-/Entwicklungstoxizität bei wiederholter Verabreichung (Nummern 5 und 6) bewertet. Die Studie könnte Aufschluss über die Notwendigkeit der Durchführung weiterer Untersuchungen geben und zu Empfehlungen für die Gestaltung von Folgestudien führen. Als Hilfe bei der Auswertung der reproduktions- und entwicklungstoxischen Ergebnisse ist das OECD Guidance Document Nr. 43 zu Rate zu ziehen (12). OECD Guidance Document Nr. 106 über die histologische Auswertung von Prüfungen zur Feststellung endokriner und reproduktionstoxischer Wirkungen bei Nagern (11) enthält Informationen zur Vorbereitung und Auswertung von (endokrinen) Organen und von Vaginalabstrichen, die für diese TG hilfreich sein könnten.

LITERATUR

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Auf Anfrage erhältlich bei der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokio, 27.-29. Oktober 1992. Auf Anfrage erhältlich bei der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10. und 11. März 1998. Auf Anfrage erhältlich bei der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(5) 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(7) Goldman, J.M., Murr, A.S., Buckalew, A.R., Ferrell, J.M. und 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), S. 84-97.

(8) Sadleir, R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston, C.R. und Short, R.V. (Hrsg.), 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. und 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN (SIEHE AUCH OECD GD 150 (6))

Androgene Wirkung: Die Fähigkeit einer Chemikalie, in einem Säugetierorganismus wie ein natürliches androgenes Hormon zu wirken (z. B. Testosteron).

Antiandrogene Wirkung: Die Fähigkeit einer Chemikalie, die Wirkung eines natürlichen androgenen Hormons (z. B. Testosteron) in einem Säugetierorganismus zu unterdrücken.

Antiöstrogene Wirkung: Die Fähigkeit einer Chemikalie, die Wirkung eines natürlichen östrogenen Hormons (z. B. Östradiol 17ß) in einem Säugetierorganismus zu unterdrücken.

Antithyroide Wirkung. Die Fähigkeit einer Chemikalie, die Wirkung eines natürlichen Schilddrüsenhormons (z. B. $T_{3)}$ in einem Säugetierorganismus zu unterdrücken.

Chemikalie: Ein Stoff oder Gemisch.

Dosierung: Ein allgemeiner Begriff, der die Dosis, ihre Häufigkeit und die Dauer der Verabreichung umfasst.

Dosis: Die Menge der verabreichten Prüfchemikalie. Die Dosis wird ausgedrückt als Masse der Prüfchemikalie je Einheit Körpergewicht des Versuchstiers pro Tag (z. B. mg/kg Körpergewicht/Tag) oder als konstante Konzentration im Futter.

Entwicklungstoxizität: Das Auftreten einer reproduktionstoxischen Wirkung mit prä-, peri- und postnatalen, strukturellen oder funktionellen Störungen bei der Nachkommenschaft.

Fertilitätsströungen: Störungen der männlichen oder weiblichen Reproduktionsfunktionen oder -fähigkeit.

Maternale Toxizität: Schädliche Wirkungen auf trächtige weibliche Tiere, die entweder spezifisch (direkte Wirkungen) oder nicht spezifisch (indirekte Wirkungen) auftreten.

NOAEL: Abkürzung für No Observed Adverse Effect Level. Dies ist die höchste Dosis, bei der keine schädigenden behandlungsbedingten Wirkungen festgestellt werden.

Offensichtliche Toxizität: Ein allgemeiner Begriff zur Beschreibung deutlicher Toxizitätszeichen nach Verabreichung einer Prüfchemikalie. Diese Zeichen sollten für eine Bewertung der Gefährdung ausreichen und so schwerwiegend sein, dass bei einer Steigerung der verabreichten Dosis die Entwicklung schwerer Toxizitätszeichen und der wahrscheinliche Tod zu erwarten wären.

Östrogene Wirkung: Die Fähigkeit einer Chemikalie, in einem Säugetierorganismus wie ein natürliches östrogenes Hormon zu wirken (z. B. Östradiol 17ß).

Prüfchemikalie: Ein beliebiger Stoff oder eine beliebige Mischung, der/die nach dieser Methode geprüft wird.

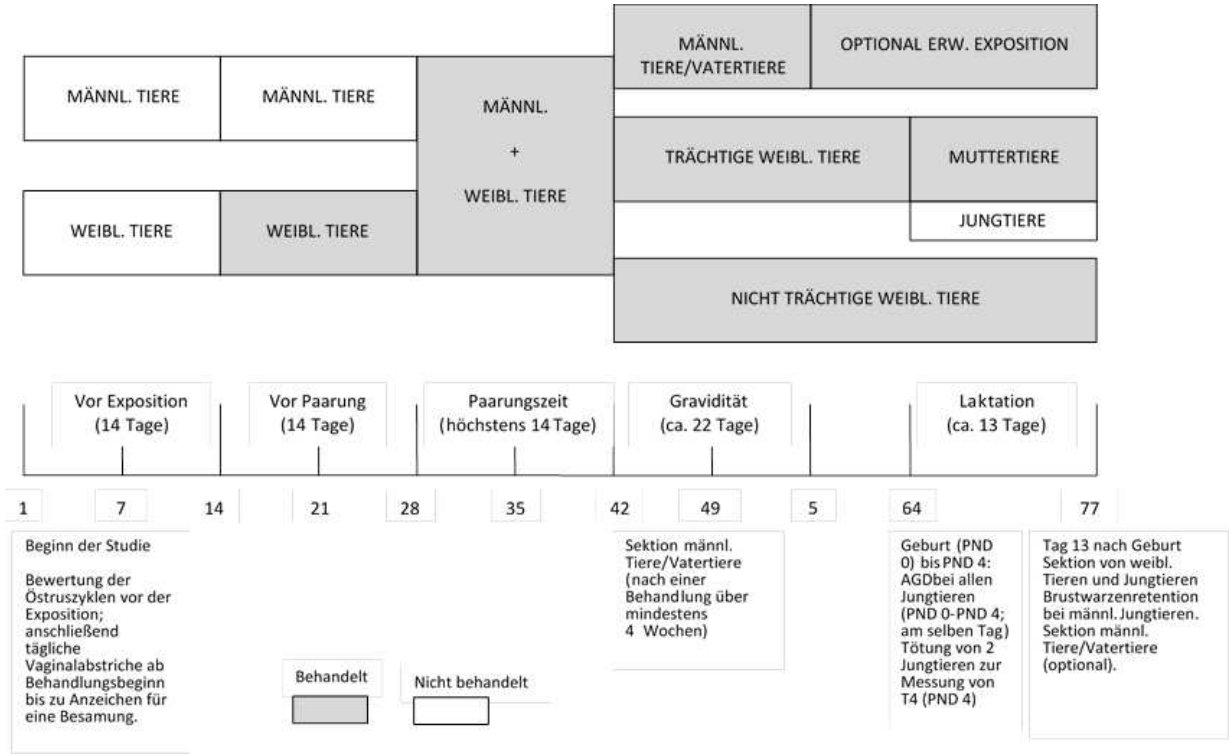
Reproduktionstoxizität: Schädliche Wirkungen auf die Nachkommenschaft und/oder Beeinträchtigung der männlichen und weiblichen Reproduktionsfunktionen oder -kapazität.

Thyroide Wirkung: Fähigkeit einer Chemikalie, in einem Säugetierorganismus wie ein natürliches Schilddrüsenhormon (z. B. $T_{3)}$ zu wirken.

Validierung: Ein wissenschaftlicher Prozess zur Beschreibung der operationellen Anforderungen und Grenzen einer Prüfmethode und zum Nachweis ihrer Zuverlässigkeit und Eignung für einen bestimmten Zweck.

Anlage 2

DIAGRAMM ZUM VERSUCHSPLAN MIT ANGABEN ZUR MAXIMALEN DAUER DER STUDIE AUSGEHEND VON DER VOLLSTÄNDIGEN 14-TÄGIGEN PAARUNGSZEIT



Anlage 3

TABELLARISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER AUSWIRKUNGEN AUF DIE REPRODUKTION/ENTWICKLUNG

BEOBACHTUNGEN	WERTE				
Dosierung (Einheiten)	0 (Kontrolle)	…	…	…	…
Ausgangspaarungen (N)					
Östruszyklus (mindestens mittlere Dauer und Häufigkeit unregelmäßiger Zyklen)					
Weibliche Tiere mit Anzeichen für eine Besamung (N)					
Trächtige weibliche Tiere (N)					
Empfängnistage 1-5 (N)					
Empfängnistage 6- (N)..[1] (N)					
Gravidität ≤ 21 Tage (N)					
Gravidität = 22 Tage (N)					
Gravidität ≥ 23 Tage (N)					
Muttertiere mit lebenden Jungtieren (N)					
Muttertiere mit lebenden Jungtieren an Tag 4 pp (N)					
Implantate/Muttertier (Mittelwert)					
Lebende Jungtiere/Muttertiere bei Geburt (Mittelwert)					
Lebende Jungtiere/Muttertiere an Tag 4 (Mittelwert)					
Geschlechterverhältnis (m/w) bei Geburt (Mittelwert)					
Geschlechterverhältnis (m/w) an Tag 4 (Mittelwert)					
Wurfgewicht bei Geburt (Mittelwert)					
Wurfgewicht an Tag 4 (Mittelwert)					
Gewicht der Jungtiere bei Geburt (Mittelwert)					
Gewicht der Jungtiere zum Zeitpunkt der AGD-Messung (Mittelwert männliche Jungtiere, Mittelwert weibliche Jungtiere)					

BEOBACHTUNGEN	WERTE				
Dosierung (Einheiten)	0 (Kontrolle)	…	…	…	…
AGD der Jungtiere am selben Tag nach der Geburt, Geburt – Tag 4 (Mittelwert männliche Jungtiere, Mittelwert weibliche Jungtiere, PND vermerken)					
Gewicht der Jungtiere an Tag 4 (Mittelwert)					
Brustwarzenretention bei männlichen Jungtieren an Tag 13 (Mittelwert)					
Gewicht der Jungtiere an Tag 13 (Mittelwert)					
JUNGTIERE MIT ANOMALIEN					
Muttertiere mit 0					
Muttertiere mit 1					
Muttertiere mit ≥2					
VERLUST AN NACHKOMMEN					
Pränatal / nach der Implantation (Implantationen abzüglich Lebendgeburten)					
Weibliche Tiere mit 0					
Weibliche Tiere mit 1					
Weibliche Tiere mit 2					
Weibliche Tiere mit ≥ 3					
Postnatal (Lebendgeburten abzüglich lebender Tiere an Tag 13 nach der Geburt)					
Weibliche Tiere mit 0					
Weibliche Tiere mit 1					
Weibliche Tiere mit 2					
Weibliche Tiere mit ≥ 3					

(1) letzter Tag der Paarungszeit

B.64 KOMBINIERTE SCREENING-PRÜFUNG MIT WIEDERHOLTER VERABREICHUNG ZUR BEWERTUNG DER REPRODUKTIONS-/ENTWICKLUNGSTOXIZITÄT

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 422 (2016). Die OECD-Richtlinien für die Prüfung von Chemikalien werden regelmäßig unter Berücksichtigung des wissenschaftlichen Fortschritts überarbeitet. Die ursprüngliche Screening-Prüfrichtlinie 422 wurde im Jahr 1996 angenommen. Sie beruhte auf einem Protokoll für eine kombinierte Screening-Prüfung mit wiederholter Verabreichung zur Bewertung der Reproduktions-/Entwicklungstoxizität, die in zwei Expertensitzungen im Jahr 1990 in London (1) und im Jahr 1992 in Tokio (2) erörtert wurde.

2. Bei dieser Prüfmethode wird eine Screening-Prüfung zur Bewertung der Reproduktions-/Entwicklungstoxizität, die auf Erfahrungen in Mitgliedstaaten aufgrund der Verwendung der ursprünglichen Methode bei in großen Mengen hergestellten Chemikalien und bei Untersuchungen mit Positivkontrollstoffen (3) (4) basiert, mit einer Toxizitätsprüfung mit wiederholter Verabreichung nach der OECD-Prüfrichtlinie 407 (28-Tage-Toxizitätsstudie mit wiederholter oraler Verabreichung an Nagern, Kapitel B.7 dieses Anhangs) kombiniert.

3. Diese Prüfmethode wurde als Folgemaßnahme der 1998 bei der OECD eingeleiteten prioritären Maßnahme zur Änderung bestehender Prüfrichtlinien und zur Entwicklung neuer Prüfrichtlinien für das Screening und die Prüfung potenzieller endokriner Disruptoren unter Festlegung von für einen endokrinen Disruptor relevanten Endpunkten aktualisiert (5). In diesem Zusammenhang wurde TG 407 (entsprechend Kapitel B.7 in diesem Anhang) im Jahr 2008 durch Parameter verbessert, mit denen eine endokrine Wirkung von Prüfchemikalien nachgewiesen werden kann. Ziel der Aktualisierung von TG 422 war die Einbeziehung einiger für endokrine Disruptoren relevanter Endpunkte in Screening-TGs, bei denen die Expositionszeiträume einige der empfindlichsten Entwicklungszeiträume (Zeiträume vor oder kurz nach der Geburt) beinhalten.

4. Die ausgewählten für endokrine Disruptoren relevanten zusätzlichen Endpunkte, die Bestandteil auch von TG 443 (Erweiterte Eingenerationen-Prüfung auf Reproduktionstoxizität, entsprechend Kapitel B.56 dieses Anhangs) sind, wurden auf der Grundlage einer Machbarkeitsstudie zur Untersuchung wissenschaftlicher und technischer Fragen im Zusammenhang mit deren Berücksichtigung sowie mit möglichen Anpassungen des für deren Einbeziehung erforderlichen Prüfprotokolls in TG 422 aufgenommen (6).

5. Mit dieser Prüfmethode sollen begrenzte Informationen über die Wirkungen einer Prüfchemikalie auf die Reproduktionsleistung männlicher und weiblicher Tiere (Funktion der Keimdrüsen, Paarungsverhalten, Empfängnis, Entwicklung des Conceptus, Geburt usw.) ermittelt werden. Sie ist nicht als alternative Prüfmethode und auch nicht als Ersatz für die bereits existierenden Prüfmethoden B.31, B.34, B.35 und B.56 zu betrachten.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

6. Bei der Beurteilung und Bewertung der toxischen Merkmale einer Prüfchemikalie kann die orale Toxizität nach wiederholter Verabreichung des Stoffs bestimmt werden, nachdem zunächst durch Prüfungen auf akute Wirkungen die ersten Toxizitätsdaten gewonnen wurden. Diese Prüfung gibt Aufschluss über mögliche Gesundheitsgefahren infolge wiederholter Exposition über einen begrenzten Zeitraum. Die Methode umfasst die Basisstudie zur Prüfung auf Toxizität bei wiederholter Verabreichung, die für chemische Stoffe, bei denen eine 90-Tage-Studie nicht gerechtfertigt ist (z. B. wenn das Produktionsvolumen bestimmte Grenzen nicht überschreitet), oder als Vorstudie zu einer Langzeitstudie verwendet werden kann. Bei der Prüfung sollten die im „OECD Guidance No. 19 on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation“ (7) genannten Grundsätze und Erwägungen beachtet werden.

7. Außerdem beinhaltet die Prüfung eine Screening-Prüfung auf Reproduktions-/Entwicklungstoxizität und kann daher auch durchgeführt werden, um ersten Aufschluss über mögliche Wirkungen auf die Reproduktionsleistung männlicher und weiblicher Tiere (Funktion der Keimdrüsen, Paarungsverhalten, Empfängnis, Entwicklung des Conceptus, Geburt usw.) entweder bereits früh bei der Bewertung toxikologischer Eigenschaften von Prüfchemikalien oder bei Besorgnis erregenden Prüfchemikalien zu erhalten. Diese Prüfmethode liefert keine umfassenden Informationen über sämtliche Reproduktions- und Entwicklungsaspekte. Insbesondere bietet sie nur beschränkte Möglichkeiten zur Erkennung postnataler Ausprägungen einer pränatalen Exposition oder zur Feststellung von Wirkungen, die bei postnataler Exposition induziert werden können. Aufgrund (unter anderem) der Selektivität der Endpunkte und der kurzen Dauer der Studie werden mit dieser Methode keine Nachweise dafür erlangt, dass keine reproduktions-/entwicklungstoxische Wirkungen eintreten. Wenn keine Daten aus anderen Prüfungen zur Bewertung der Reproduktions-/Entwicklungstoxizität vorliegen, sind positive Ergebnisse zudem hilfreich für eine erste Gefährdungsabschätzung und können bei Entscheidungen über die Notwendigkeit und die zeitliche Gestaltung weiterer Prüfungen berücksichtigt werden.

8. Die Ergebnisse in Bezug auf die endokrinen Parameter sind im Kontext des „OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals“ (8) zu interpretieren. Dieser Conceptual Framework enthält die verbesserte OECD TG 422 in Niveau 4 als *In-vivo*-Prüfung zur Erlangung von Daten über negative Wirkungen auf endokrin relevante Endpunkte. Ein endokrin relevantes Signal kann jedoch nicht an sich als hinreichender Beleg dafür betrachtet werden, dass die betreffende Prüfchemikalie als endokriner Disruptor wirkt.

9. Auch bei dieser Prüfmethode wird das Hauptaugenmerk auf neurologische Wirkungen als spezifischer Endpunkt gelegt; außerdem ist die Notwendigkeit einer sorgfältigen klinischen Beobachtung der Tiere zu betonen, um möglichst umfangreiche Daten zu erfassen. Die Methode sollte chemische Stoffe mit neurotoxischem Potenzial aufspüren, die dann gegebenenfalls eine eingehendere Untersuchung dieses Aspektes erfordern. Außerdem kann die Methode grundlegenden Aufschluss über immunologische Wirkungen ergeben.

10. Wenn keine Daten aus anderen Prüfungen zur Bewertung der systemischen Toxizität, der Reproduktions-/Entwicklungstoxizität, der Neurotoxizität und/oder der Immunotoxizität vorliegen, sind positive Ergebnisse hilfreich für eine erste Gefährdungsabschätzung und können bei Entscheidungen über die Notwendigkeit und die zeitliche Gestaltung weiterer Prüfungen berücksichtigt werden. Die Prüfung kann insbesondere als Bestandteil des SIDS-Dossiers (Screening Information Data Set) der OECD für die Bewertung existierender Chemikalien hilfreich sein, für die nur wenig oder keinerlei toxikologische Informationen verfügbar sind; außerdem kann sie anstelle zweier getrennter Prüfungen zur Bewertung der Toxizität bei wiederholter Verabreichung (OECD TG 407, entsprechend Kapitel B.7 dieses Anhangs) bzw. der Reproduktions-/Entwicklungstoxizität (OECD TG 421, entsprechend Kapitel B.63 dieses Anhangs) durchgeführt werden. Ferner kann sie als Dosisfindungsstudie für umfassendere Untersuchungen der Reproduktions- und Entwicklungstoxizität dienen sowie dann durchgeführt werden, wenn sie aus sonstigen Gründen als relevant betrachtet wird.

11. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass trächtige und nicht trächtige Tiere unterschiedlich empfindlich sind. Dosierungen, die sowohl zur Bewertung der allgemeinen systemischen Toxizität als auch der spezifischen Reproduktions-/Entwicklungstoxizität geeignet sind, sind daher mit dieser kombinierten Prüfung u. U. schwieriger zu ermitteln als mit einzelnen Prüfungen, die getrennt durchgeführt werden. Außerdem kann die Auswertung der Prüfergebnisse hinsichtlich der allgemeinen systemischen Toxizität schwieriger sein als bei Durchführung einer getrennten Prüfung mit wiederholter Verabreichung, insbesondere wenn in der Prüfung nicht gleichzeitig serumbezogene und histopathologische Parameter bewertet werden. In Anbetracht dieser technischen Schwierigkeiten erfordert die Durchführung dieser kombinierten Screening-Prüfung beträchtliche Erfahrung mit Toxizitätsprüfungen. Abgesehen von der geringeren Anzahl benötigter Prüftiere kann mit der kombinierten Prüfung allerdings möglicherweise besser zwischen direkten reproduktions-/entwicklungsbezogenen Wirkungen und Wirkungen unterschieden werden, die als sekundäre Wirkungen anderer (systemischer) Wirkungen zu betrachten sind.

12. Bei dieser Prüfung ist der Verabreichungszeitraum länger als bei einer herkömmlichen 28-Tage-Prüfung mit wiederholter Verabreichung, Allerdings werden von jedem Geschlecht pro Gruppe weniger Tiere verwendet als dann, wenn eine herkömmliche 28-Tage-Prüfung mit wiederholter Verabreichung zusätzlich zu einer Screening-Prüfung auf Reproduktions-/Entwicklungstoxizität durchgeführt wird.

13. Bei dieser Prüfmethode wird angenommen, dass die Prüfchemikalie oral verabreicht wird. Bei anderen Expositionswegen können Änderungen erforderlich sein.

14. Bevor die Prüfmethode an einem Gemisch für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regulierungszweck verwendet wird, ist zu prüfen, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefern kann und, wenn dem so ist, warum. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs rechtlich vorgeschrieben ist.

15. Die verwendeten Begriffe sind in Anlage 1 definiert.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

16. Die Prüfchemikalie wird verschiedenen Gruppen von männlichen und weiblichen Tieren in abgestuften Dosen verabreicht. Männlichen Tieren sollte die Prüfchemikalie mindestens vier Wochen bis zum Tag vor der vorgesehenen Tötung (einschließlich) verabreicht werden. (Dieser Zeitraum umfasst mindestens zwei Wochen vor der Paarung, die Paarungszeit und etwa zwei Wochen nach der Paarung). Wegen des begrenzten Verabreichungszeitraums vor der Paarung ist die Fruchtbarkeit bei männlichen Tieren möglicherweise kein besonders empfindlicher Indikator für eine

testikuläre Toxizität. Daher ist eine eingehende histologische Untersuchung der Hoden von wesentlicher Bedeutung. Die Kombination eines Verabreichungszeitraums von zwei Wochen vor der Paarung mit anschließenden Beobachtungen des Paarungsverhaltens und der Fertilität mit einem Verabreichungszeitraum von insgesamt mindestens vier Wochen und einer anschließenden detaillierten Histopathologie der männlichen Keimdrüsen wird als ausreichend für den Nachweis der meisten Wirkungen auf die männliche Fruchtbarkeit und die Spermatogenese betrachtet.

17. Weiblichen Tieren sollte die Prüfchemikalie während der gesamten Dauer der Studie verabreicht werden. Dazu zählen zwei Wochen vor der Paarung (damit mindestens zwei vollständige Östruszyklen erfasst werden), die variable Zeit bis zur Empfängnis und die Dauer der Gravidität sowie mindestens 13 Tage nach der Geburt bis zum Tag vor der vorgesehenen Tötung (einschließlich).

18. Die Dauer der Studie nach der Eingewöhnung und einer Bewertung des Östruszyklus vor der Verabreichung der Prüfchemikalie hängt von der Leistungsfähigkeit des weiblichen Tiers ab; im Allgemeinen beträgt sie etwa 63 Tage [mindestens 14 Tage vor der Paarung, (bis zu) 14 Tage Paarungszeit, 22 Tage Gravidität, 13 Tage Laktation].

19. Während des Verabreichungszeitraums werden die Tiere täglich sorgfältig auf Toxizitätszeichen beobachtet. Tiere, die im Verlauf der Prüfung sterben, und vorzeitig getötete Tiere werden seziert; die nach Abschluss der Prüfung überlebenden Tiere werden getötet und ebenfalls seziert.

BESCHREIBUNG DER METHODE

Auswahl von Versuchstierarten

20. Diese Prüfmethode ist für die Verwendung von Ratten vorgesehen. Wenn die in dieser TG 422 genannten Parameter an einer anderen Nagetierart untersucht werden, ist dies ausführlich zu begründen. Im internationalen Validierungsprogramm für den Nachweis von endokrinen Disruptoren mit TG 407 wurde nur die Ratte als Versuchstier verwendet. Stämme mit geringer Fruchtbarkeit oder bekannter hoher Häufigkeit von Entwicklungsdefekten sind nicht zu verwenden. Es sind gesunde jungfräuliche Tiere zu verwenden, die zuvor nicht in anderen Versuchen eingesetzt wurden. Die Versuchstiere sind nach Tierart, Tierstamm, Geschlecht, Gewicht und Alter zu beschreiben. Bei Beginn der Studie sollten die Gewichtsunterschiede der Tiere möglichst gering sein und ± 20 % des geschlechtsspezifischen Durchschnittsgewichts nicht überschreiten. Wenn die Studie als Vorstudie zu einer Langzeitstudie oder einer Eingenerationsstudie durchgeführt wird, sollten in beiden Studien vorzugsweise Tiere desselben Stamms und derselben Herkunft verwendet werden.

Haltung und Fütterung

21. Bei allen Verfahren sind die örtlichen Standards der Versuchstierpflege einzuhalten. Die Temperatur im Versuchstierraum sollte 22 °C (± 3 °C) betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit sollte mindestens 30 % betragen und – außer beim Reinigen des Raums – 70 % nicht überschreiten. Die Beleuchtung sollte künstlich sein und die Hell- und Dunkelphasen sollten sich im Abstand von 12 Stunden abwechseln. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist. Die Auswahl des Futters wird eventuell dadurch beeinflusst, dass eine geeignete Beimischung der Prüfchemikalie sichergestellt werden muss, wenn die Prüfchemikalie auf diesem Weg verabreicht werden soll.

22. Die Tiere sollten in kleinen gleichgeschlechtlichen Gruppen untergebracht werden; sie können auch einzeln gehalten werden, wenn dies wissenschaftlich gerechtfertigt ist. Bei Gruppenhaltung sollten maximal fünf Tiere in einem Käfig untergebracht sein. Die Verpaarung erfolgt in für diesen Zweck geeigneten Käfigen. Trächtigen weiblichen Tieren sollte in Einzelhaltung Material für den Nestbau bereitgestellt werden. Säugende weibliche Tiere werden in Käfigen einzeln mit ihren Nachkommen gehalten.

23. Das Futter ist regelmäßig auf Schadstoffe zu analysieren. Eine Probe des Futters ist bis zur Fertigstellung des Abschlussberichts aufzubewahren.

Vorbereitung der Versuchstiere

24. Gesunde junge adulte Tiere werden randomisiert und in Behandlungsgruppen und auf Käfige verteilt. Die Käfige sind so aufzustellen, dass etwaige standortbedingte Auswirkungen möglichst gering sind. Die Tiere werden eindeutig gekennzeichnet und vor Beginn der Studie in ihren Käfigen über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt.

Vorbereitung der Dosierung

25. Die Prüfchemikalie sollte oral verabreicht werden, wenn nicht andere Verabreichungswege als besser geeignet erscheinen. Auf oralem Weg wird die Prüfchemikalie gewöhnlich mit einer Sonde verabreicht. Alternativ können Prüfchemikalien aber auch über die Nahrung oder das Trinkwasser zugeführt werden.

26. Bei Bedarf wird der Prüfstoff in einem geeigneten Vehikel gelöst oder suspendiert. Es empfiehlt sich, nach Möglichkeit zunächst die Verwendung einer wässrigen Lösung/Suspension, dann eine Lösung/Suspension in Öl (z. B. Maisöl) und erst dann eine Lösung in einem anderen Vehikel in Betracht zu ziehen. Bei nicht wässrigen Vehikeln müssen deren toxische Merkmale bekannt sein. Die Stabilität und die Homogenität der Prüfchemikalie in dem Vehikel sind zu bestimmen.

VERFAHREN

Anzahl und Geschlecht der Versuchstiere

27. Jede Gruppe sollte mit mindestens 10 männlichen und 12-13 weiblichen Tieren begonnen werden. Bei den weiblichen Tieren wird vor der Exposition der Östruszyklus untersucht, und Tiere, bei denen nicht der typische Zyklus von 4-5 Tagen festzustellen ist, werden nicht in die Studie einbezogen. Daher wird die Vorhaltung weiterer weiblicher Tiere empfohlen, damit pro Gruppe tatsächlich 10 weibliche Tiere verfügbar sind. Außer bei ausgeprägten toxischen Wirkungen dürften dann pro Gruppe mindestens 8 Graviditäten entstehen; dies ist gewöhnlich die erforderliche Mindestzahl an trächtigen Tieren pro Gruppe. So soll gewährleistet werden, dass genügend Graviditäten und Nachkommen erzeugt werden, um eine aussagekräftige Bewertung des Schädigungspotenzials der Prüfchemikalie in Bezug auf die Fertilität, die Gravidität, das Verhalten des Muttertiers, das Säugen, das Wachstum und die Entwicklung der F_1-Generation von der Empfängnis bis zu Tag 13 nach der Geburt vornehmen zu können. Sollen Tiere bereits im Verlauf der Prüfung getötet werden, ist die Anzahl der Tiere um die Zahl der Tiere zu erhöhen, die noch vor Abschluss der Studie getötet werden sollen. Zur Beobachtung der Reversibilität, der Persistenz oder des verzögerten Auftretens systemischer toxischer Wirkungen für mindestens 14 Tage nach der Behandlung ist die Einbeziehung einer zusätzlichen Satellitengruppe von fünf Tieren je Geschlecht in der Kontrollgruppe und in der Gruppe mit der höchsten Dosis in Betracht zu ziehen. Tiere der Satellitengruppen werden nicht verpaart und daher auch nicht für die Bewertung der Reproduktions-/Entwicklungstoxizität berücksichtigt.

Dosierung

28. Im Allgemeinen sollten mindestens drei Versuchsgruppen und eine Kontrollgruppe gewählt werden. Liegen keine geeigneten allgemeinen Toxizitätsdaten vor, kann eine Dosisfindungsstudie (Tiere desselben Stamms und derselben Herkunft) durchgeführt werden, um die zu verwendenden Dosen zu bestimmen. Abgesehen von der Behandlung mit der Prüfchemikalie sollten die Tiere in der Kontrollgruppe unter identischen Bedingungen behandelt werden wie die Versuchstiere in der Prüfgruppe. Wird der Prüfstoff mit einem Vehikel verabreicht, muss die Kontrollgruppe das Vehikel im höchsten verwendeten Volumen erhalten.

29. Bei der Wahl der Dosisstufen sollten sämtliche vorliegenden Daten zur Toxizität und (Toxiko)kinetik berücksichtigt werden. Außerdem sollte berücksichtigt werden, dass trächtige und nicht trächtige Tiere unterschiedlich empfindlich sein können. Die höchste Dosis sollte so gewählt werden, dass zwar toxische Wirkungen, aber keine Todesfälle oder offensichtliches Leiden hervorgerufen werden. Anschließend sollte eine absteigende Folge von Dosisstufen gewählt werden, um dosisabhängige Wirkungen und die niedrigste Dosis ohne zu beobachtende schädliche Wirkungen nachzuweisen. Häufig sind zwei bis vier Intervalle optimal, und die Ergänzung durch eine vierte Versuchsgruppe ist häufig der Anwendung sehr langer Intervalle (z. B. größer als Faktor 10) zwischen den Verabreichungen vorzuziehen.

30. Bei allgemeiner Toxizität (z. B. vermindertes Körpergewicht, Wirkungen auf Leber, Herz, Lungen oder Nieren usw.) oder anderen Veränderungen, die möglicherweise keine toxischen Reaktionen darstellen (z. B. verminderte Futteraufnahme, Lebervergrößerung), sind die beobachteten Wirkungen auf endokrine Endpunkte mit Vorsicht zu bewerten.

Limit-Prüfung

31. Verursacht die Prüfung unter oraler Verabreichung einer Dosis von mindestens 1 000 mg/kg Körpergewicht pro Tag bzw. eine entsprechende Konzentration im Futter (je nach Körpergewicht) unter Verwendung der für diese Studie beschriebenen Verfahren keine feststellbaren toxischen Wirkungen, und ist aufgrund der Daten strukturverwandter Stoffe keine Toxizität zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie mit mehreren Dosisstufen gegebenenfalls verzichtet werden. Die Limit-Prüfung kann angebracht sein, es sei denn, die Exposition beim Menschen lässt die Prüfung bei einer höheren oralen Dosis angezeigt erscheinen. Bei anderen Verabreichungsformen, z. B. Inhalation oder dermale Applikation, wird die maximal erzielbare Exposition in vielen Fällen durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfchemikalien bestimmt.

Verabreichung der Dosen

32. Den Tieren wird die Prüfchemikalie für die Dauer einer Woche (7 Tage) täglich verabreicht. Wird der Prüfstoff über eine Sonde verabreicht, so sollte dies in einer einmaligen Dosis unter Verwendung einer Schlundsonde oder einer geeigneten Intubationskanüle erfolgen. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das einem Versuchstier jeweils verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Das Volumen sollte 1 ml/100 g Körpergewicht nicht

überschreiten, bei wässrigen Lösungen können aber auch 2 ml/100 g Körpergewicht in Betracht gezogen werden. Außer bei reizenden oder ätzenden Prüfchemikalien, die in der Regel bei höheren Konzentrationen eine Verschlimmerung bewirken, sollte die Variabilität des Prüfvolumens durch Anpassung der Konzentration möglichst gering gehalten werden, um ein konstantes Volumen bei allen Dosen zu gewährleisten.

33. Bei mit dem Futter oder dem Trinkwasser verabreichten Prüfchemikalien ist unbedingt sicherzustellen, dass die Mengen der jeweiligen Prüfchemikalie die normale Nahrungsaufnahme oder den Wasserhaushalt nicht beeinträchtigen. Wenn die Prüfchemikalie im Futter verabreicht wird, kann entweder eine konstante Konzentration im Futter (ppm) oder eine konstante Dosis, bezogen auf das Körpergewicht des Tieres, verwendet werden; die jeweils gewählte Verfahrensweise sollte angegeben werden. Eine mit einer Magensonde verabreichte Dosis sollte jeweils zu denselben Tageszeiten gegeben und mindestens einmal pro Woche so angepasst werden, dass eine konstante Dosis im Verhältnis zum Körpergewicht aufrechterhalten wird. Wird die kombinierte Prüfung als Vorstudie für eine Langzeitstudie über chronische Toxizität verwendet, sollte in beiden Prüfungen die gleiche Nahrung verabreicht werden.

Versuchsplan

34. Die Verabreichung sollte für beide Geschlechter mindestens 2 Wochen vor der Paarung beginnen, nachdem sich die Tiere mindestens 5 Tage lang eingewöhnt haben und nachdem die weiblichen Tiere auf einen normalen Östruszykus (in einem 2-wöchigen Zeitraum vor der Behandlung) untersucht wurden. Die Studie sollte so geplant werden, dass mit der Bewertung des Östruszykus bald nach Erreichen der vollständigen Geschlechtsreife begonnen wird. Der Beginn dieser Zeiträume kann je nach Rattenstämmen in den einzelnen Labors leicht variieren und beispielsweise bei Sprague-Dawley-Ratten bei einem Alter von 10 Wochen und bei Wistar-Ratten etwa bei einem Alter von 12 Wochen liegen. Muttertiere sollten an Tag 13 nach der Geburt oder kurz darauf getötet werden. Um eine nächtliche Futterkarenz der Muttertiere vor der Blutentnahme (wenn diese Option bevorzugt wird) zu ermöglichen, müssen Muttertiere und ihre Nachkommen nicht unbedingt am selben Tag getötet werden. Der Tag der Geburt (d. h. der Tag, an dem der Geburtsvorgang abgeschlossen wurde) wird als Tag 0 nach der Geburt bezeichnet. Weibliche Tiere, bei denen keine Besamung festzustellen ist, werden 24-26 Tage nach dem letzten Tag der Paarungszeit getötet. Die Verabreichung wird bei beiden Geschlechtern während der Paarungszeit fortgesetzt. Männliche Tiere werden auch nach der Paarungszeit noch mindestens über den vollständigen Verabreichungszeitraum von 28 Tagen behandelt. Anschließend werden sie getötet oder alternativ weiter gehalten und behandelt, damit eine zweite Paarung erfolgen kann, wenn dies als angemessen betrachtet wird.

35. Die tägliche Behandlung der weiblichen Muttertiere sollte während der Gravidität sowie mindestens bis zu Tag 13 nach der Geburt bzw. zum Tag vor der Tötung (einschließlich) fortgesetzt werden. Bei Studien, bei denen die Prüfchemikalie durch Inhalation oder dermal verabreicht wird, sollte die Verabreichung mindestens bis zu Tag 19 der Trächtigkeit (einschließlich) fortgesetzt und so bald wie möglich (spätestens an Tag 4 nach der Geburt (PND 4)) wieder aufgenommen werden.

36. Tiere in einer Satellitengruppe, bei denen Nachfolgebeobachtungen vorgesehen sind, (wenn überhaupt berücksichtigt) werden nicht verpaart. Sie sollten für mindestens weitere 14 Tage nach der ersten vorgesehenen Tötung von Muttertieren ohne Behandlung gehalten werden, um ein verzögertes Auftreten, die Persistenz oder die Reversibilität toxischer Wirkungen festzustellen.

37. Der Versuchsplan ist in Anlage 2 in einem Diagramm dargestellt.

Östruszyklen

38. Östruszyklen sollten vor Beginn der Behandlung überwacht werden, damit für die Studie weibliche Tiere mit regelmäßigem Zyklus ausgewählt werden können (Nummer 27). Außerdem sollten ab Beginn des Behandlungszeitraums bis zu Anzeichen für eine Besamung täglich Vaginalabstriche untersucht werden. Wenn Bedenken hinsichtlich akuter Auswirkungen von Stress bestehen, die bei Beginn der Verabreichung die Östruszyklen verändern könnten, können die Versuchstiere in den Labors zwei Wochen behandelt werden, um anschließend die Östruszyklen vor der Paarungszeit über mindestens zwei Wochen und anschließend bis zu Anzeichen für eine Besamung in der Paarungszeit anhand täglicher Vaginalabstriche zu überwachen. Bei der Entnahme vaginaler/zervikaler Zellen ist sorgfältig darauf zu achten, dass die Schleimhaut nicht gereizt wird, damit es nicht zu Pseudograviditäten kommt (8) (9).

Verpaarung

39. In der Regel sollten bei dieser Studie männliche und weibliche Tiere im Verhältnis 1:1 (ein männliches auf ein weibliches Tier) eingesetzt werden. Ausnahmen können sich gelegentlich ergeben, wenn männliche Tiere sterben. Das weibliche Tier sollte mit demselben männlichen Tier gehalten werden, bis Anzeichen für eine Paarung festgestellt werden bzw. bis zwei Wochen vergangen sind. Jeden Morgen werden die weiblichen Tiere auf Sperma oder Vaginalpfröpfe untersucht. Tag 0 der Trächtigkeit ist der Tag, an dem die Besamung (durch Vaginalpfropf oder Spermaspuren) nachgewiesen werden kann. Bei einer erfolglosen Verpaarung kann gegebenenfalls die erneute Verpaarung weiblicher Tiere mit bewährten männlichen Tieren der gleichen Gruppe erwogen werden.

Wurfgröße

40. Am PND 4 kann die Größe eines jeden Wurfs angepasst werden, indem überschüssige Jungtiere nach dem Zufallsprinzip aussortiert werden, um je nach normalem Umfang eines Wurfs beim verwendeten Rattenstamm pro Wurf nach Möglichkeit vier oder fünf Jungtiere pro Geschlecht und Wurf zu erhalten. Von zwei der überschüssigen Jungtiere sollten Blutproben entnommen, in Pools zusammengefasst und zur Bestimmung von Serumspiegeln (T4) verwendet werden. Die selektive Eliminierung von Jungtieren, z. B. auf der Grundlage des Körpergewichts oder des anogenitalen Abstands (AGD), wird nicht empfohlen. Wenn es wegen der Anzahl männlicher bzw. weiblicher Jungtiere nicht möglich ist, pro Wurf jeweils vier oder fünf Jungtiere eines jeden Geschlechts zu erhalten, ist auch eine grobe Anpassung (beispielsweise sechs männliche und vier weibliche Tiere) akzeptabel. Wenn die Anzahl der Tiere eines Wurfs die Eliminierungsgrenze (8 oder 10 Jungtiere pro Wurf) unterschreitet, werden keine Jungtiere aussortiert. Wenn die Anzahl der Jungtiere um nur ein Tier über der Eliminierungsgrenze liegt, wird nur ein Jungtier aussortiert und zur Blutentnahme für mögliche Bewertungen der Serumspiegel (T4) verwendet.

41. Wenn die Größe des Wurfs nicht geändert wird, werden an Tag 4 nach der Geburt zwei Jungtiere pro Wurf human getötet und Blutproben zur Bestimmung der Konzentration der Schilddrüsenhormone im Serum entnommen. Nach Möglichkeit sollten diese zwei Jungtiere je Wurf zwei weibliche Jungtiere sein, damit männliche Jungtiere zur Prüfung der Brustwarzenretention aufgespart werden können, es sei denn, dass nach dem Aussortieren dieser Jungtiere keine weiblichen Tiere zur abschließenden Bewertung mehr verbleiben würden. Es werden keine Jungtiere aussortiert, wenn die Größe des Wurfs dadurch auf weniger als 8 bzw. 10 Jungtiere sinkt (je nach Größe eines normalen Wurfs beim betreffenden Rattenstamm). Wenn die Anzahl der Jungtiere um nur ein Tier über der normalen Größe eines Wurfs liegt, wird nur ein Jungtier aussortiert und zur Blutentnahme für mögliche Bewertungen der Serumspiegel (T4) verwendet.

Beobachtungen

42. Allgemeine klinische Beobachtungen sollten mindestens einmal täglich, vorzugsweise jeweils zur gleichen Zeit, und unter Berücksichtigung des voraussichtlichen Zeitraums nach der Verabreichung vorgenommen werden, in welchem der Wirkungsgipfel zu erwarten ist. Der Gesundheitszustand der Tiere ist zu dokumentieren. Mindestens zweimal täglich erfolgt eine Beobachtung aller Tiere auf Erkrankungen oder Todesfälle.

43. Bei allen Muttertieren sollte einmal vor der Exposition (um intraindividuelle Vergleiche zu ermöglichen) und danach mindestens einmal wöchentlich eine eingehende klinische Untersuchung erfolgen. Die Beobachtungen sind außerhalb des Käfigs, in dem die Tiere gehalten werden, in stets gleicher Umgebung und vorzugsweise stets zur gleichen Zeit täglich vorzunehmen. Sie sind sorgfältig zu dokumentieren, am besten nach einer speziell vom Prüflabor entwickelten Bewertungsskala. Durch geeignete Maßnahmen ist sicherzustellen, dass die Prüfbedingungen möglichst konstant bleiben und dass die Beobachtungen vorzugsweise durch Untersucher erfolgen, denen die Behandlung der Tiere nicht bekannt ist. Zu achten ist insbesondere auf Veränderungen an Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, auf Sekrete und Exkrete und auf autonome Aktivitäten (z. B. Tränensekretion, Piloerektion, Pupillengröße, ungewöhnliche Atemmuster). Gang- und Haltungsstörungen, ferner Reaktionen auf die Behandlung der Tiere sowie etwaige klonische oder tonische Bewegungen, Stereotypien (z. B. übermäßiges Putzen, wiederholte Kreisbewegungen), schwere oder verzögerte Geburt oder abnormes Verhalten (z. B. Selbstverstümmelung, Rückwärtsgehen) sollten ebenfalls dokumentiert werden (10).

44. Einmal während der Untersuchung sollte bei fünf männlichen und fünf weiblichen Tieren, die zufällig aus den Gruppen ausgewählt wurden, die sensorische Reaktivität auf Reize verschiedener Art (z. B. akustische, visuelle und propriozeptive Reize) (8) (9) (11), die Greifkraft (12) und die motorische Aktivität (13) bewertet werden. Weitere Einzelheiten zu den möglichen Untersuchungen finden sich in der Literatur. Allerdings können auch andere als dort genannte Verfahren angewendet werden. Bei männlichen Tieren sollten diese funktionellen Beobachtungen gegen Ende des Verabreichungszeitraums kurz vor der vorgesehenen Tötung und in jedem Fall vor der Blutentnahme zur hämatologischen und klinisch-chemischen Untersuchung erfolgen (Nummern 53-56 einschließlich Fußnote 1). Weibliche Tiere sollten sich bei diesen Funktionsprüfungen in einem physiologisch ähnlichen Zustand befinden und vorzugsweise einmal in der letzten Woche der Laktation (z. B. LD 6-13) kurz vor der vorgesehenen Tötung untersucht werden. Die Zeiträume der Trennung von Muttertieren und Jungtieren sollten möglichst kurz sein.

45. Die einmalig gegen Ende der Untersuchung vorgenommenen funktionellen Beobachtungen können bei Vorstudien für eine nachfolgende Prüfung auf subchronische Toxizität (90 Tage) und bei Langzeitstudien entfallen. In diesem Fall sollten die funktionellen Beobachtungen im Rahmen dieser Folgestudie vorgenommen werden. Andererseits könnten die Daten über funktionelle Beobachtungen aus der Untersuchung mit wiederholter Verabreichung aber die Wahl der Dosisstufen für eine nachfolgende Prüfung auf subchronische oder langfristige Toxizität erleichtern.

46. In Ausnahmefällen können funktionelle Beobachtungen auch bei Gruppen entfallen, die so starke sonstige Toxizitätsanzeichen aufweisen, dass die Leistungen in Funktionsprüfungen dadurch signifikant beeinträchtigt würden.

47. Die Trächtigkeitsdauer wird von Tag 0 der Gravidität an berechnet und sollte vermerkt werden. Jeder Wurf ist so bald wie möglich nach der Geburt zu untersuchen, um die Anzahl und das Geschlecht der Nachkommen, Totgeburten, Lebendgeburten und Kümmerlinge (Jungtiere, die erheblich kleiner sind als Jungtiere einer vergleichbaren Kontrollgruppe) sowie auffallende Anomalien feststellen zu können.

48. Innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt (Tag 0 oder Tag 1 nach der Geburt) und mindestens an den Tagen 4 und 13 nach der Geburt sollten lebende Jungtiere gezählt und nach Geschlechtern unterschieden und die Würfe jeweils gewogen werden. Zusätzlich zu den Beobachtungen bei Elterntieren (Nummern 43 und 44) sollte ungewöhnliches Verhalten der Nachkommen dokumentiert werden.

49. Der anogenitale Abstand (AGD) sollte bei jedem Jungtier zwischen PND 0 und PND 4 am selben Tag gemessen werden. Das Körpergewicht des Jungtiers wird am Tag der Messung des AGD erfasst, der auf Jungtiergröße — vorzugsweise die Quadratwurzel des Körpergewichts — genormt sein sollte (14). Die Anzahl der Brustwarzen/Warzenhöfe bei männlichen Jungtieren ist wie in OECD GD 151 empfohlen an PND 12 oder 13 zu kontrollieren (15).

Körpergewicht und Futter-/Trinkwasserverbrauch

50. Männliche und weibliche Tiere der P-Generation müssen am ersten Tag der Behandlung und anschließend mindestens in wöchentlichen Abständen sowie bei Versuchsende gewogen werden. Während der Gravidität sollten weibliche Tiere an den Tagen 0, 7, 14 und 20 sowie innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt (Tag 0 oder Tag 1 nach der Geburt) und mindestens an den Tagen 4 und 13 nach der Geburt gewogen werden. Diese Beobachtungen sind für jedes ausgewachsene Tier einzeln zu protokollieren.
51. Vor der Paarung, vor der Gravidität und vor der Laktation sollte die Futteraufnahme mindestens einmal wöchentlich gemessen werden. Die Messung der Futteraufnahme während der Paarungszeit ist fakultativ. Wenn die Prüfchemikalie mit dem Trinkwasser verabreicht wird, sollte in diesen Zeiträumen auch die Wasseraufnahme gemessen werden.

Hämatologie

52. Bei fünf männlichen und fünf weiblichen Tieren, die aus jeder Gruppe zufällig ausgewählt wurden, sollten während der Untersuchung einmal die folgenden hämatologischen Parameter bestimmt werden: Hämatokrit, Hämoglobinkonzentration, Erythrozytenzahl, Retikulozyten, Gesamt- und Differential-Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl und Blutgerinnungszeit/-fähigkeit. Wenn die Prüfchemikalie oder ihre möglichen Metaboliten oxidierende Eigenschaften haben oder diese vermutet werden, sollten zusätzlich die Methämoglobinkonzentration und die Heinz-Körper bestimmt werden.
53. Blutproben sollten an einer benannten Stelle entnommen werden. Die weiblichen Tiere sollten sich bei der Entnahme der Proben in einem physiologisch ähnlichen Zustand befinden. Um bei der praktischen Handhabung Schwierigkeiten aufgrund des unterschiedlichen Beginns der Trächtigkeit zu vermeiden, kann die Blutentnahme bei weiblichen Tieren alternativ zur Probenahme unmittelbar vor dem Verfahren zur humanen Tötung der Tiere bzw. im Rahmen des Verfahrens ausschließlich am Ende des Zeitraums vor der Paarung erfolgen. Bei männlichen Tieren sollten die Blutproben vorzugsweise unmittelbar vor dem Verfahren zur humanen Tötung der Tiere bzw. im Rahmen des Verfahrens entnommen werden. Alternativ kann die Blutentnahme bei männlichen Tieren auch am Ende des Zeitraums vor der Paarung erfolgen, wenn dieser Zeitpunkt auch für die weiblichen Tiere angenommen wurde.
54. Die Blutproben sind unter geeigneten Bedingungen zu lagern.

Klinisch-biochemische Untersuchungen

55. Klinisch-biochemische Bestimmungen zur Untersuchung der wichtigsten toxischen Wirkungen in Geweben, insbesondere der Wirkungen auf Nieren und Leber, sind an Blutproben durchzuführen, die von den ausgewählten fünf männlichen und fünf weiblichen Tieren je Gruppe entnommen werden. Es empfiehlt sich eine Futterkarenz der Tiere über Nacht, bevor die Blutproben entnommen werden. ([1]) Die Plasma- oder Serumuntersuchungen sollten die Parameter Natrium, Kalium, Glucose, Gesamtcholesterin, Harnstoff, Kreatinin, Gesamtprotein und Albumin, mindestens zwei Enzyme, die auf hepatozelluläre Wirkungen schließen lassen, (wie Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Aminotransferase und Sorbitolhydrogenase) sowie Gallensäuren umfassen. Die Bestimmung weiterer Enzyme (aus der Leber oder anderen Organen) sowie von Bilirubin kann unter bestimmten Umständen ebenfalls wertvolle Hinweise liefern.
56. Nach dem folgenden Plan werden Blutproben an einer vorgegebenen Stelle entnommen:
    - — von mindestens zwei Jungtieren pro Wurf an Tag 4 nach der Geburt, wenn die Anzahl der Jungtiere dies zulässt (Nummern 40 und 41),
    - — von allen Muttertieren und von mindestens zwei Jungtieren pro Wurf bei Beendigung des Versuchs an Tag 13 und
    - — von allen adulten männlichen Tieren bei Beendigung des Versuchs.

    Alle Blutproben werden unter geeigneten Bedingungen gelagert. Bei Blutproben der Jungtiere von Tag 13 sowie bei Blutproben der adulten männlichen Tiere werden die Serumspiegel auf Schilddrüsenhormone (T4) untersucht. Wenn relevant, wird außerdem eine Bewertung von T4 bei Blutproben der Muttertiere sowie bei Jungtieren an Tag 4 vorgenommen. Ebenfalls wenn relevant können auch weitere Hormone gemessen werden. Das Blut der Jungtiere kann zur Analyse der Schilddrüsenhormone nach Würfen zu Pools zusammengefasst werden. Die Schilddrüsenhormone (T4 und TSH) sollten vorzugsweise „insgesamt" gemessen werden.

([1]) Für eine Reihe von Serum- und Plasmabestimmungen, insbesondere der Glucose, ist eine Futterkarenz der Tiere über Nacht zu empfehlen. Der Hauptgrund dafür ist, dass die bei fehlender Futterkarenz unweigerlich zunehmende Variabilität zu einer Maskierung subtilerer Wirkungen führen und die Interpretation erschweren könnte. Andererseits jedoch kann die nächtliche Futterkarenz den allgemeinen Stoffwechsel der (trächtigen) Tiere beeinflussen, die Laktation und die Brutpflege sowie, insbesondere in Futterstudien, die tägliche Exposition gegenüber der Prüfchemikalie beeinträchtigen. Wenn die nächtliche Futterkarenz gewählt wird, sollten die klinisch-biochemischen Parameter nach Durchführung der funktionellen Beobachtungen bei den männlichen Tieren in Woche 4 der Studie bestimmt werden. Die weiblichen Tiere sollten nach der Trennung von den Jungtieren (z. B. an PND 13) noch einen weiteren Tag gehalten werden. Muttertiere sollten ab Laktationstag 13-14 über Nacht kein Futter mehr erhalten, und für die Bestimmung der klinisch-chemischen Parameter sollten vor der Tötung entnommene Blutproben verwendet werden.

57. Optional können in der letzten Woche der Studie am Urin, der zu festgelegten Zeiten gesammelt wird, bei fünf zufällig ausgewählten männlichen Tieren je Gruppe folgende Parameter untersucht werden: Aussehen, Volumen, Osmolalität oder spezifisches Gewicht, pH-Wert, Eiweiß, Glucose und Blut/Blutzellen.

58. Darüber hinaus sollten Untersuchungen zur Bestimmung von Serummarkern für eine allgemeine Gewebeschädigung erwogen werden. Des Weiteren sollten, wenn die bekannten Eigenschaften der Prüfchemikalie im Verdacht stehen, die entsprechenden Stoffwechselprofile zu beeinflussen, die Parameter Calcium, Phosphat, Nüchtern-Triglyzeride und -Glucose, spezifische Hormone, Methämoglobin und Cholinesterase bestimmt werden. Die Bestimmung muss auf Einzelfallbasis erfolgen.

59. Die folgenden Faktoren können die Variabilität und die absoluten Konzentrationen der Hormonbestimmungen beeinflussen:

— der Zeitpunkt der Tötung wegen Schwankungen der Hormonkonzentrationen im Tagesverlauf,

— Methode der Tötung, die gewählt wird, um übermäßigen Stress für die Tiere zu vermeiden, der die Hormonkonzentrationen beeinflussen könnte,

— Testkits für Hormonbestimmungen mit unterschiedlichen Standardkurven.

60. Plasmaproben, die speziell zur Hormonbestimmung vorgesehen sind, sollten immer zur gleichen Tageszeit gewonnen werden. Die verschiedenen im Handel erhältlichen Assay-Kits können bei der Analyse der Hormonkonzentration unterschiedliche numerische Werte ergeben.

61. Erweisen sich die vorliegenden Ausgangsdaten als ungeeignet, sollte eine Bestimmung hämatologischer und klinisch-biochemischer Parameter vor Versuchsbeginn oder vorzugsweise an einer nicht in die Versuchsgruppen einbezogenen Gruppe von Tieren in Betracht gezogen werden. Für weibliche Tiere müssen die Daten während der Laktation ermittelt werden.

PATHOLOGIE

Autopsie

62. Alle Versuchstiere sollten einer vollständigen, eingehenden Autopsie unterzogen werden. Sie umfasst eine sorgfältige Untersuchung der äußeren Körperoberfläche, aller Körperöffnungen sowie der Hirn-, Brust- und Bauchhöhle und ihres Inhalts. Dabei ist besonders auf die Organe des Fortpflanzungssystems zu achten. Die Anzahl der Implantationsstellen sollte vermerkt werden. Am Tag der Sektion ist ein Vaginalabstrich zu untersuchen, um das Stadium des Östruszyklus zu bestimmen und eine Korrelation zur histopathologischen Untersuchung der weiblichen Fortpflanzungsorgane zu ermöglichen.

63. Die Hoden und die Nebenhoden sowie die Prostata und die Samenbläschen zusammen mit den Koagulationsdrüsen aller adulten männlichen Tiere sollten ggf. von anhaftendem Gewebe befreit und möglichst umgehend nach der Sektion gewogen werden, bevor das Material eintrocknet. Als Organgewichte können ferner die Gewichte des Muskelkomplex Levator ani/bulbospongiosus, der Cowperschen Drüsen und der Glans penis bei männlichen Tieren sowie der Ovarien (Nassgewicht) und des Uterus mit Zervix bei weiblichen Tieren gemessen werden; wenn diese Gewichte berücksichtigt werden sollen, sollten die Messungen möglichst umgehend nach der Sektion vorgenommen werden. Von allen adulten Tieren sollten die Ovarien, Hoden, Nebenhoden, akzessorischen Geschlechtsorgane und alle Organe aufbewahrt werden, die makroskopische Veränderungen aufweisen.

64. Von allen adulten männlichen und weiblichen Tieren sowie von einem männlichen und einem weiblichen Jungtier an Tag 13 je Wurf sollten die Schilddrüsen in dem am besten geeigneten Fixierungsmittel für die vorgesehene histopathologische Untersuchung aufbewahrt werden. Das Gewicht der Schilddrüse kann nach der Fixierung bestimmt werden. Anhaftendes Gewebe ist sehr vorsichtig und erst nach der Fixierung zu entfernen, um Gewebeschäden zu vermeiden. Eine Gewebeschädigung könnte die histopathologische Analyse beeinträchtigen. Die Blutproben müssen an einer benannten Stelle unmittelbar vor oder bei der Tötung der Tiere entnommen und fachgerecht gelagert werden (Nummer 56).

65. Außerdem sollten bei mindestens fünf zufällig ausgewählten adulten männlichen und weiblichen Tieren je Gruppe (außer bei moribunden Tieren und/oder bei vor Ende der Untersuchung human getöteten Tieren) Leber, Nieren, Nebennieren, Thymus, Milz, Hirn und Herz von anhaftendem Gewebe befreit und möglichst umgehend nach der Sektion gewogen werden, bevor das Material eintrocknet. Die folgenden Gewebe sind in dem für die betreffende Gewebeart und die vorgesehene anschließende histopathologische Untersuchung am besten geeigneten Fixierungsmittel aufzubewahren: alle Gewebe mit makroskopischen Veränderungen, Hirn (typische Regionen einschließlich Cerebrum, Cerebellum und Pons), Rückenmark, Auge, Magen, Dünn- und Dickdarm (mit Peyer'schen-Platten), Leber, Nieren, Nebennieren, Milz, Herz, Thymus, Trachea und Lungen (konserviert durch Inflation mit Fixierungsmittel und Immersion), Gonaden (Hoden und Ovarien), akzessorische Geschlechtsorgane (Uterus und Zervix, Nebenhoden, Prostata und Samenbläschen mit Koagulationsdrüsen), Vagina, Harnblase, Lymphknoten (je nach Erfahrung des Labors sollte neben dem proximalsten drainierenden Lymphknoten ein weiterer Lymphknoten entnommen werden (16)), periphere Nerven (N. ischiadicus oder N. tibialis) vorzugsweise in der Nähe des Muskels, Skelettmuskel und Knochen mit Knochenmark (Schnitt oder wahlweise ein frisch fixiertes Knochenmarkaspirat). Es wird empfohlen, die

Hoden durch Immersion in Bouin'scher Lösung oder modifizierter Davidson-Lösung zu fixieren (16) (17) (18). Eine Fixation in Formalin ist für diese Gewebe nicht zu empfehlen. Um ein rasches Eindringen des Fixierungsmittels zu ermöglichen, kann die Tunica albuginea an beiden Enden des Organs vorsichtig und flach mit einer Nadel punktiert werden. Die klinischen und sonstigen Befunde können weitere Gewebeuntersuchungen erforderlich machen. Auch Organe, die aufgrund der bekannten Eigenschaften des Prüfstoffs als mögliche Zielorgane in Frage kommen, sollten aufbewahrt werden.

66. Die folgenden Gewebe können wichtige Hinweise auf endokrine Wirkungen geben: Gonaden (Ovarien und Hoden), akzessorische Geschlechtsorgane (Uterus mit Zervix, Nebenhoden, Samenbläschen mit Koagulationsdrüsen, Prostata dorsolateral und ventral), Vagina, Hypophose, männliche Brustdrüse und Nebennieren. Veränderungen der männlichen Brustdrüsen sind nicht ausreichend dokumentiert, bei diesem Parameter können aber sehr empfindliche Reaktionen auf Stoffe mit östrogener Wirkung vorkommen. Die Beobachtung von nicht unter Nummer 65 genannten Organen/Geweben ist fakultativ.

67. Tote Jungtiere und Jungtiere, die an Tag 13 nach der Geburt oder kurz danach getötet wurden, sollten zumindest äußerlich sorgfältig auf auffallende Anomalien untersucht werden. Besondere Beachtung erfordern die externen Genitalien, die auf Anzeichen für eine veränderte Entwicklung zu untersuchen sind.

Histopathologie

68. Die konservierten Organe und Gewebe der ausgewählten Tiere der Kontrollgruppe und der Hochdosisgruppe (unter besonderer Berücksichtigung der Spermatogenese in den männlichen Keimdrüsen und der Histopathologie der interstitiellen testikulären Zellstruktur) sollten einer vollständigen histopathologischen Untersuchung unterzogen werden. Die Schilddrüsen von Jungtieren und von den übrigen adulten Tieren können erforderlichenfalls untersucht werden. Diese Untersuchungen sind auch auf die Tiere anderer Dosisgruppen auszudehnen, wenn behandlungsbedingte Veränderungen in der Gruppe mit der höchsten Dosis festgestellt werden. Der Leitfaden zur Histopathologie (10) enthält zusätzliche Informationen zur Sektion, Fixierung, Schnittherstellung und Histopathologie endokriner Gewebe.

69. Alle makroskopischen Läsionen sind zu untersuchen. Um die Ermittlung der Konzentration ohne beobachtete schädliche Wirkungen (NOAEL) zu erleichtern, sollten Zielorgane in anderen Dosisgruppen untersucht werden, insbesondere in Gruppen, für die niedrige NOAEL-Werte angegeben wurden.

70. Umfasst eine Prüfung auch eine Satellitengruppe, sind bei den Tieren dieser Gruppe die Gewebe und Organe histopathologisch zu untersuchen, bei denen in den Behandlungsgruppen Wirkungen aufgetreten sind.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

71. Es sollten Daten zu den einzelnen Tieren bereitgestellt werden. Außerdem sollten sämtliche Daten in tabellarischer Form zusammengefasst werden; dabei werden für jede Prüfgruppe die Anzahl der Tiere zu Beginn der Prüfung, die Anzahl der während der Prüfung tot aufgefundenen Tiere beziehungsweise der aus humanen Gründen getöteten Tiere, der jeweilige Zeitpunkt des Todes beziehungsweise der Tötung, die Anzahl der fruchtbaren Tiere, die Anzahl der trächtigen weiblichen Tiere, die Anzahl der Tiere mit Anzeichen von Toxizität, eine Beschreibung der beobachteten Anzeichen von Toxizität, einschließlich des Zeitpunkts, zu dem die toxischen Wirkungen eingetreten sind, deren Dauer und Schweregrad, die Arten von histopathologischen Veränderungen und alle relevanten Daten zu den Würfen angegeben. Anlage 3 enthält ein tabellarisches Berichtsformat, das sich als sehr hilfreich für die Evaluierung der reproduktions- bzw. entwicklungstoxischen Wirkungen erwiesen hat.

72. Wenn möglich, sollten die numerischen Ergebnisse mittels einer geeigneten und allgemein anerkannten statistischen Methode ausgewertet werden. Durch Vergleiche der Wirkungen in einem Dosisbereich sollte die Anwendung multipler t-Tests vermieden werden. Die statistischen Methoden sollten bei der Planung der Studie festgelegt werden. Statistische Analysen des AGD und der Brustwarzenretention sollten auf den Daten einzelner Jungtiere unter Berücksichtigung der Wurfgröße beruhen. Gegebenenfalls sind die jeweiligen Würfe als Analyseeinheit anzunehmen. Statistische Analysen des Körpergewichts der Jungtiere sollten auf den Daten einzelner Jungtiere unter Berücksichtigung der Wurfgröße beruhen. Wegen des begrenzten Umfangs der Studie sind statistische Analysen in Form von „Signifikanzprüfungen" für viele Endpunkte, insbesondere für reproduktionsbezogene Endpunkte, nur von begrenzter Bedeutung. Einige der am weitesten verbreiteten Methoden, besonders parametrische Untersuchungen anhand von Maßen der zentralen Tendenz, sind nicht geeignet. Wenn statistische Analysen durchgeführt werden, sollte die gewählte Methode der Verteilung der zu untersuchenden Variable angemessen sein und vor Beginn der Studie festgelegt werden.

Auswertung der Ergebnisse

73. Die Befunde dieser Toxizitätsstudie sind im Hinblick auf die beobachteten Wirkungen sowie auf Nekropsie- und Mikroskopiebefunde zu bewerten. Die Bewertung beinhaltet den vorhandenen beziehungsweise nicht vorhandenen Zusammenhang zwischen der Dosierung der Prüfchemikalie und vorhandenen Anomalien sowie deren Häufigkeit und Schwere, einschließlich makroskopischer Läsionen, identifizierter Zielorgane, Unfruchtbarkeit, klinischer Anomalien, beeinträchtigter Reproduktions- und Wurfleistungen, Körpergewichtsveränderungen, Auswirkungen auf die Mortalität und etwaiger sonstiger toxischer Auswirkungen.

74. Wegen der kurzen Dauer der Behandlung der männlichen Tiere sollte bei der Bewertung der reproduktionstoxischen Wirkungen bei männlichen Tieren die Histopathologie der Hoden und der Nebenhoden zusammen mit den Fertilitätsdaten berücksichtigt werden. Die Einbeziehung verfügbarer historischer Kontrolldaten zur Reproduktions-/Entwicklungstoxizität (z. B. für Wurfgröße, AGD, Brustwarzenretention und Serumspiegel (T4)) kann bei der Auswertung der Studie ebenfalls hilfreich sein.

75. Für die Qualitätskontrolle wird vorgeschlagen, historische Kontrolldaten zu sammeln und Variationskoeffizienten für numerische Daten zu berechnen, insbesondere für die Parameter, die mit dem Nachweis der Störung des endokrinen Systems zusammenhängen. Diese Daten können für Vergleichszwecke verwendet werden, wenn tatsächliche Studien bewertet werden.

Prüfbericht

76. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalie:

— Herkunft, Partienummer, ggf. begrenztes Verwendungsdatum;

— Stabilität der Prüfchemikalie, falls bekannt.

Einkomponentiger Stoff:

— physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;

— chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:

— möglichst weitgehende Charakterisierung anhand der chemischen Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

Vehikel (wenn verwendet):

— Begründung der Auswahl des Vehikels, falls kein Wasser verwendet wurde.

Versuchstiere:

— Tierart/Stamm,

— Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;

— Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.;

— Gewicht der einzelnen Tiere bei Versuchsbeginn;

— Begründung für die Wahl einer anderen Art als der Ratte.

Prüfbedingungen:

— Begründung der gewählten Dosisstufen;

— Angaben zur Zubereitungsform des Prüfstoffs/des Futters, der erreichten Konzentration, Stabilität und Homogenität der Zubereitung;

— Angaben zur Verabreichung der Prüfchemikalie;

— gegebenenfalls Angaben zur Umrechnung der Konzentration des Prüfstoffs im Futter/Wasser (ppm) in die entsprechende Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag);

— Angaben über Futter- und Wasserqualität;

— genaue Beschreibung des Verfahrens für die Zufallsauswahl von Jungtieren zwecks Tötung (wenn Jungtiere getötet werden).

Ergebnisse

— Körpergewicht/Änderungen des Körpergewichts;

— gegebenenfalls Angaben zur Futter- und Wasseraufnahme;

— Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Dosierung, einschließlich Fruchtbarkeit, Trächtigkeit und sonstige Anzeichen von Toxizität;

— Graviditätslänge;

— toxische oder sonstige Wirkungen auf Reproduktion, Nachkommen, postnatales Wachstum usw.;

— Art, Schweregrad und Dauer der klinischen Beobachtungen (mit Angaben zur Reversibilität);

— Bewertung von sensorischer Aktivität, Greifkraft und motorischer Aktivität;

— hämatologische Parameter mit entsprechenden Ausgangswerten;

— klinisch-biochemische Parameter mit entsprechenden Ausgangswerten;

— Zahl adulter weiblicher Tiere mit normalem oder abnormalem Östruszyklus sowie Zyklusdauer;

— Anzahl der Lebendgeburten und der Postimplantationsverluste;

— Anzahl der Jungtiere mit sichtbaren erheblichen Anomalien, allgemeine Bewertung externer Genitalien, Anzahl der Kümmerlinge;

— Zeitpunkt des Todes im Verlauf der Studie oder Angabe, ob Tiere bis zum Schluss überlebt haben;

— Anzahl der Implantate, Wurfgröße und Wurfgewichte zum Zeitpunkt der Aufzeichnung;

— Angaben zum Körpergewicht der Jungtiere;

— AGD aller Jungtiere (und Körpergewicht am Tag der AGD-Messung);

— Brustwarzenretention bei männlichen Jungtieren;

— Schilddrüsenhormonspiegel, Jungtiere an Tag 13 und adulte männliche Tiere (sowie Muttertiere und Jungtiere an Tag 4, wenn gemessen);

— Körpergewicht bei Tötung sowie Organgewichtsdaten für die Elterntiere;

— Sektionsbefunde;

— ausführliche Beschreibung aller histopathologischen Befunde;

— Absorptionsdaten, soweit vorhanden;

— statistische Auswertung der Ergebnisse, wenn möglich.

Erörterung der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen.

Auswertung der Ergebnisse

77. Mit der Studie wird die Reproduktions-/Entwicklungstoxizität bei wiederholter Verabreichung bewertet. Insbesondere da der Schwerpunkt sowohl auf die allgemeine Toxizität als auch auf reproduktions-/entwicklungstoxische Endpunkte gelegt wird, ermöglichen die Prüfungsergebnisse eine Unterscheidung zwischen den Wirkungen auf die reproduktions-/entwicklungstoxische Wirkung, die ohne allgemeine Toxizität auftreten, und Veränderungen, die nur bei Dosen vorkommen, die auch bei Elterntieren toxisch wirken (Nummern 7-11). Die Untersuchung könnte Aufschluss über die Notwendigkeit der Durchführung weiterer Untersuchungen geben und zu Empfehlungen für die Gestaltung von Folgestudien führen. Als Hilfe bei der Auswertung der reproduktions- und entwicklungstoxischen Ergebnisse ist OECD Guidance Document Nr. 43 zu Rate zu ziehen (19). OECD Guidance Document Nr. 106 über die histologische Auswertung von Prüfungen zur Feststellung endokriner und reproduktionstoxischer Wirkungen bei Nagern (16) enthält Informationen zur Vorbereitung und Auswertung von (endokrinen) Organen und von Vaginalabstrichen, die für diese Prüfmethode hilfreich sein könnten.

LITERATUR

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Auf Anfrage erhältlich bei der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokio, 27.-29. Oktober 1992. Auf Anfrage erhältlich bei der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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. und 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. und 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, 10. und 11. März 1998. Auf Anfrage erhältlich bei der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(8) Goldman, J.M., Murr, A.S., Buckalew, A.R., Ferrell, J.M. und 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), S. 84-97.

(9) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston, C.R. und Short, R.V. (Hrsg.), 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. und Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol*. Toxic. Appl. *Pharmacol*., 108, 267-283.

(12) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. und Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rates and Mice. A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. *Toxicol*., 1, 233-236.

(13) Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A. und 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 und V.L. Reynolds. (1999). „Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights", Reproductive Toxicology, 13: S. 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(16) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No. 106), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(17) Hess, R.A. und Moore, B.J. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin, R.E. und Heindel, J.J. (Hrsg.). Academic Press: San Diego, CA, S. 52-85.

(18) Latendresse, J.R., Warbrittion, A.R., Jonassen, H., Creasy, D.M. (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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN (Siehe Auch (20) Oecd Gd 150)

Androgene Wirkung Die Fähigkeit einer Chemikalie, in einem Säugetierorganismus wie ein natürliches androgenes Hormon zu wirken (z. B. Testosteron).

Antiandrogene Wirkung Die Fähigkeit einer Chemikalie, die Wirkung eines natürlichen androgenen Hormons (z. B. Testosteron) in einem Säugetierorganismus zu unterdrücken.

Antiöstrogene Wirkung Die Fähigkeit einer Chemikalie, die Wirkung eines natürlichen östrogenen Hormons (z. B. 17ß-Estradiol) in einem Säugetierorganismus zu unterdrücken.

Antithyroide Wirkung Die Fähigkeit einer Chemikalie, die Wirkung eines natürlichen Schilddrüsenhormons (z. B. T_3) in einem Säugetierorganismus zu unterdrücken.

Chemikalie Ein Stoff oder Gemisch.

Entwicklungstoxizität Das Auftreten einer reproduktionstoxischen Wirkung mit prä-, peri- und postnatalen, strukturellen oder funktionellen Störungen bei der Nachkommenschaft.

Dosis Die Menge der verabreichten Prüfchemikalie. Die Dosis wird ausgedrückt als Masse der Prüfchemikalie je Einheit Körpergewicht des Versuchstiers pro Tag (z. B. mg/kg Körpergewicht/Tag) oder als konstante Konzentration im Futter.

Dosierung Ein allgemeiner Begriff, der die Dosis, ihre Häufigkeit und die Dauer der Verabreichung umfasst.

Offensichtliche Toxizität Ein allgemeiner Begriff zur Beschreibung deutlicher Toxizitätszeichen nach Verabreichung einer Prüfchemikalie. Diese Zeichen sollten für eine Bewertung der Gefährdung ausreichen und so schwerwiegend sein, dass bei einer Steigerung der verabreichten Dosis die Entwicklung schwerer Toxizitätszeichen und der wahrscheinliche Tod zu erwarten wären.

Fertilitätsströungen Störungen der männlichen oder weiblichen Reproduktionsfunktionen oder -fähigkeit.

Maternale Toxizität Schädliche Wirkungen auf trächtige weibliche Tiere, die entweder spezifisch (direkte Wirkungen) oder nicht spezifisch (indirekte Wirkungen) auftreten und mit dem Zustand der Gravidität in Zusammenhang stehen.

NOAEL Abkürzung für No Observed Adverse Effect Level. Dies ist die höchste Dosis, bei der keine schädigenden behandlungsbedingten Wirkungen festgestellt werden.

Östrogene Wirkung Die Fähigkeit einer Chemikalie, in einem Säugetierorganismus wie ein natürliches östrogenes Hormon zu wirken (z. B. 17ß-Estradiol).

Reproduktionstoxizität Schädliche Wirkungen auf die Nachkommenschaft und/oder Beeinträchtigung der männlichen und weiblichen Reproduktionsfunktionen oder -kapazität.

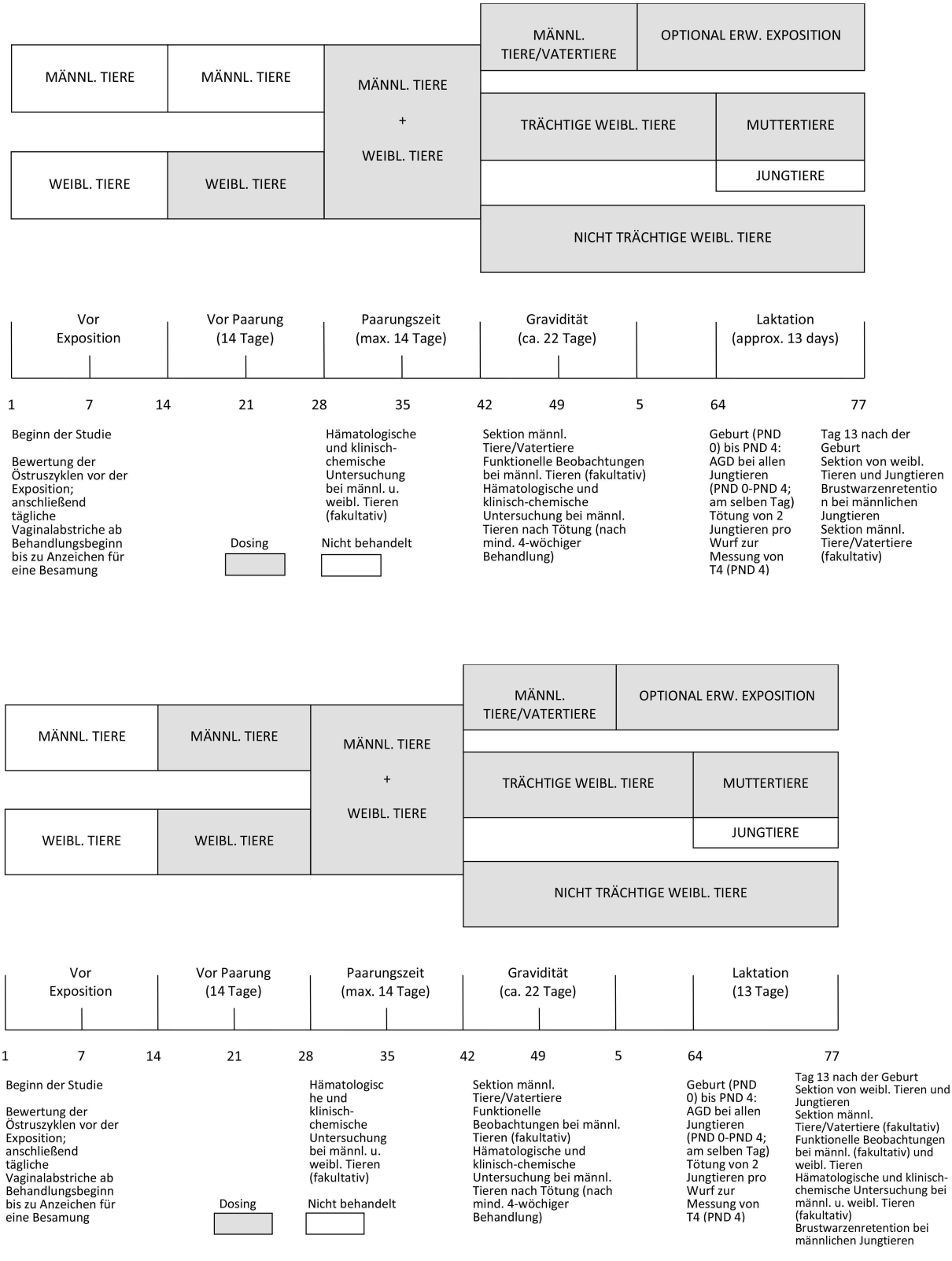
Prüfchemikalie Ein beliebiger Stoff oder ein beliebiges Gemisch, der/das nach dieser Methode geprüft wird.

Thyroide Wirkung Fähigkeit einer Chemikalie, in einem Säugetierorganismus wie ein natürliches Schilddrüsenhormon (z. B. T_3) zu wirken.

Validierung Ein wissenschaftlicher Prozess zur Beschreibung der operationellen Anforderungen und Grenzen einer Prüfmethode und zum Nachweis ihrer Zuverlässigkeit und Eignung für einen bestimmten Zweck.

Anlage 2

DIAGRAMM ZUM VERSUCHSPLAN MIT ANGABEN ZUR MAXIMALEN DAUER DER STUDIE AUSGEHEND VON DER VOLLSTÄNDIGEN 14-TÄGIGEN PAARUNGSZEIT



Anlage 3

TABELLARISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER AUSWIRKUNGEN AUF DIE REPRODUKTION/ENTWICKLUNG

BEOBACHTUNGEN	WERTE				
Dosierung (Einheiten).	0 (Kontrolle)	…	…	…	…
Ausgangspaarungen (N)					
Östruszyklus (mindestens mittlere Dauer und Häufigkeit unregelmäßiger Zyklen)					
Weibliche Tiere mit Anzeichen für eine Besamung (N)					
Trächtige weibliche Tiere (N)					
Empfängnistage 1-5 (N)					
Empfängnistage 6- (N)..[1] (1) (N)					
Gravidität ≤ 21 Tage (N)					
Gravidität = 22 Tage (N)					
Gravidität ≥ 23 Tage (N)					
Muttertiere mit lebenden Jungtieren (N)					
Muttertiere mit lebenden Jungtieren an Tag 4 pp (N)					
Implantate/Muttertier (Mittelwert)					
Lebende Jungtiere/Muttertiere bei Geburt (Mittelwert)					
Lebende Jungtiere/Muttertiere an Tag 4 (Mittelwert)					
Geschlechterverhältnis (m/w) bei Geburt (Mittelwert)					
Geschlechterverhältnis (m/w) an Tag 4 (Mittelwert)					
Wurfgewicht bei Geburt (Mittelwert)					
Wurfgewicht an Tag 4 (Mittelwert)					
Gewicht der Jungtiere bei Geburt (Mittelwert)					
Gewicht der Jungtiere zum Zeitpunkt der AGD-Messung (Mittelwert männliche Jungtiere, Mittelwert weibliche Jungtiere)					
AGD der Jungtiere am selben Tag nach der Geburt, Geburt – Tag 4 (Mittelwert männliche Jungtiere, Mittelwert weibliche Jungtiere, PND vermerken)					

BEOBACHTUNGEN	WERTE				
Gewicht der Jungtiere an Tag 4 (Mittelwert)					
Gewicht der Jungtiere an Tag 13 (Mittelwert)					
Brustwarzenretention bei männlichen Jungtieren an Tag 13 (Mittelwert)					
JUNGTIERE MIT ANOMALIEN					
Muttertiere mit 0					
Muttertiere mit 1					
Muttertiere mit ≥ 2					
VERLUST AN NACHKOMMEN					
Pränatal (Implantationen abzüglich Lebendgeburten)					
Weibliche Tiere mit 0					
Weibliche Tiere mit 1					
Weibliche Tiere mit 2					
Weibliche Tiere mit ≥ 3					
Postnatal (Lebendgeburten abzüglich lebender Tiere an Tag 13 nach der Geburt)					
Weibliche Tiere mit 0					
Weibliche Tiere mit 1					
Weibliche Tiere mit 2					
Weibliche Tiere mit ≥ 3					

([1]) letzter Tag der Paarungszeit

B.65 *IN-ITRO*-PRÜFMETHODE ZUR UNTERSUCHUNG DER MEMBRAN-BARRIERE AUF HAUTVERÄTZUNGEN

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 435 (2015). Als Hautverätzung wird das Auslösen einer irreversiblen Hautschädigung, d. h. einer sichtbaren, bis in das Corium reichenden Nekrose der Epidermis nach Applikation einer Prüfchemikalie im Sinne der Definition des Global harmonisierten Systems zur Einstufung und Kennzeichnung von Gefahrstoffen der UN (GHS) (1) und der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (CLP-Verordnung) ([1])] bezeichnet. Diese Prüfmethode entspricht der aktualisierten OECD Prüfrichtlinie 435 und besteht in einer *In-vitro*-Prüfmethode zur Untersuchung der Membranbarriere, mit der ätzende Chemikalien ermittelt werden können. Bei dieser Prüfmethode wird eine künstliche Membran verwendet, die *in situ* auf ätzende Chemikalien ähnlich reagiert wie Tierhaut.
2. Hautverätzungen wurden gewöhnlich durch Auftragen der Prüfchemikalie auf die Haut lebender Tiere und durch anschließende Bewertung des Umfangs von Gewebeschäden nach einem bestimmten Zeitraum bewertet (2). Außer dieser Prüfmethode wurden alternativ (3) (4) zum *In-vivo*-Standardverfahren zur Untersuchung von Kaninchenhaut (Kapitel B.4, entsprechend OECD TG 404) noch mehrere weitere *In-vitro*-Prüfmethoden zur Ermittlung ätzender Chemikalien (2) angenommen. In der abgestuften Prüf- und Bewertungsstrategie nach dem UN GHS zur Bewertung und Beurteilung von Hautverätzungen und im OECD-Leitliniendokument über integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA = Integrated Approaches to Testing and Assessment) zur Untersuchung von Hautverätzungen und -reizungen wird die Verwendung validierter und akzeptierter *In-vitro*-Prüfmethoden in den Modulen 3 und 4 beschrieben (1) (5). Die IATA beschreiben mehrere Module, in denen Informationsquellen und Analyseinstrumente zu Gruppen zusammengefasst werden. Sie enthalten i) Leitlinien dazu, wie vorhandene Daten aus Versuchen und aus anderen Quellen integriert und verwendet werden können, um das Hautreizungs- und das Hautverätzungspotenzial von Chemikalien zu bewerten, und ii) einen Vorschlag zur Durchführung ggf. erforderlicher weiterer Versuche (u. a. bei negativen Ergebnissen) (5). Bei diesem modularen Ansatz können Chemikalien aufgrund von positiven Ergebnissen, die in *In-vitro*-Prüfmethoden ermittelt wurden, als ätzend eingestuft werden, ohne Tierversuche durchführen zu müssen; dadurch wird die Verwendung von Tieren reduziert und optimiert, um Schmerzen und Qualen zu vermeiden, denen für diesen Zweck zu verwendende Tiere ausgesetzt würden.
3. Das im Handel unter der Bezeichnung Corrositex® erhältliche *In-vitro*-Membran-Barrieremodell (6) (7) (8) wurde in Validierungsstudien untersucht; dabei wurden für eine Datenbank mit 163 Stoffen und Gemischen eine Gesamtgenauigkeit zur Vorhersage von Hautverätzungen von 79 % (128/163), eine Empfindlichkeit von 85 % (76/89) und eine Spezifizität von 70 % (52/74) ermittelt (7). Aufgrund ihrer anerkannten Validität wurde diese validierte Referenzmethode (VRM) zur Verwendung im Rahmen einer abgestuften Prüfstrategie zur Bewertung des hautätzenden Gefährdungspotenzials von Chemikalien empfohlen (5) (7). Bevor ein *In-vitro*-Membran-Barrieremodell zur Untersuchung auf Hautverätzungen für regulatorische Zwecke verwendet werden kann, sollten nach den Anforderungen der Leistungsstandards (10) Verlässlichkeit, Relevanz (Genauigkeit) und die Grenzen des Verfahrens für den vorgeschlagenen Verwendungszweck bestimmt werden, um sicherzustellen, dass es nach den vordefinierten Leistungsstandards (PS) mit der VRM vergleichbar ist (9). Die gegenseitige Anerkennung der Daten gemäß dem OECD-Übereinkommen wird erst dann garantiert, wenn vorgeschlagene neue oder aktualisierte Methoden auf der Grundlage der Leistungsstandards überprüft und in die gleichwertige OECD-Prüfrichtlinie aufgenommen wurden. Gegenwärtig ist das im Handel unter der Bezeichnung Corrositex® angebotene Modell die einzige *In-vitro*-Methode, die der OECD-Prüfrichtlinie 435 entspricht.
4. Andere Prüfmethoden zur Untersuchung auf Hautverätzungen beruhen auf der Verwendung rekonstituierter menschlicher Haut (OECD TG 431) (3) und isolierter Rattenhaut (OECD TG 430) (4). Diese Prüfrichtlinie sieht die Möglichkeit der Einstufung ätzender Chemikalien nach ihrer Verätzungswirkung in drei UN-GHS-Unterkategorien und nach der Verätzungsgefahr in drei UN-Verpackungsgruppen vor. Die OECD-Prüfrichtlinie wurde ursprünglich im Jahr 2006 angenommen und 2015 unter Berücksichtigung des IATA-Leitliniendokuments sowie zur Anpassung der Liste der Leistungsstoffe aktualisiert.

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

5. Es gelten die Begriffsbestimmungen der Anlage.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

6. Die in dieser Prüfmethode beschriebene Untersuchung ermöglicht die Ermittlung ätzender Prüfchemikalien und die Unterkategorisierung ätzender Prüfchemikalien nach dem UN GHS bzw. der CLP-Verordnung (Tabelle 1). Außerdem kann eine solche Prüfmethode als Entscheidungsgrundlage für die Beurteilung einer ätzenden bzw. nicht ätzenden Wirkung spezifischer Chemikalienklassen (z. B. organischer und anorganischer Säuren, Säurederivate ([2]) und Basen für die Zwecke der Untersuchung bestimmter Transportwirkungen) dienen (7) (11) (12). Diese Prüfmethode beschreibt ein allgemeines Verfahren ähnlich der validierten Referenzprüfmethode (7). Sie liefert keine geeigneten Informationen

([1]) Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

([2]) Der Begriff „Säurederivat“ bezeichnet eine nicht spezifische Klasse im Allgemeinen bestehend aus Chemikalien, die mittelbar oder unmittelbar oder durch Modifikation oder partielle Substitution aus einer Säure hervorgegangen sind. Zu dieser Klasse zählen Anhydride, Halosäuren, Salze und andere Arten von Chemikalien.

über Hautreizungen; mit PM B.46 (gleichwertig OECD TG 439) werden jedoch gezielt die gesundheitlichen Auswirkungen von Hautreizungen *in vitro* untersucht (13). Eine umfassende Evaluierung lokaler Auswirkungen auf die Haut nach einer einmaligen dermalen Exposition ist dem OECD-Leitliniendokument über integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA) zu entnehmen (5).

Tabelle 1

Die Hautverätzungskategorien und -unterkategorien des UN GHS (1) [1]

Verätzungskategorie (Kategorie 1) (für Behörden, die keine Unterkategorien verwenden)	Potenzielle Unterkategorien von Verätzungswirkungen [1] (für Behörden, die Unterkategorien (u. a. die der CLP-Verordnung) verwenden)	Hautätzend bei ≥ 1 von 3 Tieren	
		Exposition	Beobachtung
Hautätzend	Hautätzend Unterkategorie 1A	≤ 3 Minuten	≤ 1 Stunde
	Hautätzend Unterkategorie 1B	> 3 Minuten / ≤ 1 Stunde	≤ 14 Tage
	Hautätzend Unterkategorie 1C	> 1 Stunde / ≤ 4 Stunden	≤ 14 Tage

[1] Für die EU sieht die CLP-Verordnung für Hautverätzungen die drei Unterkategorien 1A, 1B und 1C vor.

7. Eine Begrenzung der validierten Referenzmethode (7) besteht darin, dass viele nicht ätzende Chemikalien und einige ätzende Chemikalien aufgrund der Ergebnisse der ursprünglichen Kompatibilitätsprüfung für eine Untersuchung möglicherweise nicht in Betracht kommen (Nummer 13). Wässerige Chemikalien mit pH-Werten im Bereich von 4,5 bis 8,5 können häufig nicht untersucht werden; allerdings erwiesen sich 85 % der in diesem pH-Bereich untersuchten Chemikalien in Tierversuchen als nicht ätzend (7). Die Prüfmethode mit der *In-vitro*-Membranbarriere kann zur Untersuchung von (in Wasser löslichen oder nicht löslichen) Feststoffen, (wässerigen oder nicht wässerigen) Flüssigkeiten und Emulsionen verwendet werden. Prüfchemikalien, die bei der Kompatibilitätsprüfung jedoch keine nachweisbare Änderung bewirken (d. h. keine farbliche Veränderung im CDS (Chemical Detection System) der validierten Referenzprüfmethode) können mit der Prüfmethode unter Verwendung der Membranbarriere nicht untersucht werden. Bei diesen Chemikalien sollten andere Prüfmethoden zur Anwendung kommen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

8. Das Prüfsystem umfasst zwei Bestandteile: eine synthetische makromolekulare Biobarriere und ein CDS (Chemical Detection System); bei dieser Prüfmethode werden mit dem CDS Schäden der Membranbarriere erkannt, die durch ätzende Prüfchemikalien nach der Aufbringung der Prüfchemikalien auf die synthetische makromolekulare Membranarriere hervorgerufen wurden (7) und die vermutlich auf denselben Verätzungsmechanismus bzw. dieselben Verätzungsmechanismen zurückzuführen sind, die auch auf lebende Haut einwirken.

9. Die Durchdringung (oder der Durchbruch) der Membranbarriere kann mit verschiedenen Verfahren oder mit einem CDS gemessen werden, u. a. anhand von Verfärbungen eines pH-Indikatorfarbstoffs oder anderer Merkmale der Indikatorlösung unter der Barriere.

10. Die Validität der Membranbarriere, d. h. die Eignung und die Zuverlässigkeit für die beabsichtigte Verwendung, sollte nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang ist auch sicherzustellen, dass unterschiedliche Zubereitungen hinsichtlich der Barriereeigenschaften einheitlich sind (z. B. dass sie eine Barriere gegenüber nicht ätzenden Chemikalien aufrechterhalten können, oder dass sie die Verätzungsmerkmale von Chemikalien in den verschiedenen Unterkategorien von Verätzungswirkungen nach dem UN GHS unterscheiden können (1). Die vorgenommene Einstufung richtet sich nach dem Zeitraum, den eine Chemikalie benötigt, um durch die Membranbarriere in die Indikatorlösung zu gelangen.

NACHWEIS DER LEISTUNGFÄHIGKEIT

11. Vor der routinemäßigen Anwendung der Prüfmethode mit der *In-vitro*-Membranbarriere nach dieser Prüfmethode sollten Labors die erforderliche technische Befähigung durch eine ordnungsgemäße Einstufung der zwölf in Tabelle 2 empfohlenen Leistungsstoffe nachweisen. Wenn ein dort genannter Stoff nicht verfügbar ist bzw. wenn dies gerechtfertigt ist, kann ein anderer Stoff verwendet werden, für den geeignete *In-vivo*- und *In-vitro*-Referenzdaten verfügbar sind (z. B. aus der Liste der Referenzchemikalien (10)), sofern die in Tabelle 1 beschriebenen Auswahlkriterien berücksichtigt werden.

Tabelle 2

Leistungsstoffe ([1])

Stoff ([2])	CAS-Nr.	Chemikalienklasse	*In-vivo*-UN-GHS-Unterkategorie ([3])	*In-vitro*-UN-GHS-Unterkategorie ([3])
Bortrifluoriddihydrat	13319-75-0	Anorganische Säuren	1A	1A
Salpetersäure	7697-37-2	Anorganische Säuren	1A	1A
Phosphorpentachlorid	10026-13-8	Ausgangsstoffe anorganischer Säuren	1A	1A
Valerylchlorid	638-29-9	Säurechloride	1B	1B
Natriumhydroxid	1310-73-2	Anorganische Basen	1B	1B
1-(2-Aminoethyl)piperazin	140-31-8	Aliphatische Amine	1B	1B
Benzolsulfonylchlorid	98-09-9	Säurechloride	1C	1C
N,N-Dimethylbenzylamin	103-83-3	Aniline	1C	1C
Tetraethylenepentamin	112-57-2	Aliphatische Amine	1C	1C
Eugenol	97-53-0	Phenole	NC	NC
Nonylacrylat	2664-55-3	Acrylate/Methacrylate	NC	NC
Natriumbicarbonat	144-55-8	Anorganische Salze	NC	NC

([1]) Die zwölf oben genannten Stoffe enthalten jeweils drei Stoffe aus den drei UN-GHS-Unterkategorien ätzender Stoffe und drei nicht ätzende Stoffe, die im Handel leicht erhältlich sind; die Einstufungen in die UN-GHS-Unterkategorien wurden anhand der Ergebnisse leistungsfähiger *In-vivo*-Prüfungen vorgenommen. Diese Stoffe wurden aus der Liste mit den 40 Referenzstoffen im Mindestverzeichnis der Chemikalien ausgewählt, die als zum Nachweis der Genauigkeit und der Zuverlässigkeit von Prüfmethoden geeignet ermittelt wurden, strukturell und funktionell der validierten Referenzprüfmethode ähnlich sind und unter den 163 Referenzchemikalien ausgewählt wurden, die ursprünglich zur Validierung der Referenzprüfmethode verwendet wurden (Corrositex®) (7) (10) (14). Durch diesen Auswahlprozess sollten in größtmöglichem Umfang Chemikalien berücksichtigt werden, die die folgenden Anforderungen erfüllten: Sie waren repräsentativ für die Verätzungswirkungen (z. B. nicht ätzende Chemikalien oder ätzende Chemikalien der UN-Verpackungsgruppen I, II und III), die mit der validierten Referenzprüfmethode gemessen oder vorhergesagt werden können; sie waren repräsentativ für die im Validierungsprozess verwendeten Chemikalienklassen; sie wiesen klar definierte chemische Strukturen auf; sie führten in der *In-vivo*-Referenzprüfung zu eindeutigen Ergebnissen; sie waren im Handel erhältlich; sie waren nicht mit nicht tragbaren Entsorgungskosten verbunden (14).

([2]) Stoffe, die rein bzw. mit einer Reinheit von ≥ 90 % geprüft wurden.

([3]) Den UN-GHS-Unterkategorien 1A, 1B und 1C entsprechen die UN-Verpackungsgruppen I, II und III. NC (nicht ätzend)

VERFAHREN

12. In den folgenden Absätzen werden die Elemente und Verfahren einer Prüfmethode mit einer künstlichen Membranbarriere zur Beurteilung der Verätzungswirkung (7) (15) auf der Grundlage der aktuellen VRM (d. h. mit der im Handel erhältlichen Membran Corrositex®) beschrieben. Die Membranbarriere und die Kompatibilitäts-/Indikator- und Kategorisierungslösungen können hergestellt, zubereitet und im Handel bezogen werden. Dies gilt beispielsweise im Falle der VRM für Corrositex®. Für die validierte Referenzprüfmethode wurde ein Prüfmethodenprotokoll als Beispiel beschrieben (7). Die Prüfung sollte bei Umgebungstemperatur (17-25 °C) vorgenommen werden, und die verwendeten Elemente sollten die folgenden Anforderungen erfüllen.

Kompatibilitätsprüfung der Prüfchemikalie

13. Vor der Durchführung der Prüfung mit der Membranbarriere wird eine Kompatibilitätsprüfung vorgenommen, um festzustellen, ob die Prüfchemikalie vom CDS erkannt wird. Wenn das CDS die Prüfchemikalie nicht erkennt, ist die Prüfmethode mit der Membranbarriere zur Beurteilung der potenziellen Verätzungswirkung dieser Prüfchemikalie nicht geeignet. In diesem Fall sollte eine andere Prüfmethode gewählt werden. Das CDS und die Expositionsbedingungen bei der Kompatibilitätsprüfung sollten der Exposition in der anschließenden Prüfung mit der Membranbarriere entsprechen.

Prüfung zur Ermittlung der Zeitkategorie für Prüfchemikalien

14. Wenn für die Prüfmethode relevant, sollten in der Kompatibilitätsprüfung als geeignet befundene Prüfchemikalien einer Prüfung zur Ermittlung der Zeitkategorie, d. h. einer Screening-Prüfung zur Unterscheidung zwischen schwachen und starken Säuren bzw. Basen, unterzogen werden. Bei der validierten Referenzprüfmethode beispielsweise wird durch eine Zeitkategorieprüfung anhand des Nachweises einer starken sauren bzw. alkalischen Reserve festgestellt, welche der beiden Zeitkategorien anzunehmen ist. Die Verätzungswirkung und die UN-GHS-Unterkategorie der hautverätzenden Wirkung sollten je nach der sauren oder alkalischen Reserve der Prüfchemikalie mit zwei unterschiedlichen Durchbruchzeiten bestimmt werden.

ELEMENTE DER PRÜFMETHODE UNTER VERWENDUNG EINER MEMBRANBARRIERE

Membranbarriere

15. Die Membranbarriere besteht aus zwei Elementen: einem makromolekularen wässerigen Protein-Gel und einer permeablen Trägermembran. Das Protein-Gel sollte für Flüssigkeiten und Feststoffe undurchlässig sein. Eine Durchlässigkeit kann aber infolge einer Verätzung entstehen. Die vollständige Membranbarriere sollte unter festgelegten Bedingungen aufbewahrt werden, bei der sich die Beschaffenheit des Gels nachweislich nicht verändert (etwa durch Austrocknung, Wachstum von Mikroorganismen, Verrutschen oder Risse, die das Verhalten der Barriere beeinträchtigen würden). Wie lange die Membranbarriere aufbewahrt werden kann, sollte ermittelt werden. Nach Ablauf der betreffenden Frist sollten die zubereiteten Membranbarrieren nicht mehr verwendet werden.

16. Die permeable Trägermembran dient beim Geliervorgang und bei der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie als mechanische Unterlage für das Proteingel. Die Trägermembran sollte dafür sorgen, dass das Gel nicht sackt oder verrutscht und für alle Prüfchemikalien leicht durchlässig sein.

17. Das Protein-Gel (bestehend z. B. aus Keratin, Kollagen oder Gemischen von Proteinen, die eine Gelmatrix bilden) fungiert als Zielmaterial für die Prüfchemikalie. Das Proteinmaterial wird auf die Trägermembran aufgebracht, wo es gelieren kann, bevor die Indikatorlösung mit der Membranbarriere verschlossen wird. Das Protein-Gel sollte eine einheitliche Stärke und Dichte haben und keine Lufteinschlüsse oder Schäden aufweisen, die seine Funktion beeinträchtigen könnten.

CDS (Chemical Detection System)

18. Die Indikatorlösung (die gleiche Lösung, die auch für die Kompatibilitätsprüfung verwendet wurde), sollte das Vorhandensein von Prüfchemikalien anzeigen. Für die Prüfung sollten ein pH-Indikatorfarbstoff oder eine Kombination von Farbstoffen (z. B. Kresolrot und Methylorange) verwendet werden, deren Farbe sich verändert, wenn eine Prüfchemikalie vorhanden ist. Das Messsystem kann visuell oder elektronisch sein.

19. Detektionssysteme, die zur Detektion des Durchgangs der Prüfchemikalie durch die Membranbarriere entwickelt wurden, sollten in Bezug auf ihre Relevanz und Zuverlässigkeit geprüft werden, um das Spektrum der erkennbaren Chemikalien und die quantitativen Detektionsgrenzen nachzuweisen.

DURCHFÜHRUNG DER PRÜFUNG

Anordnung der Elemente der Prüfmethode

20. Die Membranbarriere wird so in ein Fläschchen (oder Röhrchen) mit der Indikatorlösung gegeben, dass die Trägermembran vollflächig mit der Indikatorlösung in Berührung kommt und keine Luftblasen vorhanden sind. Dabei ist sorgfältig darauf zu achten, dass die Barriere nicht beschädigt wird.

Applikation der Prüfchemikalie

21. Eine geeignete Menge der Prüfchemikalie (z. B. 500 µl einer Flüssigkeit oder 500 mg eines fein vermahlenen Feststoffs (7) wird vorsichtig auf die Oberfläche der Membranbarriere aufgetragen und gleichmäßig verteilt. Für jede Prüfchemikalie und für die entsprechenden Kontrollen wird eine angemessene Anzahl an Replikaten (z. B. vier) (7) zubereitet (Nummern 23 bis 25). Der Zeitpunkt, zu dem die Prüfchemikalie auf die Membranbarriere aufgetragen wird, ist zu protokollieren. Um sicherzustellen, dass kurze Verätzungszeiten präzise protokolliert werden, wird die Prüfchemikalie zeitlich abgestuft auf die Replikatfläschchen gegeben.

Messung der Durchdringung der Membranbarriere

22. Die Fläschchen werden jeweils angemessen überwacht, und der Zeitpunkt der ersten Änderung der Indikatorlösung (d. h. der Zeitpunkt der Durchdringung der Barriere) wird protokolliert, und die Zeit vom Auftragen der Chemikalie bis zur Durchdringung der Membranbarriere wird ermittelt.

Kontrollen

23. Bei Prüfungen, bei denen in Verbindung mit der Prüfchemikalie ein Vehikel oder ein Lösungsmittel eingesetzt wird, sollte das Vehikel bzw. das Lösungsmittel kompatibel mit dem Membranbarrieresystem sein, d. h. es sollte die Integrität des Membranbarrieresystems nicht verändern und keine Auswirkungen auf die Verätzungswirkung der Prüfchemikalie haben. Die Lösungsmittelkontrolle (bzw. die Vehikelkontrolle) sollte ggf. gleichzeitig mit der Prüfchemikalie geprüft werden, um die Kompatibilität des Lösungsmittels mit dem Membranbarrieresystem nachzuweisen.

24. Eine positive (hautätzende) Kontrolle mit mittlerer Verätzungswirkung (z. B. 110 ± 15 mg Natriumhydroxid (Verätzung der UN-GHS-Unterkategorie 1B)) (7) sollte gleichzeitig mit der Prüfchemikalie geprüft werden, um festzustellen, ob die Leistung des Prüfsystems annehmbar ist. Eine zweite Positivkontrolle derselben Chemikalienklasse wie die Prüfchemikalie kann zur Beurteilung des relativen Verätzungspotenzials einer ätzenden Prüfchemikalie hilfreich sein. Die ausgewählte/n) Positivkontrolle(n) sollte(n) eine mittlere Verätzungswirkung haben (z. B. UN-GHS-Unterkategorie 1B), damit Änderungen der Durchdringungszeit erkannt werden können, die den ermittelten Referenzwert in unannehmbarer Weise über- oder unterschreiten und damit darauf hindeuten, dass das Prüfsystem nicht ordnungsgemäß funktioniert. Für diesen Zweck sind sehr stark ätzende Chemikalien (UN-GHS-Unterkategorie 1A) oder nicht ätzende Chemikalien nur begrenzt verwendbar. Eine ätzende Chemikalie der UN-GHS-Unterkategorie 1B würde die Erkennung einer zu kurzen oder zu langen Durchbruchzeit ermöglichen. Eine schwach ätzende Chemikalie der UN-GHS-Unterkategorie 1C könnte als Positivkontrolle eingesetzt werden, um zu prüfen, ob mit der Prüfmethode konsistent zwischen schwach ätzenden und nicht ätzenden Chemikalien unterschieden werden kann. Unabhängig vom verwendeten Ansatz sollte ein annehmbarer Reaktionsbereich der Positivkontrolle auf der Grundlage des historischen Bereichs der Durchbruchzeiten bei der (den) eingesetzten Positivkontrolle(n) entwickelt werden (beispielsweise der Mittelwert ± 2-3 Standardabweichungen). Bei jeder Prüfung sollte die genaue Durchbruchzeit der Positivkontrolle ermittelt werden, damit Abweichungen außerhalb des annehmbaren Bereichs erkannt werden können.

25. Gleichzeitig mit der Prüfchemikalie sollte als weitere Maßnahme zur Qualitätskontrolle auch eine Negativkontrolle (nicht ätzend) (z. B. 10 %ige Zitronensäure oder 6 %ige Proprionsäure) (7) geprüft werden, um die uneingeschränkte Funktion der Membranbarriere nachzuweisen.

Akzeptanzkriterien der Untersuchung

26. Auf der Grundlage der ermittelten Zeitparameter der UN-GHS-Unterkategorien der Verätzungswirkung wird anhand des Zeitraums (in Minuten) vom Auftragen einer Prüfchemikalie auf die Membranbarriere bis zur Durchdringung der Barriere die Verätzungswirkung der Prüfchemikalie vorhergesagt. Damit eine Prüfung als annehmbar betrachtet werden kann, sollte sich bei der gleichzeitigen Positivkontrolle die erwartete Reaktionszeit für die Durchdringung ergeben (z. B. für Natriumhydroxid als Positivkontrolle 8-16 Minuten); außerdem sollte die gleichzeitige Negativkontrolle nicht ätzend sein, und die gleichzeitige Lösungsmittelkontrolle sollte – wenn berücksichtigt – weder ätzend sein noch sich auf das Verätzungspotenzial der Prüfchemikalie auswirken. Vor der routinemäßigen Durchführung einer Prüfung nach dieser Prüfmethode sollten Labors die erforderliche technische Befähigung anhand der zwölf in Tabelle 2 empfohlenen Leistungsstoffe nachweisen. Die Zuverlässigkeit und die Genauigkeit neuer vergleichbarer Methoden („Me-too-Methoden"), die ausgehend von dieser Prüfmethode entwickelt wurden und strukturell und funktionell mit der validierten Referenzmethode vergleichbar sind, (14) sollten vor ihrer Verwendung für vorgeschriebene Prüfungen anhand der vordefinierten Leistungsstandards nachgewiesen werden (10).

Auswertung von Ergebnissen und Einstufung der Verätzungswirkung von Prüfchemikalien

27. Anhand der Zeit (in Minuten) von der Auftragung der Prüfchemikalie auf die Membranbarriere bis zur Durchdringung der Barriere werden die Prüfchemikalien nach ihrer Verätzungswirkung nach UN-GHS-Unterkategorien (1) sowie ggf. nach UN-Verpackungsgruppen eingestuft (16). Bei allen vorgeschlagenen Prüfmethoden sind für jede der drei Unterkategorien ätzender Chemikalien die Schwellenwerte der Zeiträume zu ermitteln. Bei der endgültigen Entscheidung über diese Schwellenwerte ist zu beachten, dass zu niedrige Einstufungen einer Verätzungsgefahr (d. h. falsch negative Ergebnisse) möglichst minimiert werden müssen. Bei dieser Prüfmethode sollten die Schwellenwerte für Corrositex® aus Tabelle 3 angenommen werden, da die Prüfung mit Corrositex® gegenwärtig die einzige Prüfung ist, die unter die Prüfrichtlinie fällt (7).

Tabelle 3

Vorhersagemodell Corrositex®

Mittlere Durchbruchzeit (min.)		UN-GHS-Vorhersage ([3])
Prüfchemikalien der Kategorie 1 ([1]) (mit dem Einstufungstest der Methode ermittelt)	Prüfchemikalien der Kategorie 2 ([2]) (mit dem Einstufungstest der Methode ermittelt)	
0-3 min.	0-3 min.	Hautätzend opt. Unterkategorie 1A
> 3 bis 60 min.	> 3 bis 30 min.	Hautätzend opt. Unterkategorie 1B
> 60 bis 240 min.	> 30 bis 60 min.	Hautätzend opt. Unterkategorie 1C
> 240 min.	> 60 min.	Nicht hautätzend

([1]) Prüfchemikalien mit stark saurer/alkalischer Reserve (6).
([2]) Prüfchemikalien mit schwach saurer/alkalischer Reserve (6).
([3]) Die UN-GHS-Unterkategorien 1A, 1B und 1C entsprechen den UN-Verpackungsgruppen I, II und III.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

28. Die Zeiten (in Minuten) von der Auftragung bis zur Durchdringung der Barriere bei der Prüfchemikalie und der (den) Positivkontrolle(n) sollten in einer Tabelle zum einen für die einzelnen Replikate und zum anderen als Mittelwerte ± der einzelnen Versuche angegeben werden.

Prüfbericht

29. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalien und Kontrollchemikalien:

— Einkomponentiger Stoff: chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;

— mehrkomponentiger Stoff, UVCB und Gemische: möglichst weit gehende Charakterisierung durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten;

— physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;

— Herkunft, Chargennummer, sofern vorhanden;

— Behandlung der Prüfchemikalien/Kontrollstoffe vor der Prüfung, sofern relevant (z. B. Erwärmen, Mahlen);

— Stabilität der Prüfchemikalie, letztes Verwendungsdatum oder Datum für erneute Analyse, soweit bekannt;

— Lagerungsbedingungen.

Vehikel:

— Angaben zur Identität, (gegebenenfalls) Konzentration; Einsatzvolumen;

— Begründung der Auswahl des Vehikels.

In-vitro-Membran-Barrieremodell und verwendetes Protokoll einschließlich nachgewiesener Genauigkeit und Zuverlässigkeit

Prüfbedingungen:

— Beschreibung der verwendeten Geräte und der Versuchsvorbereitung;

— Herkunft und Zusammensetzung der verwendeten *In-vitro*-Membranbarriere;

— Zusammensetzung und Merkmale der Indikatorlösung;

— Nachweismethode;

— Mengen der Prüfchemikalie und der Kontrollchemikalien;

— Anzahl der Replikate;

— Beschreibung und Begründung der Prüfung zur Einstufung der Zeiten;

— Anwendungsmethode;

— Beobachtungszeiten;

— Beschreibung der angewandten Bewertungs- und Einstufungskriterien;

— Nachweis der Befähigung zur Durchführung der Prüfmethode vor der regelmäßigen Verwendung durch die Prüfung von Leistungschemikalien.

Ergebnisse:

— Tabellarische Darstellung einzelner Rohdaten aus einzelnen Prüfungen und Kontrollen für die einzelnen Replikate;

— Beschreibung anderer beobachteter Wirkungen;

— abgeleitete Einstufung mit Bezug auf das Vorhersagemodell und/oder angewandte Entscheidungskriterien.

Erörterung der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen.

LITERATUR

(1) Vereinte Nationen (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), fünfte überarbeitete Ausgabe, UN New York und Genf, 2013. Abrufbar unter:http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Kapitel B.4 dieses Anhangs, Akute Hautreizung/-verätzung.

(3) Kapitel B.40bis dieses Anhangs, *In-vitro*-Prüfung auf hautätzende Wirkung: Prüfmethode mit rekonstruierter humaner Epidermis (RHE).

(4) Kapitel B.40 dieses Anhangs, *In-vitro*-Hautverätzung: TER-Prüfmethode.

(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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhütter, H.-G. und 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®. *In Vitro* Test Methods 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. und 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris. Abrufbar unter: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, Italien. ATLA 29, 96-97.

(12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). 20. September 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) Kapitel B.46 dieses Anhangs, *In-vitro*-Hautreizung: Prüfmethode mit rekonstruierter humaner Epidermis. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Abrufbar unter:http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Abrufbar unter:http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) Vereinte Nationen (UN) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Abrufbar unter:http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Anlage

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

CDS (Chemical Detection System): Ein visuelles oder elektronisches Messsystem mit einer Indikatorlösung, die bei Vorhandensein einer Prüfchemikalie reagiert (beispielsweise durch eine Verfärbung eines pH-Indikatorfarbstoffs oder einer Kombination von Farbstoffen aufgrund des Vorliegens der Prüfchemikalie oder durch andere chemische oder elektrochemische Reaktionen).

Chemikalie: Ein Stoff oder ein Gemisch.

Einkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens 80 % w/w vorliegt.

Gemisch: Ein Gemisch oder eine Lösung, die aus zwei oder mehr Stoffen besteht.

Genauigkeit: Der Grad an Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung" verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (9).

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung): Ein System zur Klassifizierung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) nach standardisierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und ökologischer Gefahren und zur entsprechenden Kennzeichnung durch Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenhinweise, Sicherheitshinweise und Sicherheitsdatenbögen, um zum Schutz des Menschen (einschließlich Arbeitgeber, Arbeiter, Spediteure, Verbraucher und Notfall-Einsatzkräfte) und der Umwelt Informationen über die schädlichen Wirkungen der betreffenden Chemikalien zu verbreiten (1).

Hautverätzung, *in vivo*: Das Auslösen einer irreversiblen Hautschädigung, d. h. einer sichtbaren, bis in das Corium reichenden Nekrose der Epidermis nach Applikation einer Prüfchemikalie für die Dauer von bis zu 4 Stunden. Verätzungsreaktionen sind gekennzeichnet durch Geschwüre, Blutungen, blutige Verschorfungen und am Ende des Beobachtungszeitraums von 14 Tagen durch eine auf ein Ausbleichen der Haut zurückzuführende Verfärbung, komplett haarlose Bereiche und Narben. Bei der Beurteilung fragwürdiger Schädigungen ist die Histopathologie mit zu berücksichtigen.

IATA: Integrated Approach to Testing and Assessment = integrierter Prüfungs- und Bewertungsansatz.

Leistungsstandards: Auf einer validierten Prüfmethode beruhende Normen, auf deren Grundlage die Vergleichbarkeit einer vorgeschlagenen, mechanistisch und funktionell ähnlichen Prüfmethode bewertet werden kann. Sie umfassen (i) wesentliche Elemente der Prüfmethode, (ii) ein Mindestverzeichnis von Referenzchemikalien, ausgewählt aus den Chemikalien, die zum Nachweis der akzeptablen Leistung der validierten Referenzmethode verwendet werden, und (iii) je nach den für die validierte Referenzmethode erzielten Ergebnissen die vergleichbaren Zuverlässigkeits- und Genauigkeitswerte, die die vorgeschlagene Prüfmethode bei der Bewertung anhand des Mindestverzeichnisses von Referenzchemikalien demonstrieren sollte (9).

Mehrkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens ≥ 10 % w/w und < 80 % w/w vorhanden sind. Ein mehrkomponentiger Stoff ist das Ergebnis eines Herstellungsprozesses. Der Unterschied zwischen einem Gemisch und einem mehrkomponentigen Stoff besteht darin, dass ein Gemisch durch die Mischung von zwei oder mehr Stoffen ohne chemische Reaktion entsteht. Ein mehrkomponentiger Stoff wird durch eine chemische Reaktion gebildet.

NC: Nicht hautätzend

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

Relevanz: Dieser Begriff bezieht sich auf das Verhältnis zwischen der Prüfmethode und der betreffenden Wirkung und auf die Frage, ob er aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Er beschreibt das Ausmaß, in dem die Prüfmethode die untersuchte biologische Wirkung korrekt misst oder vorhersagt. Die Relevanz schließt eine Beurteilung der Genauigkeit (Übereinstimmung) einer Prüfmethode ein (9).

Sensitivität: Der Anteil aller positiven/wirkenden Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft werden. Die Sensitivität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (9).

Spezifizität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (9).

Stoff: Ein chemisches Element und seine Verbindungen in natürlicher Form oder gewonnen durch ein Herstellungsverfahren, einschließlich der zur Wahrung seiner Stabilität notwendigen Zusatzstoffe und der durch das angewandte Verfahren bedingten Verunreinigungen, aber mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können.

Übereinstimmung: Die Übereinstimmung ist ein Maß der Leistung einer Prüfmethode für Prüfverfahren mit kategorialen Ergebnissen und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird gelegentlich gleichbedeutend mit Genauigkeit verwendet und als Anteil aller geprüften Chemikalien definiert, die korrekt als positiv oder negativ eingestuft werden. Die Übereinstimmung hängt in hohem Maße von der Prävalenz bei den Typen der untersuchten Prüfchemikalien ab (9).

UVCB: Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Zuverlässigkeit: Beschreibung der Beziehung zwischen der Prüfung und der untersuchten Wirkung und ob die Prüfung aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Sie wird durch Berechnung der Intra- und Inter-Labor-Reproduzierbarkeit bewertet (9).

B.66 **STTA-*IN-VITRO*-ASSAYS ZUM NACHWEIS VON ÖSTROGENREZEPTOR-AGONISTEN UND -ANTAGONISTEN**

ALLGEMEINE EINLEITUNG

Leistungsbezogene OECD-Prüfrichtlinie

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 455 (2016). TG 455 ist eine PBTG (Performance-Based Test Guideline = leistungsbezogene Prüfrichtlinie), die die Methode der STTA-*in-vitro*-Assays (Stably Transfected Transactivation = Transaktivierung durch stabile Transfektion) zum Nachweis von Östrogenrezeptor-Agonisten und -Antagonisten (Estrogen Receptor (ER) Agonists and Antagonists) (ER-TA-Assays) beschreibt. Sie umfasst mehrere mechanisch und funktionell ähnliche Prüfmethoden zum Nachweis von Östrogenrezeptor-(oder ERα- und/oder ERβ-)Agonisten und -Antagonisten und sollte die Entwicklung neuer ähnlicher oder modifizierter Prüfmethoden nach den Validierungsgrundsätzen im OECD Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment erleichtern (1). Die folgenden vollständig validierten Referenzprüfmethoden (Anlagen 2 und 3) sind Grundlage dieser PBTG:

   — Der STTA-Assay (2) unter Verwendung der (h) ERα-HeLa-9903-Zelllinie und

   — der VM7Luc-ER-TA-Assay (3) unter Verwendung der VM7Luc4E2-Zelllinie, ([1]) mit dem in erster Linie hERα sowie in beschränktem Umfang hERββ(4) (5) exprimiert wird.

   Zur Entwicklung und Validierung ähnlicher Assays für denselben Gefahren-Endpunkt sollten die verfügbaren Leistungsstandards (PS) (6) (7) verwendet werden. Sie ermöglichen eine frühzeitige Änderung der PBTG 455 zur Aufnahme neuer ähnlicher Assays in eine aktualisierte Fassung der PBTG; ähnliche Assays werden jedoch erst dann aufgenommen, wenn sie von der OECD geprüft wurden und von der OECD bestätigt wurde, dass die Leistungsstandards erfüllt werden. Die in TG 455 aufgenommenen Assays erfüllen die Anforderungen der OECD-Mitgliedstaaten an Prüfergebnisse bei Östrogenrezeptor-Transaktivierungen alle gleichermaßen und ermöglichen die gegenseitige Anerkennung der Daten gemäß dem OECD-Übereinkommen.

Hintergrund und Grundsätze der in diese Prüfmethode aufgenommenen Assays

2. Die OECD leitete 1998 mit hoher Priorität die Überarbeitung bestehender Prüfrichtlinien für Screening-Prüfungen und Untersuchungen potenziell endokriner Disruptoren und die Entwicklung neuer Prüfrichtlinien ein. Der „OECD Conceptual Framework (CF) for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals" wurde 2012 überarbeitet. Die ursprünglichen und überarbeiteten CFs wurden dem OECD Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (8) als Anhänge beigefügt. Der CF umfasst fünf Ebenen mit jeweils eigener biologischer Komplexität. Die in dieser Prüfmethode beschriebenen ER-TA-Assays (ER-TA = Estrogen Receptor Agonists and Antagonists Transactivation) sind Ebene 2 (*In-vitro-Assays zur Ermittlung von Daten über ausgewählte endokrine Mechanismen/Wirkungspfade*) zuzuordnen. Diese Prüfmethode wurde für *In-vitro*-Transaktivierungs-Assays (TA-Assays) zur Ermittlung von Östrogenrezeptor-Agonisten und -Antagognisten (ER-Agonisten und -Antagonisten) entwickelt.

3. Das Zusammenwirken von Östrogenen mit ER kann die Transkription von Genen beeinträchtigen, die durch Östrogene gesteuert werden. Dadurch können Zellprozesse ausgelöst oder gehemmt werden (u. a. für die Zellproliferation, für die normale fetale Entwicklung und für die Reproduktion erforderliche Prozesse) (9) (10) (11). Störungen normaler östrogener Systeme können Beeinträchtigungen der normalen Entwicklung (Ontogenese), der reproduktiven Gesundheit und des Reproduktionssystems auslösen.

4. *In-vitro*-TA-Assays beruhen auf einer mittelbaren oder unmittelbaren Wechselwirkung der Stoffe mit einem spezifischen Rezeptor, der die Transkription eines Reporter-Genpodukts steuert. Diese Assays wurden in großem Umfang zur Beurteilung der durch spezifische nukleäre Rezeptoren (z. B. ER) gesteuerten Gen-Expression verwendet (12) (13) (14) (15) (16). Sie wurden zur Erkennung einer durch die ER gesteuerten östrogenen Transaktivierung vorgeschlagen (17) (18) (19). Bei nukleären ER sind zumindest die zwei großen Untertypen α und β zu unterscheiden, die durch verschiedene Gene kodiert werden. Die betreffenden Proteine haben unterschiedliche biologische Funktionen, Gewebeverteilungen und Ligandenbindungsaffinitäten (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). Nukleäre ERα vermitteln die klassische Östrogenreaktion (27) (28) (29) (30). Daher beziehen sich die meisten gegenwärtig zur Messung der

([1]) Vor Juni 2016 wurde diese Zelllinie als BG1Luc-Zelllinie bezeichnet. BG-1-Zellen wurden ursprünglich von Geisinger u. a. (1998) (35) beschrieben und später von Forschern am National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) charakterisiert (36). Erst vor verhältnismäßig kurzer Zeit wurde entdeckt, dass von BG-1-Zellen zwei Varianten existieren, die von Forschern verwendet werden: BG-1 Fr und BG-1 NIEHS. Eingehende Untersuchungen (u. a. DNA-Tests) der beiden Varianten von BG-1-Zelllinien durch Li u. a. (2014) (37) haben gezeigt, dass die Variante BG-1 Fr eine besondere Zelllinie war und dass die Variante BG-1 NIEHS, d. h. die ursprünglich zur Entwicklung des Assays verwendete Zelllinie, nicht die humane Ovarialkarzinom-Zelllinie BG1, sondern eine Variante der humanen Brustkrebs-Zelllinie MCF7 war. Die in dem Assay verwendete und ursprünglich als BG1Luc4E2 bezeichnete Zelllinie (38) wird nun als VM7Luc4E2 („V" = Variante; „M7" = MCF7-Zellen) bezeichnet. Entsprechend wird nun der Assay als VM7Luc-ER-TA-Assay bezeichnet. Die Zelllinien, auf denen der Assay beruht, haben also eine andere Herkunft. Für veröffentlichte Validierungsstudien und für die Verwendbarkeit und den Einsatz dieses Assays zur Untersuchung östrogener/antiöstrogener Chemikalien ist dies jedoch nicht von Bedeutung.

Aktivierung oder Hemmung von ER entwickelten Modelle speziell auf ERα. Die Assays werden zur Ermittlung von Chemikalien verwendet, die nach erfolgter Ligandenbindung die ER aktivieren, was dazu führt, dass der Rezeptor-Ligandenkomplex eine Bindung mit spezifischen DNA-Response-Elementen eingeht und ein Reporter-Gen transaktiviert; dies wiederum bewirkt eine verstärkte zelluläre Expression eines Markerproteins. Für diese Assays können unterschiedliche Reporter-Reaktionen berücksichtigt werden. Bei auf Luciferase basierenden Systemen wandelt das Enzym Luziferase das Luciferinsubstrat in ein biolumineszierendes Produkt um, das mit einem Luminometer einer quantitativen Messung unterzogen werden kann. Weitere Beispiele verbreiteter Reporter-Gene sind fluoreszierende Proteine und das *LacZ*-Gen, das β-Galactosidase kodiert. Dieses Enzym kann das farblose Substrat X-gal (5-Brom-4-chlor-indolyl-galactopyranosid) in ein blaues Produkt umwandeln, das mit einem Spektralfotometer quantitativ bestimmt werden kann. Diese Reporter-Gene können rasch und kostengünstig mit im Handel erhältlichen Test-Kits bewertet werden.

5. In Studien zur Validierung des STTA- und des VM7Luc-TA-Assays wurden die Relevanz und die Zuverlässigkeit im Hinblick auf die vorgesehene Verwendung nachgewiesen (3) (4) (5) (30). Im 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) werden Leistungsstandards für luminiszenzbasierte ER-TA-Assays mit Brust-Zelllinien berücksichtigt. Diese Leistungsstandards wurden so modifiziert, dass sie sowohl beim STTA- als auch beim VM7Luc-TA-Assay angewendet werden können (2).

6. Die in der vorliegenden Prüfmethode verwendeten Begriffe und Abkürzungen werden in Anlage 1 erläutert.

Anwendungsbereich und Begrenzungen bei TA-Assays

7. Diese Assays werden für Screening- und Priorisierungszwecke vorgeschlagen, können aber auch zu mechanistischen Erkenntnissen führen, die im Rahmen von Beweiskraftermittlungen verwendet werden können. Gegenstand der Assays sind durch TA ausgelöste chemische Bindungen an die ER in einem *In-vitro*-System. Daher sollten Ergebnisse nicht unmittelbar für die komplexen Signal- und Steuerungswirkungen des intakten endokrinen *In-vivo*-Systems extrapoliert werden.

8. Durch ER vermittelte TA gelten als einer der zentralen Mechanismen endokriner Störungen (ED), wenngleich ED auch durch andere Mechanismen hervorgerufen werden können, darunter (i) Wechselwirkungen mit anderen Rezeptoren und Enzymsystemen des endokrinen Systems, (ii) Hormonsynthesen, (iii) Stoffwechselaktivierungen und/oder die Deaktivierung von Hormonen, (iv) die Verteilung von Hormonen an Zielgewebe und (v) die Beseitigung von Hormonen im Körper. Keiner der Assays im Rahmen dieser Prüfmethode hat diese Wirkungsweisen zum Gegenstand.

9. Gegenstand dieser Prüfmethode ist die Fähigkeit von Chemikalien, die ER-gesteuerte Transkription zu aktivieren (d. h. als Agonisten zu wirken) und zu unterdrücken (d. h. als Antagonisten zu fungieren). Einige Chemikalien können je nach Zelltyp sowohl als Agonisten als auch als Antagonisten wirken und sind als selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) bekannt. Chemikalien, für die in diesen Assays negative Ergebnisse ermittelt wurden, könnten einem Assay zur Prüfung der ER-Bindung unterzogen werden, bevor festgestellt wird, dass sie keine Bindung mit dem Rezeptor eingehen. Außerdem geben die Assays wegen der begrenzten Metabolisierung von *In-vitro*-Zellsystemen Aufschluss vermutlich nur über die Aktivität der jeweiligen Ausgangsverbindung. Da bei der Validierung nur einzelne Stoffe verwendet wurden, wurde die Eignung für Prüfgemische nicht untersucht. Dennoch ist die Prüfmethode theoretisch auch für die Prüfung von mehrkomponentigen Stoffen, Stoffen mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexen Reaktionsprodukten oder biologischen Materialien (UVCB) und Gemischen geeignet. Bevor die Prüfmethode bei mehrkomponentigen Stoffen, UVCB oder Gemischen für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regulierungszweck verwendet wird, ist zu prüfen, ob, und falls ja, warum, sie für den beabsichtigten Zweck geeignete Ergebnisse liefert. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs von Rechts wegen vorgeschrieben ist.

10. Tabelle 1 enthält eine Übersicht über die Agonisten-Ergebnisse der 34 Stoffe, die mit den beiden in dieser Prüfmethode beschriebenen vollständig validierten Referenzprüfmethoden untersucht wurden. Von diesen Stoffen wurden nach veröffentlichten Berichten (u. a. aufgrund von *In-vitro*-Assays zur Prüfung auf ER-Bindungen und TA und/oder aufgrund des Uterotrophen Bioassays) (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34) 26 Stoffe sicher als ER-Agonisten und 8 als negativ eingestuft. Tabelle 2 enthält eine Übersicht über die Antagonisten-Ergebnisse der 15 Stoffe, die mit den beiden in dieser Prüfmethode beschriebenen vollständig validierten Referenzprüfmethoden untersucht wurden. Von diesen Stoffen wurden nach veröffentlichten Berichten (u. a. aufgrund von *In-vitro*-Assays zur Prüfung auf ER-Bindungen und TA) (2) (3) (18) (31) 4 Stoffe sicher/vermutlich als ER-Agonisten und 10 als negativ eingestuft. Nach den in den Tabellen 1 und 2 zusammengefassten Daten ergab sich hinsichtlich der Einstufungen aller Stoffe mit Ausnahme eines Stoffes (Mifepristone) beim Antagonisten-Assay eine 100 %ige Übereinstimmung zwischen den beiden Referenzprüfmethoden, und alle Stoffe wurden zutreffend als ER-Agonisten/-Antagonisten bzw. als negativ eingestuft. Ergänzende Informationen über diese Gruppe von Chemikalien sowie über weitere Chemikalien, die im Rahmen der Validierungsstudien mit den STTA- und den VM7Luc-ER-TA-Assays untersucht wurden, sind den Leistungsstandards für die ER-TA (6) (7), Anlage 2 (Tabellen 1, 2 und 3) zu entnehmen.

Tabelle 1

Übersicht über die Ergebnisse von STTA- und VM7Luc-ER-TA-Assays bei Stoffen, die in beiden Agonisten-Prüfungen untersucht und als ER-Agonisten (POS) oder als negativ (NEG) eingestuft wurden

	Stoff	CAS-Nr.	STTA-Assay (1)			VM7Luc-ER-TA-Assay (2)		Datenquelle für die Einstufung (4)		
			ER-TA Aktivität	PC_{10}-Wert (M)	PC_{50}-Wert (b) (M)	ER-TA-Aktivität	EC_{50}-Wert (b), (3) (M)	Sonstige ER-TAs (c)	ER Bindung	Uterotroph
1	17ß-Estradiol (a)	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-Estradiol (a)	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-Ethinylestradiol (a)	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-Trenbolon	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-Nortestosteron (a)	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-Cumylphenol (a)	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*-Octylphenol (a)	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	Apigenin (a)	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

	Stoff	CAS-Nr.	STTA-Assay [1]			VM7Luc-ER-TA-Assay [2]		Datenquelle für die Einstufung [4]		
			ER-TA Aktivität	PC_{10}-Wert (M)	PC_{50}-Wert [b] (M)	ER-TA-Aktivität	EC_{50}-Wert [b], [3] (M)	Sonstige ER-TAs [c]	ER Bindung	Uterotroph
9	Atrazin [a]	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Bisphenol A [a]	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	Bisphenol B [a]	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	Butylbenzylphthalat [a]	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	Corticosteron [a]	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG (6/6)	NEG	NT
14	Cumestrol [a]	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	Daidzein [a]	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	Diethylstilbestrol [a]	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	Di-n-butylphthalat	84-74-2	POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$		POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$	POS (6/11)	POS	NEG
18	Ethylparaben	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(ohne PC_{50})	POS	$2{,}48 \times 10^{-5}$	POS		NT
19	Estron [a]	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 [a]	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

	Stoff	CAS-Nr.	STTA-Assay (1)			VM7Luc-ER-TA-Assay (2)		Datenquelle für die Einstufung (4)		
			ER-TA Aktivität	PC_{10}-Wert (M)	PC_{50}-Wert (b) (M)	ER-TA-Aktivität	EC_{50}-Wert (b), (3) (M)	Sonstige ER-TAs (c)	ER Bindung	Uterotroph
21	Haloperidol	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
22	Kaempferol (a)	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	Kepon (a)	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	Ketoconazol	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
25	Linuron (a)	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG (8/8)	NEG	NT
26	*meso*-Hexestrol (a)	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	POS	$1{,}65 \times 10^{-11}$	POS (4/4)	POS	NT
27	Methyltestosteron (a)	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	Morin	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	Norethynodrel (a)	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'*-Methoxychlor (a)	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(ohne PC_{50}) (b)	POS	$1{,}92 \times 10^{-6}$	POS (24/27)	POS	POS
31	Phenobarbital (a)	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT

	Stoff	CAS-Nr.	STTA-Assay (1)			VM7Luc-ER-TA-Assay (2)		Datenquelle für die Einstufung (4)		
			ER-TA Aktivität	PC_{10}-Wert (M)	PC_{50}-Wert (b) (M)	ER-TA-Aktivität	EC_{50}-Wert (b), (3) (M)	Sonstige ER-TAs (c)	ER Bindung	Uterotroph
32	Reserpin	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NT
33	Spironolacton (a)	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NT
34	Testosteron	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

Abkürzungen: CAS-NR. = CAS-Registrierungsnummer); M = molar; EC_{50} = die Hälfte der maximalen Wirkungskonzentration eines Prüfstoffs; NEG = negativ; POS = positiv; NT = nicht geprüft; PC_{10} (und PC_{50}) = Konzentration eines Prüfstoffs, bei der die Reaktion 10 % (bzw. 50 % bei PC_{50}) der Reaktion entspricht, die auf allen Platten mit der Positivkontrolle (E2, 1 nm) ausgelöst wird.

(a) Verbreitete mit dem STTA- und dem VM7Luc-ER-TA-Assay geprüfte Stoffe, die als ER-Agonisten ermittelt oder als negativ eingestuft und in der Studie zur Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays (ICCVAM VM7Luc ER TA Evaluation Report, Tabelle 4-1 (3) zur Bewertung der Genauigkeit verwendet wurden.

(b) Die Höchstkonzentration, die dann geprüft wurde, wenn aufgrund einer Zytotoxizität oder einer Unlöslichkeit keine Begrenzungen bestanden, betrug 1×10^{-5} M (STTA-Assay) bzw. 1×10^{-3} M (VM7Luc-ER-TA-Assay).

(c) Die Zahl in Klammern steht für die Anzahl der Prüfergebnisse, die als positiv (POS) bzw. negativ (NEG) eingestuft wurden, und wird bezogen auf die Gesamtzahl der berücksichtigten Prüfungen angegeben.

(1) Angegebene Werte im 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)

(2) ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

(3) Die mittleren EC_{50}-Werte wurden anhand von Werten berechnet, die die Labors der Studie zur Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays (XDS, ECVAM und Hiyoshi) (3) angegeben hatten.

(4) Die Einstufung als ER-Agonist oder als negativ beruhte auf Informationen in den ICCVAM Background Review Documents (BRD) zu Assays zur Prüfung der ER-Bindung und zu TA-Assays (31) sowie auf Informationen aus nach Erstellung der ICCVAM BRDs erfolgten und geprüften Veröffentlichungen (2) (3) (18) (31) (33) (34).
Anmerkungen: Bei den Assays im Rahmen dieser Prüfmethode werden nicht immer dieselben Messungen durchgeführt. Manchmal kann der EC_{50}-Wert nicht berechnet werden, weil keine vollständige Dosis-Reaktions-Kurve erzeugt wurde. Beim STTA-Assay ist der PC_{10}-Wert ein wichtiger Parameter; in anderen Fällen kann möglicherweise aber auch ein PC_x-Wert hilfreich sein.

Tabelle 2

Vergleich der Ergebnisse von STTA- und VM7Luc-ER-TA-Assays bei Stoffen, die in beiden Antagonisten-Prüfungen untersucht und als ER-Antagonisten (POS) oder als negativ (NEG) eingestuft wurden

	Stoff [a]	CAS-Nr.	ER-STTA-Assay [1]		VM7Luc-ER-STTA-Assay [2]		Wirkungen Bei ER-STTA-Kandidaten [4]	ICCVAM [5] -Konsensklassifikation	MeSH [6] -Chemikalienklasse	Produktklasse [7]
			ER-TA-Aktivität	IC_{50}-Wert [b] (M)	ER-TA-Aktivität	IC_{50}-Wert [b], [3] (M)				
1	4-Hydroxytamoxifen	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	mäßig POS	POS	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis
2	Dibenzo(a,h)anthracen	53-70-3	POS	Ohne IC_{50}	POS	Ohne IC_{50}	POS	PP	Polycyclische Verbindung	Laborchemikalie, Naturprodukt
3	Mifepriston	84371-65-3	POS	$5{,}61 \times 10^{-6}$	NEG	—	schwach POS	NEG	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis
4	Raloxifen-HCl	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	mäßig POS	POS	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis
5	Tamoxifen	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	POS	POS	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis
6	17β-Estradiol	50-28-2	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmediznisches Agens
7	Apigenin	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Heterocyclische Verbindung	Farbstoff, Naturprodukt, pharmazeutisches Zwischenprodukt

	Stoff [a]	CAS-Nr.	ER-STTA-Assay [1]		VM7Luc-ER-STTA-Assay [2]		Wirkungen Bei ER-STTA-Kandidaten [4]	ICCVAM [5] -Konsensklassifikation	MeSH [6] -Chemikalienklasse	Produktklasse [7]
			ER-TA-Aktivität	IC_{50}-Wert [b] (M)	ER-TA-Aktivität	IC_{50}-Wert [b], [3] (M)				
8	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Heterocyclische Verbindung	Herbizid
9	Di-n-butylphthalat	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Ester, Phthalsäure	Kosmetischer Inhaltsstoff, Industriechemikalie, Weichmacher
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	nicht geprüft	PN	Heterocyclische Verbindung, Pyrimidin	Fungizid
11	Flavon	525-82-6	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Flavonoid, heterocyclische Verbindung	Naturprodukt, pharmazeutisches Erzeugnis
12	Flutamid	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Amid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
13	Genistein	446-72-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Flavonoid, heterocyclische Verbindung	Naturprodukt, pharmazeutisches Erzeugnis
14	p-n-Nonylphenol	104-40-5	NEG	—	NEG	—	nicht geprüft	NEG	Phenol	Chemisches Zwischenprodukt

	Stoff [a]	CAS-Nr.	ER-STTA-Assay [1]		VM7Luc-ER-STTA-Assay [2]		Wirkungen Bei ER-STTA-Kandidaten [4]	ICCVAM [5] -Konsensklassifikation	MeSH [6] -Chemikalienklasse	Produktklasse [7]
			ER-TA-Aktivität	IC_{50}-Wert [b] (M)	ER-TA-Aktivität	IC_{50}-Wert [b], [3] (M)				
15	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Naturprodukt

Abkürzungen: CASRN = CAS-Registrierungsnummer; M = molar; IC_{50} = die Hälfte der maximalen Hemmkonzentration eines Prüfstoffs; NEG = negativ; PN = vermutlich negativ; POS = positiv; PP = vermutlich positiv.

[a] Verbreitete mit dem STTA- und dem VM7Luc-ER-TA-Assay geprüfte Stoffe, die als ER-Antagonisten ermittelt oder als negativ eingestuft und in der Studie zur Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays zur Bewertung der Genauigkeit verwendet wurden (2) (3).

[b] Die Höchstkonzentration, die dann geprüft wurde, wenn aufgrund einer Zytotoxizität oder einer Unlöslichkeit keine Begrenzungen bestanden, betrug 1×10^{-3} M (STTA-Assay) bzw. 1×10^{-5} M (VM7Luc-ER-TA-Assay).

[1] The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2).

[2] ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

[3] Die mittleren EC_{50}-Werte wurden anhand von Werten berechnet, die die Labors der Studie zur Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays (XDS, ECVAM und Hiyoshi) (3) angegeben hatten.

[4] Aufgrund der angegebenen Wirkungen nach historischen CERI-Daten zum ER-Assay zur Prüfung der Bindewirkung und zum uterotrophen Bioassay sowie nach Informationen aufgrund von Recherchen in offen zugänglicher Literatur (2) vermutete ER-STTA-Aktivität.

[5] Die Einstufung als ER-Antagonist oder als negativ beruhte auf Informationen in den ICCVAM Background Review Documents (BRD) zu Assays zur Prüfung der ER-Bindung und zu TA-Assays (31) sowie auf Informationen aus nach Erstellung der ICCVAM BRDs erfolgten und geprüften Veröffentlichungen (2) (3) (18) (31).

[6] Die Stoffe wurden nach den Medical Subject Headings (MeSH) der U.S. National Library of Medicine, einem international anerkannten standardisierten Klassifizierungssystem, (siehe http://www.nlm.nih.gov/mesh) einer oder mehreren Chemikalienklassen zugeordnet.

[7] Die Stoffe wurden nach der Gefahrstoff-Datenbank der U.S. National Library of Medicine (siehe http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB) einer oder mehreren Produktklassen zugeordnet.

ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS

Wesentliche Elemente des Assays

11. Diese Prüfmethode gilt für Assays unter Verwendung eines stabil transfizierten oder endogenen ERα-Rezeptors und eines stabil transfizierten Reporter-Genprodukts unter Steuerung durch eines oder mehrere Östrogen-Response-Elemente; es können aber auch andere Rezeptoren (z. B. ERβ) vorhanden sein. Der Assay beinhaltet die folgenden wesentlichen Elemente:

Kontrollen

12. Die Grundlage der vorgeschlagenen gleichzeitigen Referenzstandards für die einzelnen Agonisten- und Antagonisten-Assays sollte erläutert werden. Gegebenenfalls dienen gleichzeitige Kontrollen (Negativ-, Lösungsmittel- und Positivkontrolle) als Anzeichen dafür, dass der Assay unter den Prüfbedingungen funktioniert; außerdem bilden sie eine Grundlage für versuchsübergreifende Vergleiche. In der Regel sind sie Bestandteil der Akzeptanzkriterien für die Versuche (1).

Standard-Qualitätskontrollverfahren

13. Die einzelnen Assays sollten Standard-Qualitätskontrollverfahren unterzogen werden, wie jeweils beschrieben, um sicherzustellen, dass die Zelllinie auch nach mehreren Durchgängen stabil bleibt, kein Mycoplasma aufweist (d. h. frei von Bakterienkontaminationen ist) und unverändert in der Lage ist, die erwarteten durch ER vermittelten Reaktionen zu entwickeln. Außerdem sollten die Identität der Zelllinien geprüft und Untersuchungen auf andere Verunreinigungen (z. B. Pilze, Hefen und Viren) vorgenommen werden.

Nachweis der Eignung des Labors

14. Vor der Prüfung unbekannter Chemikalien mit einem der Assays dieser Prüfmethode sollte jedes Labor nachweisen, dass es in der Lage ist, den betreffenden Assay durchzuführen. Zum Nachweis seiner Leistungsfähigkeit sollte jedes Labor die 14 Leistungsstoffe in Tabelle 3 für den Agonisten-Assay und die 10 Leistungsstoffe in Tabelle 4 für den Antagonisten-Assay prüfen. Mit dieser Eignungsprüfung wird auch die Empfindlichkeit des Prüfsystems nachgewiesen. Die Liste der Leistungsstoffe ist eine Untergruppe der Referenzstoffe der Leistungsstandards für die ER-TA-Assays (6). Diese Stoffe sind im Handel erhältlich und entsprechen den Chemikalienklassen, bei denen gewöhnlich eine Aktivität von ER-Agonisten bzw. -Antagonisten zu verzeichnen ist. Außerdem zeigen sie ein geeignetes und für ER-Agonisten bzw. -Antagonisten zu erwartendes Wirkungsspektrum (d. h. stark bis schwach) und umfassen auch Negativstoffe. Die Untersuchung der Leistungsstoffe sollte an unterschiedlichen Tagen mindestens zweimal wiederholt werden. Die Leistungsfähigkeit wird durch die ordnungsgemäße Einstufung (positiv/negativ) der einzelnen Leistungsstoffe nachgewiesen. Beim Erlernen der Assays sollte die Eignungsprüfung von jedem einzelnen Labortechniker wiederholt werden. Je nach Zelltyp können sich einige dieser Leistungsstoffe wie selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) verhalten und sowohl als Agonisten als auch als Antagonisten wirken. Die Leistungsstoffe werden in den Tabellen 3 und 4 jedoch nach ihrer bekannten vorwiegenden Aktivität eingestuft, die auch für die Bewertung der Leistungsfähigkeit angenommen werden sollte.

15. Zum Nachweis der Leistungsfähigkeit und zu Qualitätskontrollzwecken sollte jedes Labor Datenbanken mit historischen Daten zu Agonisten und Antagonisten mit Daten zu Referenzstandards (z. B. 17β-Estradiol und Tamoxifen) sowie zu Positiv- und Negativkontrollchemikalien und Lösungsmittelkontrollen (z. B. DMSO) erstellen. Die Datenbank sollte beginnend mit Prüfläufen mit mindestens 10 unabhängigen Agonisten (z. B. 17β-Estradiol) und 10 unabhängigen Antagonisten (z. B. Tamoxifen) erstellt werden. Anschließend sollten die Ergebnisse künftiger Analysen dieser Referenzstandards und Lösungsmittelkontrollen in die Datenbank aufgenommen werden, um die Konsistenz und die Leistungsfähigkeit des im jeweiligen Labor im Laufe der Zeit durchgeführten Bioassays sicherzustellen.

Tabelle 3

Liste mit (14) Leistungsstoffen für Agonisten-Assays [8]

Nr. [7]	Stoff	CAS-Nr.	Erwartete Reaktion [1]	STTA-Assay			VM7Luc-ER-TA-Assay		MeSH-Chemikalienklasse [5]	Produktklasse [6]
				PC_{10}-Wert (M) [2]	PC_{50}-Wert (M) [2]	Prüfkonzentrations- bereich (M)	VM7Luc-EC_{50}-Wert (M) [3]	Höchstkonzentration für Vorversuch (M) [4]		
14	Diethylstilbestrol	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} - 10^{-8}$	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmediznisches Agens
12	17α-Estradiol	57-91-0	POS	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmediznisches Agens
15	*meso*-Hexestrol	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Kohlenwasserstoff (cyclisch), Phenol	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmediznisches Agens
11	4-*tert*-Octylphenol	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Phenol	Chemisches Zwischenprodukt
9	Genistein	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Flavonoid, heterocyclische Verbindung	Naturprodukt, pharmazeutisches Erzeugnis
6	Bisphenol A	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Phenol	Chemisches Zwischenprodukt

Nr. (7)	Stoff	CAS-Nr.	Erwartete Reaktion (1)	STTA-Assay			VM7Luc-ER-TA-Assay		MeSH-Chemikalienklasse (5)	Produktklasse (6)
				PC_{10}-Wert (M) (2)	PC_{50}-Wert (M) (2)	Prüfkonzentrations- bereich (M)	VM7Luc-EC_{50}-Wert (M) (3)	Höchstkonzentration für Vorversuch (M) (4)		
2	Kaempferol	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Flavonoid, heterocyclische Verbindung	Naturprodukt
3	Butylbenzylphthalat	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Carboxylsäure, Ester, Phthalsäure	Weichmacher, Industriechemikalie
4	*p,p'*- Methoxychlor	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Kohlenwasserstoff (halogeniert)	Pestizid, veterinärmedizinisches Agens
1	Ethylparaben	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Carboxylsäure, Phenol	Pharmazeutisches Erzeugnis, Konservierungsmittel
17	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	—	$10^{-10} - 10^{-4}$	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Heterocyclische Verbindung	Herbizid
20	Spironolacton	52-01-7	NEG	—	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Lacton, Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis

Nr. (7)	Stoff	CAS-Nr.	Erwartete Reaktion (1)	STTA-Assay			VM7Luc-ER-TA-Assay		MeSH-Chemikalienklasse (5)	Produktklasse (6)
				PC_{10}-Wert (M) (2)	PC_{50}-Wert (M) (2)	Prüfkonzentrations- bereich (M)	VM7Luc-EC_{50}-Wert (M) (3)	Höchstkonzentration für Vorversuch (M) (4)		
21	Ketoconazol	65277-42-1	NEG	—	—	10^{-11} – 10^{-5}	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Heterocyclische Verbindung	Pharmazeutisches Erzeugnis
22	Reserpin	50-55-5	NEG	—	—	10^{-11} – 10^{-5}	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Heterocyclische Verbindung, Indol	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmediznisches Agens

Abkürzungen: CAS-NR. = CAS-Registrierungsnummer); EC_{50} = die Hälfte der maximalen Wirkungskonzentration eines Prüfstoffs; NEG = negativ; POS = positiv; PC_{10} (und PC_{50}) = Konzentration eines Prüfstoffs, bei der die Reaktion 10 % (bzw. 50 % bei PC_{50}) der Reaktion entspricht, die auf allen Platten mit der Positivkontrolle (E2, 1 nm) ausgelöst wird.

(1) Die Einstufung der ER-Agonisten-Aktivität als positiv oder als negativ beruhte auf den ICCVAM Background Review Documents (BRD) zu Assays zur Prüfung der ER-Bindung und zu TA-Assays (31) sowie auf empirischen Daten und anderen Informationen aus nach Erstellung der ICCVAM BRDs erfolgten und geprüften Untersuchungen (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

(2) Angegebene Werte im 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).

(3) Die mittleren EC_{50}-Werte wurden anhand von Werten berechnet, die die Labors der Studie zur Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays (XDS, ECVAM und Hiyoshi) (3) angegeben hatten.

(4) Die angegebenen Konzentrationen waren die höchsten geprüften Konzentrationen (Vorversuch) bei der Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays. Wenn in den Labors unterschiedliche Konzentrationen verwendet wurden, wird die höchste Konzentration angenommen. Siehe Tabelle 4-10 des 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).

(5) Die Stoffe wurden nach den Medical Subject Headings (MeSH) der U.S. National Library of Medicine, einem international anerkannten standardisierten Klassifizierungssystem, (siehe http://www.nlm.nih.gov/mesh) einer oder mehreren Chemikalienklassen zugeordnet.

(6) Die Stoffe wurden nach der Gefahrstoff-Datenbank der U.S. National Library of Medicine (siehe http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB) einer oder mehreren Chemikalienklassen zugeordnet.

(7) Aus Tabelle 1 (Liste der Referenzchemikalien (22) zur Beurteilung der Genauigkeit der Prüfung von ER-Agonisten) der Leistungsstandards (6).

(8) Wenn ein Leistungsstoff nicht mehr im Handel erhältlich ist, kann ein Stoff derselben Klassifikation und mit vergleichbarer Wirksamkeit, Wirkungsweise und Klassifizierung verwendet werden.

Tabelle 4

Liste mit (10) Leistungsstoffen für Antagonisten-Assays

	Stoff [a]	CAS-Nr.	ER-STTA-Assay [1]			VM7Luc-ER-STTA-Assay [2]			Wirkungen Bei ER-STTA [1] -Kandidaten	ICCVAM [5] -Konsensklassifikation	MeSH [6] -Chemikalienklasse	Produktklasse [7]
			ER-TA-Aktivität	IC_{50} (M)	Prüfkonzentrationsbereich (M)	ER-TA-Aktivität	IC_{50} [3] (M)	Höchstkonzentration für Vorversuch (M) [4]				
1	4-Hydroxytamoxifen	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	mäßig POS	POS	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis
2	Raloxifen-HCl	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	mäßig POS	POS	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis
3	Tamoxifen	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	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis
4	17β-Estradiol	50-28-2	NEG	—	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	vermutlich negativ (*)	PN	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
5	Apigenin	520-36-5	NEG	—	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heterocyclische Verbindung	Farbstoff, Naturprodukt, pharmazeutisches Zwischenprodukt
6	Di-n-butylphthalat	84-74-2	NEG	—	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Ester, Phthalsäure	Kosmetischer Inhaltsstoff, Industriechemikalie, Weichmacher

	Stoff [a]	CAS-Nr.	ER-STTA-Assay [1]			VM7Luc-ER-STTA-Assay [2]			Wirkungen Bei ER-STTA [1] -Kandidaten	ICCVAM [5] -Konsensklassifikation	MeSH [6] -Chemikalienklasse	Produktklasse [7]
			ER-TA-Aktivität	IC_{50} (M)	Prüfkonzentrationsbereich (M)	ER-TA-Aktivität	IC_{50} [3] (M)	Höchstkonzentration für Vorversuch (M) [4]				
7	Flavon	525-82-6	NEG	—	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	vermutlich negativ (*)	PN	Flavonoid, heterocyclische Verbindung	Naturprodukt, pharmazeutisches Erzeugnis
8	Genistein	446-72-0	NEG	—	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	vermutlich negativ (*)	NEG	Flavonoid, heterocyclische Verbindung	Naturprodukt, pharmazeutisches Erzeugnis
9	p-n-Nonylphenol	104-40-5	NEG	—	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	nicht geprüft	NEG	Phenol	Chemisches Zwischenprodukt
10	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	vermutlich negativ (*)	NEG	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Naturprodukt

Abkürzungen: CASRN = CAS-Registrierungsnummer; M = molar; IC_{50} = die Hälfte der maximalen Hemmkonzentration eines Prüfstoffs; NEG = negativ; PN = vermutlich negativ; POS = positiv.

(*) Nach einer Literaturrecherche als negativ eingestuft (2).

(a) Verbreitete mit dem STTA- und dem VM7Luc-ER-TA-Assay geprüfte Stoffe, die als ER-Antagonisten ermittelt oder als negativ eingestuft und in der Studie zur Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays zur Bewertung der Genauigkeit verwendet wurden (2) (3).

(1) The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2).

(2) ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

(3) Die mittleren EC_{50}-Werte wurden anhand von Werten berechnet, die die Labors der Studie zur Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays (XDS, ECVAM und Hiyoshi) (3) angegeben hatten.

(4) Die angegebenen Konzentrationen waren die höchsten geprüften Konzentrationen (Vorversuch) bei der Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays. Wenn in den Labors unterschiedliche Konzentrationen verwendet wurden, wird die höchste Konzentration angenommen. Siehe Tabelle 4-11 des 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).

(5) Die Einstufung als ER-Antagonist oder als negativ beruhte auf Informationen in den ICCVAM Background Review Documents (BRD) zu Assays zur Prüfung der ER-Bindung und zu TA-Assays (31) sowie auf Informationen aus nach Erstellung der ICCVAM BRDs erfolgten und geprüften Veröffentlichungen (2) (3) (18) (31).

(6) Die Stoffe wurden nach den Medical Subject Headings (MeSH) der U.S. National Library of Medicine, einem international anerkannten standardisierten Klassifizierungssystem, (siehe http://www.nlm.nih.gov/mesh) einer oder mehreren Chemikalienklassen zugeordnet.

(7) Die Stoffe wurden nach der Gefahrstoff-Datenbank der U.S. National Library of Medicine (siehe http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB) einer oder mehreren Produktklassen zugeordnet.

Akzeptanzkriterien für Prüfläufe

16. Ob ein Prüflauf akzeptiert wird, hängt von der Bewertung der Ergebnisse mit den jeweils verwendeten Referenzstandards und Kontrollen ab. Die PC_{50}- (EC_{50}-) bzw. die IC_{50}-Werte bei den Referenzstandards sollten die Akzeptanzkriterien des betreffenden Assays erfüllen (zum STTA-Assay siehe Anlage 2 und zum VM7Luc-ER-TA-Assay siehe Anlage 3), und alle positiven/negativen Kontrollen sollten für jeden akzeptierten Versuch ordnungsgemäß eingestuft werden. Die Fähigkeit zur konsistenten Durchführung der Assays sollte durch den Aufbau und die Pflege einer historischen Datenbank für die Referenzstandards und Kontrollen nachgewiesen werden (Nummer 15). Standardabweichungen (SD) oder Variationskoeffizienten (VK) der Mittelwerte von Parametern zur Anpassung der Referenzstandardkurven aus mehreren Versuchen können als Maßstab für die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Labors herangezogen werden. Darüber hinaus sollten für Akzeptanzkriterien die folgenden Grundsätze gelten:

— Die Daten sollten hinreichend für eine quantitative Bewertung der ER-Aktivierung beim Agonisten-Assay) bzw. zur ER-Unterdrückung (beim Antagonisten-Assay) (d. h. zur Bewertung der Wirksamkeit und Leistungsfähigkeit) sein.

— Die mittlere Reporter-Aktivität bei der Referenzkonzentration des Referenzöstrogens sollte wenigstens der bei den betreffenden Assays für die Vehikelkontrolle (Lösungsmittelkontrolle) spezifizierten Mindestaktivität entsprechen, damit eine angemessene Empfindlichkeit gewährleistet ist. Beim STTA- und beim VM7Luc-ER-TA-Assay beträgt diese Aktivität das Vierfache der Aktivität der mittleren Vehikelkontrolle der jeweiligen Platte.

— Die geprüften Konzentrationen sollten im Löslichkeitsbereich der Prüfchemikalien bleiben und nicht zytotoxisch wirken.

Analyse der Daten

17. Positive bzw. negative Reaktionen sollten nach dem für den jeweiligen Assay festgelegten Verfahren zur Auswertung der Daten analysiert werden.

18. Die Erfüllung der Akzeptanzkriterien (Nummer 16) deutet darauf hin, dass ein Assay ordnungsgemäß funktioniert. Dies gewährleistet jedoch nicht, dass ein bestimmter Prüflauf tatsächlich exakte Daten ergibt. Die Wiederholung der Ergebnisse des ersten Prüflaufs ist die beste Bestätigung dafür, dass exakte Daten ermittelt wurden. Wenn zwei Prüfläufe zu reproduzierbaren Ergebnissen führen (d. h. wenn für eine Prüfchemikalie in beiden Prüfläufen ein positives Ergebnis ermittelt wurde), ist ein dritter Prüflauf nicht erforderlich.

19. Führen zwei Prüfläufe zu unterschiedlichen Ergebnissen (z. B. bei einer einzigen Prüfchemikalie einmal ein positives und einmal ein negatives Ergebnis) oder wenn eine höhere Gewissheit hinsichtlich des Ergebnisses benötigt wird, sollten mindestens drei unabhängige Prüfläufe durchgeführt werden. In diesem Fall wird die Einstufung anhand der beiden übereinstimmenden Ergebnisse von drei Prüfläufen vorgenommen.

Allgemeine Kriterien für die Auswertung von Daten

20. Zurzeit besteht keine allgemein anerkannte Methode zur Auswertung der Daten aus ER-TA-Assays. Allerdings sollten qualitative (z. B. positiv/negativ) und/oder quantitative (z. B. EC_{50}, PC_{50} und IC_{50}) Bewertungen einer durch ER vermittelten Aktivität auf empirischen Daten und fundierten wissenschaftlichen Beurteilungen beruhen. Nach Möglichkeit sollten positive Ergebnisse sowohl unter Angabe der Größenordnung der Wirkung im Vergleich zur Vehikelkontrolle (Lösungsmittelkontrolle) oder zum Referenzöstrogen als auch der Konzentration beschrieben werden, bei der die Wirkung eintritt (z. B. EC_{50}, PC_{50}, RPC_{Max} oder IC_{50}).

Prüfbericht

21. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Gehalt:

— durchgeführter Assay;

— Kontrolle/Referenzstandard/Prüfchemikalie;

— Herkunft, Partienummer, ggf. begrenztes Verwendungsdatum;

— Stabilität der Prüfchemikalie, falls bekannt;

— Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie in Lösungsmittel, falls bekannt;

— Messung des pH-Werts, Osmolalität und ggf. Niederschlag im Kulturmedium, dem die Prüfchemikalie zugegeben wurde.

Einkomponentiger Stoff:

— physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;

— chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:

— so weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

Lösungsmittel/Vehikel:

— Beschreibung (Art, Lieferant und Charge);

— Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels;

— Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie in Lösungsmittel/in einem Vehikel, falls bekannt.

Zellen:

— Art und Herkunft der Zellen:

  • Wurde ER endogen exprimiert? Wenn nicht, welche Rezeptor(en) wurden transfiziert?

  • verwendete(s) Reporter-Genprodukt(e) (einschließlich Spezies);

  • Transfektionsmethode;

  • (ggf.) Auswahlmethode zur Aufrechterhaltung einer stabilen Transfektion);

  • ist die Transfektionsmethode für stabile Linien relevant?

— ggf. Passagenanzahl (nach dem Auftauen);

— Passagenanzahl beim Auftauen;

— zum Erhalt der Zellkultur verwendete Verfahren.

Prüfbedingungen:

— Löslichkeitsgrenzen;

— Beschreibung der eingesetzten Methoden zur Bewertung der Viabilität;

— Medienzusammensetzung, CO_2-Konzentration;

— Konzentrationen der Prüfchemikalie;

— Volumen des Vehikels und der beigegebenen Prüfchemikalie;

— Inkubationstemperatur und Feuchte;

— Behandlungsdauer;

— Zelldichte zu Beginn und während der Behandlung;

— positive und negative Referenzstandards;

— Reporter-Reagenzien (Produktbezeichnung, Hersteller und Charge);

— Kriterien zur Einstufung der Prüfläufe als positiv, negativ oder nicht eindeutig.

Akzeptanzprüfung:

— n-fache Induktionen der einzelnen Assay-Platten und Angabe, ob damit die Mindestanforderungen des betreffenden Assays nach historischen Kontrollen erfüllt werden;

— tatsächliche Werte der Akzeptanzkriterien, z. B. $\log_{10}$-, EC_{50}, $\log_{10}$-, PC_{50}-, $\log IC_{50}$- und Hillslope-Werte für gleichzeitige Positivkontrollen/Referenzstandards.

Ergebnisse:

— Rohdaten und normalisierte Daten;

— höchste n-fache Induktion;

— Zytotoxizitätsdaten;

— wenn vorhanden, niedrigste Wirkungskonzentration (LEC);

— ggf. RPC_{Max}, PC_{Max}, PC_{50}, IC_{50} und/oder EC_{50};

— nach Möglichkeit Konzentrations-Wirkungs-Verhältnis;

— wenn vorhanden, statistische Analysen sowie Messabweichung und Konfidenzwerte (z. B. SEM, SD, VK oder 95 % CI) sowie Angaben dazu, wie diese Werte ermittelt wurden.

Erörterung der Ergebnisse.

Schlussfolgerung.

LITERATUR

(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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vit*ro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(4) Pujol, P., u. a. (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer. Res., 58(23): S. 5367-5373.

(5) Rogers, J.M. und 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): S. 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(8) OECD (2012). 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: S. 20-26.

(10) Welboren, W.J., u. a. (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer, 16(4): S. 1073-1089.

(11) Younes, M. und Honma, N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): S. 63-66.

(12) Jefferson, W.N., u. a. (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, Journal of Chromatography B, 777(1-2): S. 179-189.

(13) Sonneveld, E., u. a. (2006). Comparison of I*n Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol.* Sci., 89(1): S. 173-187.

(14) Takeyoshi, M., u. a. (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, Toxicology Letters, 126(2): S. 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): S. 81-118.

(16) Escande, A., u. a. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol, 71(10): S. 1459-1469.

(17) Gray, L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol.* Lett, 102-103, 677-680.

(18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.

(19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(20) Gustafsson, J.Ö. (1999). Estrogen Receptor ß – A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, Journal of Endocrinology, 163(3): S. 379-383.

(21) Ogawa, S., u. a. (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERα *In Vivo* and *In Vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): S. 122-126.

(22) Enmark, E., u. a. (1997). Human Estrogen Receptor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 82(12): S. 4258-4265.

(23) Ball, L.J., u. a. (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): S. 204-211.

(24) Barkhem, T., u. a. (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): S. 105-112.

(25) Deroo, B.J. und Buensuceso, A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): S. 1703-1714.

(26) Harris, D.M., u. a. (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): S. 558-568.

(27) Anderson, J.N., Clark, J.H. und Peck, E.J. Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): S. 1460-1468.

(28) Toft, D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): S. 515-522.

(29) Gorski, J., u. a. (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: S. 45-80.

(30) Jensen, E.V., u. a. (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3): S. 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., u. a. (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., u. a. (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose-Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530-1549.

(34) Kanno, J., u. a. (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.

(35) Geisinger u. a. (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(36) Baldwin u. a. (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. u. a. (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. und 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.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN UND ABKÜRZUNGEN

Agonist: Ein Stoff, der eine Wirkung (z. B. eine Transkription) hervorruft, wenn er eine Bindung mit einem bestimmten Rezeptor eingeht.

Aktivkohle-/Dextranbehandlung: Behandlung von bei Zellkulturen verwendeten Seren. Bei der Behandlung mit Aktivkohle/Dextran (häufig auch als „Stripping" bezeichnet) werden endogene Hormone und hormonbindende Proteine abgetrennt.

Akzeptanzkriterien: Mindeststandards für Kontrollen und Referenzstandards. Damit ein Versuch als gültig betrachtet werden kann, sollten alle Akzeptanzkriterien erfüllt sein.

Antagonist: Eine Art Rezeptor-Ligand oder eine Chemikalie, die nach der Bindung an einen Rezeptor an sich keine biologische Reaktion auslöst, aber durch Agonisten vermittelte Reaktionen blockiert oder dämpft.

Antiöstrogene Aktivität: Fähigkeit einer Chemikalie zur Unterdrückung der durch Östrogenrezeptoren vermittelten Wirkung von 17β-Estradiol.

Assay: Im Zusammenhang mit dieser Prüfmethode wird als Assay eine Methode bezeichnet, die die beschriebenen Leistungskriterien erfüllt und daher als gültige Methode anerkannt wird. Elemente eines Assays sind beispielsweise die spezifische Zelllinie mit den entsprechenden Wachstumsbedingungen, spezifische Medien, in denen die Untersuchung erfolgt, die Konfiguration der Platten, Anordnung und Verdünnungen von Prüfchemikalien sowie alle sonstigen erforderlichen Qualitätskontrollmaßnahmen und mit der Untersuchung verbundenen Schritte zur Auswertung der Daten.

CF: OECD Conceptual Framework for the Testing and Evaluation of Endocrine Disrupters.

Chemikalie: Ein Stoff oder ein Gemisch.

DCC-FBS: Mit dextranbeschichteter Aktivkohle behandeltes fetales Rinderserum.

DMEM: Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium.

DMSO: Dimethylsulfoxid.

E2: 17β-Estradiol.

EC_{50}: Die Hälfte der maximalen Wirkungskonzentration einer Prüfchemikalie.

ED: Endokrine Störung.

EFM: Östrogenfreies Medium. Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium (DMEM), ergänzt um 4,5 % mit Aktivkohle/Dextran behandeltes fetales Rinderserum (FBS), 1,9 % L-Glutamin und 0,9 % Pen/Strep.

Eignung: Die nachgewiesene Fähigkeit zur ordnungsgemäßen Durchführung eines Assays vor der Prüfung unbekannter Stoffe.

ER: Östrogenrezeptor.

ERE: Östrogen-Response-Element.

ER-TA: Östrogenrezeptor-Transaktivierung

FBS: Fetales Rinderserum.

Genauigkeit (Übereinstimmung): Der Grad an Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen eines Assays und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung eines Assays und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung" verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse eines Assays (1).

HeLa: Eine unsterbliche humane Zervikalkarzinom-Zelllinie.

HeLa9903: Ein Subklon der HeLa-Zelllinie, in den hERαα und ein Luciferase-Reporter-Gen stabil transfiziert wurden.

hERß: Humaner Östrogenrezeptor ß.

hERα: Humaner Östrogenrezeptor α.

IC_{50}: Die Hälfte der maximalen Wirkungskonzentration einer Prüfchemikalie mit hemmender Wirkung.

ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (das US-amerikanische Validierungszentrum).

Inter-Labor-Reproduzierbarkeit: Das Ausmaß, in dem unterschiedliche qualifizierte Laboratorien, die dasselbe Protokoll verwenden und dieselben Prüfstoffe untersuchen, qualitativ und quantitativ vergleichbare Ergebnisse erzielen können. Die Inter-Labor-Reproduzierbarkeit wird während der Prävalidierungs- und Validierungsverfahren ermittelt und zeigt das Maß an, in dem ein Assay erfolgreich zwischen Laboratorien übertragen werden kann (1).

Intra-Labor-Reproduzierbarkeit: Das Ausmaß, in dem qualifizierte Personen innerhalb desselben Labors, die dasselbe spezifische Protokoll zu unterschiedlichen Zeiten verwenden, erfolgreich dieselben Ergebnisse replizieren können. Auch als „laborinterne Reproduzierbarkeit" bezeichnet (1).

LEC: Als niedrigste Wirkungskonzentration (Lowest Effective Concentration) wird die niedrigste Konzentration einer Prüfchemikalie bezeichnet, die eine Wirkung hervorruft (d. h. die niedrigste Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der die n-fache Induktion sich statistisch von der gleichzeitigen Vehikelkontrolle unterscheidet).

Leistungsstandards: Auf einem validierten Assay beruhende Normen, auf deren Grundlage die Vergleichbarkeit einem vorgeschlagenen, mechanistisch und funktionell ähnlichen Assay bewertet werden kann. Sie umfassen (1) wesentliche Elemente des Assays; (2) ein Mindestverzeichnis von Referenzchemikalien, ausgewählt aus den Chemikalien, die zum Nachweis der akzeptablen Leistung der validierten Referenzmethode verwendet werden, und (3) je nach den für die validierte Referenzmethode erzielten Ergebnissen die vergleichbaren Genauigkeits- und Zuverlässigkeitswerte, die der vorgeschlagene Assay bei der Bewertung anhand des Mindestverzeichnisses von Referenzchemikalien ergeben sollte (1).

Leistungsstoffe: Eine Untergruppe der in die Leistungsstandards einbezogenen Referenzstoffe, die von Labors bei standardisierten Prüfmethoden zum Nachweis der fachlichen Kompetenz eingesetzt werden können. Auswahlkriterien für diese Stoffe sind u. a., dass sie den Reaktionsbereich abdecken und im Handel erhältlich sein müssen und dass für diese Stoffe hochwertige Referenzdaten verfügbar sein müssen.

Me-Too-Prüfung: [Im englischen Sprachraum gemeinsprachliche] Bezeichnung einer Prüfmethode, die strukturell und funktionell mit einer validierten und akzeptierten Referenzprüfmethode vergleichbar ist. Gleichbedeutend mit „vergleichbare Prüfmethode" verwendet.

MMTV: Maus-Mammatumorvirus.

MT: Metallothionein.

OHT: 4-Hydroxytamoxifen.

Östrogenaktivität: Fähigkeit einer Chemikalie, wie 17β-Estradiol Bindungen Östrogenrezeptoren einzugehen und Östrogenrezeptoren zu aktivieren. Mit dieser Prüfmethode kann durch hERα vermittelte Östrogenaktivität nachgewiesen werden.

PBTG: Leistungsbezogene Prüfrichtlinie.

PC_{10}: Die Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der die gemessene Aktivität in einem Agonisten-Assay auf jeder einzelnen Platte 10 % der durch die PK (1 nM E2 beim STTA-Assay) induzierten maximalen Aktivität beträgt.

PC_{50}: Die Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der die gemessene Aktivität in einem Agonisten-Assay auf jeder einzelnen Platte 50 % der durch die PK (E2 in der für die jeweilige Prüfmethode spezifizierten Referenzkonzentration) induzierten maximalen Aktivität beträgt.

PC_{Max}: Die Konzentration einer Prüfchemikalie, die RPCMax induziert.

PK (Positivkontrolle): Ein starker Wirkstoff, vorzugsweise 17ß-Estradiol, der in alle Prüfungen einbezogen wird, um das ordnungsgemäße Funktionieren der Assays sicherzustellen.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

Prüflauf: Ein einzelner Versuch zur Bewertung der Wirkung einer Chemikalie auf das biologische Ergebnis eines Assays. Jeder Prüflauf besteht aus einem vollständigen Versuch an Replikat-Wells mit Zellen, die gleichzeitig aus einem gemeinsamen Zellpool plattiert wurden.

Referenz-Östrogen (Positivkontrolle, PK): 17β-Estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referenzprüfmethode: Die Assays, auf denen die PBTG 455 beruht.

Referenzstandard: Ein Referenzstoff zum Nachweis der Eignung eines Assays. 17β-Estradiol ist der Referenzstandard für den STTA- und den VM7Luc-ER-TA-Assay.

Relevanz: Dieser Begriff bezieht sich auf das Verhältnis zwischen dem Assay und der betreffenden Wirkung und auf die Frage, ob er aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Er beschreibt das Ausmaß, in dem der Assay die untersuchte biologische Wirkung korrekt misst oder vorhersagt. Die Relevanz schließt eine Beurteilung der Genauigkeit (Übereinstimmung) eines Assays ein (1).

RLU: Relative Lichteinheiten.

RNA: Ribonukleinsäure.

RPC_{Max}: Durch eine Prüfchemikalie induzierte maximale Reaktion, ausgedrückt als Prozentanteil der durch 1 nM E2 auf derselben Platte induzierten Reaktion.

RPMI: RPMI-1640-Medium, ergänzt um 0,9 % Pen/Strep und 8,0 % fetales Rinderserum (FBS).

Schwache Positivkontrolle: Ein schwacher Wirkstoff aus der Liste der Referenzchemikalien, der in alle Prüfungen einbezogen wird, um das ordnungsgemäße Funktionieren der Assays sicherzustellen.

SD: Standardabweichung,

Sensitivität: Der Anteil aller positiven/wirkenden Prüfstoffe, die durch den Assay korrekt eingestuft werden. Die Sensitivität ist ein Maß der Genauigkeit eines Assays mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung seiner Relevanz (1).

Spezifität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Prüfstoffe, die durch die Prüfung korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit eines Assays mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung seiner Relevanz (1).

Stabile Transfektion: Wenn DNA so in Zellkulturen transfiziert wird, dass sie stabil in das Zellgenom eingefügt wird, erfolgt eine stabile Expression der betreffenden Gene. Klone stabil transfizierter Zellen werden unter Verwendung stabiler Marker (z. B. Resistenz gegenüber G418) selektioniert.

Stoff: In der REACH-Verordnung [1] werden Stoffe definiert als ein chemisches Element und seine Verbindungen in natürlicher Form oder gewonnen durch ein Herstellungsverfahren, einschließlich der zur Wahrung seiner Stabilität notwendigen Zusatzstoffe und der durch das angewandte Verfahren bedingten Verunreinigungen, aber mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können. Eine sehr ähnliche Begriffsbestimmung wird im Zusammenhang mit dem UN GHS verwendet (1).

STTA-Assay: Assay mit transkriptioneller ERα-Aktivierung unter Verwendung der Zelllinie HeLa 9903.

Studie/Untersuchung: Eine umfassende experimentelle Untersuchung zur Bewertung eines einzelnen, spezifischen Stoffs mit einem spezifischen Assay. Eine Studie umfasst sämtliche Schritte einschließlich Untersuchungen von Verdünnungen eines Prüfstoffs im Prüfmedium, Vorversuchen zur Dosisfindung, allen erforderlichen Hauptversuchen, Datenanalysen, Qualitätssicherung, Zytotoxizitätsbewertungen usw. Aufgrund einer Studie kann die mit dem jeweiligen Assay zu untersuchende Wirkung der Prüfchemikalie auf das Zielmaterial einer Toxizitätsprüfung bewertet werden (als aktiv, nicht aktiv oder nicht eindeutig) und die Stärke der Wirkung bezogen auf die positive Referenzchemikalie abgeschätzt werden.

[1] Verordnung EG (Nr.) 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Agentur für chemische Stoffe, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission. ABl. L 304 vom 22.11.2007, S. 1.

TA (Transaktivierung): Die Auslösung einer mRNA-Synthese als Reaktion auf ein bestimmtes chemisches Signal wie beispielsweise die Bindung eines Östrogens an einen Östrogenrezeptor.

Transkription: mRNA-Synthese.

Unabhängiger Prüflauf: Ein getrennter unabhängiger Versuch, mit dem die Wirkung einer Chemikalie auf das biologische Ergebnis eines Assays mit Zellen aus einem anderen Pool sowie mit frisch verdünnten Chemikalien an unterschiedlichen Tagen oder am selben Tag durch unterschiedliche Labortechniker bewertet wird.

UVCB: Chemische Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Validierte Prüfmethode: Ein Assay, für den zwecks Bestimmung ihrer Relevanz (einschließlich Genauigkeit) und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck Validierungsstudien durchgeführt wurden. Es wird darauf hingewiesen, dass eine validierte Prüfmethode möglicherweise nicht so genau und zuverlässig ist, dass sie für den vorgeschlagenen Zweck akzeptiert werden kann (1).

Validierung: Prozess, mit dem die Zuverlässigkeit und die Relevanz eines bestimmten Ansatzes, einer Methode, eines Assays, eines Prozesses oder einer Bewertung für einen bestimmten Zweck festgestellt wird (1).

VK (Vehikelkontrolle): Das zur Lösung der Prüf- und der Kontrollchemikalien verwendete Lösungsmittel wird ohne gelöste Chemikalie nur als Vehikel geprüft.

VK: Variationskoeffizient.

VM7: Eine immortalisierte Adenokarzinom-Zelllinie, die einen Östrogenrezeptor endogen exprimiert.

VM7Luc4E2: Die VM7Luc4E2-Zelllinie wurde aus immortalisierten VM7-Zellen (humanen Adenokarzinom-Zellen) abgeleitet, die beide Formen von Endogenrezeptoren (ERα und ERβ) endogen exprimieren und mit dem Plasmid pGudLuc7.ERE stabil transfiziert wurden. Dieses Plasmid enthält vier Kopien eines synthetischen Oligonucleotids mit dem Östrogen-Response-Element vor dem MMTV-Promoter (MMTV = Maus-Mammatumorvirus) und dem Leuchtkäfer-Luciferase-Gen.

Zellmorphologie: Form und Aussehen von Zellen, die in einer Monolayer-Kultur in einem einzelnen Well einer Gewebekultur-Platte gewachsen sind. Absterbende Zellen weisen häufig eine abnormale Zellmorphologie auf.

Zuverlässigkeit: Maß der Verlässlichkeit der Reproduzierbarkeit eines Assays innerhalb von und zwischen Laboratorien (Intra- und Inter-Labor-Reproduzierbarkeit) in einem bestimmten Zeitintervall bei einheitlichem Protokoll. Sie wird durch Berechnung der Intra- und Inter-Labor-Reproduzierbarkeit bewertet.

Zytotoxizität: Gefährliche Wirkungen auf Zellstrukturen oder Funktionen, die letztlich zum Absterben von Zellen führen und sich in einer Reduzierung der Anzahl der Zellen auf dem Well am Ende des Expositionszeitraums oder in einer reduzierten Messbarkeit von Zellfunktionen im Vergleich zur gleichzeitigen Vehikelkontrolle äußern können.

Anlage 2

ASSAY ZUR TRANSAKTIVIERUNG DES STABIL TRANSFIZIERTEN HUMANEN ÖSTROGENREZEPTORS A ZUM NACHWEIS DER WIRKUNG VON CHEMIKALIEN AUF ÖSTROGEN-AGONISTEN UND -ANTAGONISTEN MIT DER HERA-HELA-9903-ZELLLINIE

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

1. Bei diesem Transaktivierungs-Assay (TA-Assay) wird die hERα-HeLa-9903-Zelllinie zum Nachweis einer durch den humanen Östrogenrezeptor α (hERα) vermittelten Östrogen-Agonisten-Aktivität verwendet. Mit der Validierungsstudie des japanischen Chemikalienevaluierungs- und -forschungsinstituts CERI zum STTA-Assay (STTA = Stably Transfected Transactivation) unter Verwendung der hERα-HeLa-9903-Zelllinie zum Nachweis der durch den humanen Östrogenrezeptor α (hERα) vermittelten Östrogen-Agonisten- und -Antagonisten-Aktivität wurden die Relevanz des Assays für den vorgesehenen Zweck und seine Zuverlässigkeit nachgewiesen (1).

2. Dieser Assay wurde speziell zum Nachweis von hERα und einer durch hERα vermittelten TA anhand einer Messung der Chemiluminiszenz als Endpunkt entwickelt. Bei Phytoöstrogenkonzentrationen von mehr als 1 μM wurden infolge der Überaktivierung des Luciferase-Reporter-Gens Luminiszenzsignale festgestellt, die nicht durch Rezeptoren vermittelt wurden (2) (3). Die Dosis-Reaktions-Kurve zeigt, dass die tatsächliche Aktivierung des ER-Systems bei niedrigeren Konzentrationen erfolgt; bei stabil transfizierten ER-TA-Assay-Systemen muss die Luciferase-Expression bei hohen Konzentrationen von Phytoöstrogenen oder ähnlichen Vereinbarungen, bei denen vermutet wird, dass sie eine phytoöstrogenartige Überaktivierung des Luciferase-Reportergens verursachen, jedoch sorgfältig untersucht werden (Anlage 1).

3. Vor der Verwendung dieses Assays für rechtliche Zwecke sollten die Abschnitte „ALLGEMEINE EINLEITUNG“ und „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“ gelesen werden. Die in dieser Prüfrichtlinie verwendeten Begriffe und Abkürzungen werden in Anlage 2.1 erläutert.

PRINZIP DES ASSAYS (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

4. Der Assay wird zur Feststellung von Bindungen des Östrogenrezeptors mit einem Liganden verwendet. Nach der Bindung an den Liganden transloziert der Rezeptor-Liganden-Komplex in den Zellkern, wo er spezifische DNA-Response-Elemente bindet und ein Leuchtkäfer-Luciferase-Reporter-Gen transaktiviert. Dies führt zu einer verstärkten zellulären Expression des Luciferase-Enzyms. Luciferin ist ein Substrat, das durch das Luciferase-Enzym in ein Biolumineszenz-Produkt umgewandelt wird, das mit einem Luminometer quantitativ gemessen werden kann. Die Luciferase-Aktivität kann rasch und kostengünstig mit verschiedenen im Handel erhältlichen Test-Kits bewertet werden.

5. Bei diesem Prüfsystem wird die aus einem humanen Zervikaltumor abgeleitete hERα-HeLa-9903-Zelllinie mit zwei stabil eingefügten Produkten verwendet: (i) der hERαα-Expression (mit in voller Länge kodiertem humanem Rezeptor) und (ii) einem Leuchtkäfer-Luciferase-Reporterprodukt mit fünf Tandem-Repeats eines auf ein Maus-Metallothionein(MT)-Promoter-TA-Element reagierenden Vitellogenin-Östrogen-Response-Elements (ERE). Da mit dem Maus-MT-TATA-Genprodukt nachweislich die besten Ergebnisse erzielt werden, wird gewöhnlich dieses Produkt verwendet. Mit dieser hERα-HeLa-9903-Zelllinie kann die Fähigkeit einer Prüfchemikalie zur Induzierung einer durch hERα vermittelten Transaktivierung einer Luciferasegen-Expression gemessen werden.

6. Beim ER-Agonisten-Assay hängt die Auswertung der Daten davon ab, ob die durch eine Prüfchemikalie induzierte maximale Reaktion größer oder gleich einer Agonisten-Reaktion im Umfang von 10 % der Reaktion ist, die durch eine Konzentration der Positivkontrolle (PK) 17β-Estradiol (E2) mit maximaler Induktion (1 nM) (d. h. PC10) induziert wird. Beim ER-Antagonisten-Assay wird die Auswertung der Daten davon bestimmt, ob die Reaktion mindestens in einer 30 %igen Reduzierung der Aktivität infolge der Spike-in-Kontrolle (25 pM E2) ohne Zytotoxizität besteht. Analysen und Auswertungen der Daten siehe Nummern 34-48.

VERFAHREN

Zelllinien

7. Für den Assay sollte die stabil transfizierte hERα-HeLa-9903-Zelllinie verwendet werden. Diese Zelllinie kann von der JCRB-Zellbank (JRCB = Japanese Collection of Research Bioresources) ([1]) nach Unterzeichnung einer Materialübertragungsvereinbarung (Material Transfer Agreement, MTA) bezogen werden.

8. Für die Prüfungen sollten ausschließlich als mycoplasmafrei charakterisierte Zellen verwendet werden. Die RT-PCR (Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion) ist die Methode der Wahl für den empfindlichen Nachweis einer Mycoplasma-Infektion (4) (5) (6).

Stabilität der Zelllinie

9. Zur Überwachung der Stabilität der Zelllinie sollten E2, 17α-Estradiol, 17α-Methyltestosteron und Corticosteron als Referenzstandards für den Agonisten-Assay verwendet werden, und bei jeder Durchführung des Assays sollte mindestens eine vollständige Konzentrations-Reaktions-Kurve in dem in Tabelle 1 genannten Prüfkonzentrationsbereich gemessen werden. Dabei sollten die in Tabelle 1 genannten Ergebnisse ermittelt werden.

10. Beim Antagonisten-Assays sollten für jeden Prüflauf gleichzeitig vollständige Konzentrationskurven für die beiden Referenzstandards Tamoxifen und Flutamid gemessen werden. Die ordnungsgemäße Einstufung der beiden Chemikalien als positiv oder negativ sollte überwacht werden.

Bedingungen für die Haltung der Zellkulturen und für die Plattierung

11. Die Zellen werden in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) ohne Phenolrot ergänzt mit 60 mg/l des Antibiotikums Kanamycin und 10 % mit dextranbeschichteter Aktivkohle behandeltem fetalem Rinderserumdextran (DCC-FBS) in einem CO2-Inkubator (5 % CO2) bei 37 ± 1 °C gehalten. Wenn eine Konfluenz von 75-90 % erreicht ist, können Zellen mit 10 ml 0,4 × 105 – 1 × 105 Zellen/ml auf einer 100-mm-Zellkulturschale subkultiviert werden. Dann werden die Zellen mit 10 % FBS-EMEM (identisch mit EMEM mit DCC-FBS) suspendiert und anschließend mit einer Dichte von 1 × 104 Zellen/(100 µl × Well) in Wells einer Mikrotiterplatte plattiert. Danach werden die Zellen in einem CO2-Inkubator (5 %) bei 37 ± 1 °C drei Stunden vorinkubiert, bevor sie der zu untersuchenden Chemikalie ausgesetzt werden. Die Verbrauchsmaterialien aus Kunststoff sollten keine Östrogenaktivität aufweisen.

12. Um die Integrität der Reaktion aufrechtzuerhalten, sollten die Zellen im konditionierten Medium über mehr als eine Passage höchstens aber bis zu 40 Passagen des tiefgefrorenen Materials vermehrt werden. Bei der hERα-HeLa-9903-Zelllinie dauert dies weniger als drei Monate. Das Zellwachstum kann jedoch verringert sein, wenn die Zellen unter ungeeigneten Kulturbedingungen vermehrt werden.

13. Das DCC-FBS kann wie in Anlage 2.2 beschrieben zubereitet oder im Handel bezogen werden.

Akzeptanzkriterien

Positive und negative Referenzstandards für den ER-Agonisten-Assay

14. Vor und während der Untersuchung sollte die Reaktion des Prüfsystems mit den jeweils geeigneten Konzentrationen eines starken Östrogens verifiziert werden: E2, ein schwaches Östrogen (17α-Estradiol), ein sehr schwacher Agonist (17α-Methyltestosteron) und ein Negativstoff (Corticosteron). Tabelle 1 sind annehmbare Bereichswerte angegeben, die aus der Validierungsstudie (1) entnommen wurden. Diese 4 gleichzeitigen Referenzstandards sollten in jeden Versuch einbezogen werden, und die Ergebnisse sollten jeweils im annehmbaren Bereich liegen. Ansonsten sollten die Ursachen dafür ermittelt werden, dass die Akzeptanzkriterien nicht erfüllt werden (z. B. die Handhabung der und

([1]) JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan, Telefax: +81-72-641-9812.

der Assay sollte wiederholt werden. Wenn die Akzeptanzkriterien erfüllt werden, ist die konsistente Verwendung von Materialien für die Kultivierung der Zellen von entscheidender Bedeutung, um eine möglichst geringe Variabilität der EC_{50}-, PC_{50}- und PC_{10}-Werte sicherzustellen. Die vier gleichzeitigen Referenzstandards, die in alle (unter identischen Bedingungen u. a. in Bezug auf die Materialien, die Passagenanzahl und die Labortechniker durchzuführenden) Versuche einbezogen werden sollten, können die Empfindlichkeit des Assays gewährleisten, da die PC_{10}-Werte der drei positiven Referenzstandards ebenso wie die PC_{50}- und die EC_{50}-Werte (wenn diese berechnet werden können) im annehmbaren Bereich liegen sollten (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1

Werte im annehmbaren Bereich für die vier Referenzstandards beim ER-Agonisten-Assay

Name	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logPC_{50}$	Hillslope	Prüfbereich
17β-Estradiol (E2) CAS-Nr.: 50-28-2	-11,4~-10,1	< -11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10^{-14}~10^{-8}M
17α-Estradiol CAS-Nr.: 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10^{-12}~10^{-6}M
Corticosteron CAS-Nr.: 50-22-6	—	—	—	—	10^{-10}~10^{-4}M
17α-Methyltestosteron CAS-Nr.: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	—	—	10^{-11}~10^{-5}M

Positive und negative Referenzstandards für den ER-Antagonisten-Assay

15. Vor und während der Untersuchung sollte die Reaktion des Prüfsystems mit den jeweils geeigneten Konzentrationen eines Positivstoffs (Tamoxifen) und eines Negativstoffs (Flutamid) verifiziert werden: Tabelle 2 sind annehmbare Bereichswerte angegeben, die aus der Validierungsstudie (1) entnommen wurden. Diese beiden gleichzeitigen Referenzstandards sollten in jeden Versuch einbezogen werden, und die Ergebnisse sollten anhand der Kriterien als akzeptabel bewertet werden. Andernfalls sollten die Ursachen dafür ermittelt werden, dass die Kriterien nicht erfüllt werden (z. B. die Handhabung der Zellen sowie die Qualität und die Konzentration des Serums und der Antibiotika), und der Assay sollte wiederholt werden. Außerdem sollten die IC_{50}-Werte eines Positivstoffs (Tamoxifen) berechnet werden. Die Ergebnisse sollten im annehmbaren Bereich liegen. Wenn die Akzeptanzkriterien erfüllt werden, ist die konsistente Verwendung von Materialien für die Kultivierung der Zellen von entscheidender Bedeutung, um eine möglichst geringe Variabilität der IC50-Werte sicherzustellen. Die beiden gleichzeitigen Referenzstandards, die in jeden (unter identischen Bedingungen u. a. in Bezug auf die Materialien, die Passagenanzahl und die Labortechniker durchzuführenden) Versuch einbezogen werden sollten, können die Empfindlichkeit des Assays sicherstellen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2

Kriterien und Werte im annehmbaren Bereich für die beiden Referenzstandards beim ER-Antagonisten-Assay

Name	Kriterium	$LogIC_{50}$	Prüfbereich
Tamoxifen CAS-Nr.: 10540-29-1	Positiv: IC_{50} sollte berechnet werden.	-5,942 -7,596	10-10 10^{-5} M
Flutamid CAS-Nr.: 13311-84-7	Negativ: IC_{30} sollte nicht berechnet werden.	—	10^{-10} 10^{-5} M

Positivkontrolle und Vehikelkontrolle

16. Die Positivkontrolle (PK) des ER-Agonisten-Assays (1 nM E2) und des ER-Antagonisten-Assays (10µM TAM) sollte pro Platte mindestens dreimal geprüft werden. Auch das zur Auflösung einer Prüfchemikalie verwendete Vehikel ist als Vehikelkontrolle (VK) pro Platte mindestens dreimal zu prüfen. Wenn bei der PK nicht die Prüfchemikalie als Vehikel verwendet wird, sollte zusätzlich zu dieser VK auf der Platte mit der PK eine weitere VK ebenfalls mindestens dreimal geprüft werden.

Qualitätskriterien für den ER-Agonisten-Assay

17. Die mittlere Luciferase-Aktivität der Positivkontrolle (1 nM E2) sollte mindestens das Vierfache der mittleren VK auf jeder Platte betragen. Dieses Kriterium wird anhand der Zuverlässigkeit der Endpunktwerte der Validierungsstudie geprüft. (In der Regel werden Werte zwischen dem 4- und dem 30-Fachen ermittelt.)

18. Bei der Qualitätskontrolle für diesen Assay sollte die n-fache Induktion entsprechend dem PC10-Wert der gleichzeitigen PK (1 nM E2) größer als 1+2 SD des Wertes der n-fachen Induktion (= 1) der gleichzeitigen VK sein. Bei der Priorisierung kann der PC10-Wert die erforderliche Datenanalyse im Vergleich zu einer statistischen Analyse erleichtern. Eine statistische Analyse liefert wichtige Informationen, ist aber nicht als quantitativer Parameter hinsichtlich eines konzentrationsabhängigen Potenzials zu betrachten und für Priorisierungszwecke daher weniger hilfreich.

Qualitätskriterien für den ER-Antagonisten-Assay

19. Die mittlere Luciferase-Aktivität der Spike-in-Kontrolle (25 nM E2) sollte mindestens das 4-Fache der mittleren VK auf jeder Platte betragen. Dieses Kriterium wird anhand der Zuverlässigkeit der Endpunktwerte der Validierungsstudie geprüft.

20. Bei der Qualitätskontrolle des Assays sollte die relative transkriptionelle Aktivierung (RTA) von 1 nM E2 mehr als 100 % betragen; die RTA von 1 µM 4-Hydroxytamoxifen (OHT) sollte bei weniger als 40,6 % und die RTA von 100 µM Digitonin (Dig) bei weniger als 0 % liegen.

Zum Nachweis der Eignung des Labors siehe Nummer 14 und Tabellen 3 und 4 im Abschnitt „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“ bei dieser Prüfmethode.

Vehikel

21. Als gleichzeitige VK sollte Dimethylsulfoxid (DMSO) bzw. ein anderes geeignetes Lösungsmittel in der Konzentration verwendet werden, die auch bei den verschiedenen Positiv- und Negativkontrollen sowie bei den Prüfchemikalien zum Einsatz kommt. Die Prüfchemikalien sollten in einem Lösungsmittel gelöst werden, das die betreffende Prüfchemikalie löst und sich mit dem Zellmedium mischt. Geeignete Vehikel sind Wasser, Ethanol (Reinheit 95-100 %) und DMSO. Wenn DMSO verwendet wird, sollte die Konzentration höchstens 0,1 % (v/v) betragen. Bei jedem Vehikel sollte nachgewiesen werden, dass die verwendete Höchstmenge nicht zytotoxisch ist und keine Auswirkungen auf den Assay hat.

Zubereitung der Prüfchemikalien

22. Im Allgemeinen sollten die Prüfchemikalien in DMSO oder in einem anderen geeigneten Lösungsmittel gelöst und mit diesem Lösungsmittel seriell im üblichen Verhältnis von 1:10 gelöst werden, um Lösungen zur Verdünnung mit Medien zuzubereiten.

Löslichkeit und Zytotoxizität: Hinweise zur Dosisfindung

23. Mit einem Vorversuch sollte der geeignete Konzentrationsbereich der zu prüfenden Chemikalie ermittelt und festgestellt werden, ob bei der Prüfchemikalie Probleme hinsichtlich der Löslichkeit und der Zytotoxizität bestehen. Zunächst werden die Chemikalien bis zur maximalen Konzentration von 1 µl/ml, 1 mg/ml bzw. 1 mM geprüft. (Maßgeblich ist der niedrigste Wert.) Je nach dem im Vorversuch festgestellten Grad der Zytotoxizität bzw. nach der festgestellten mangelnden Löslichkeit sollte die Prüfchemikalie beim ersten gültigen Prüflauf in logarithmischen, seriellen Verdünnungen beginnend mit der maximal annehmbaren Konzentration (1 mM, 100 µM, 10 µM usw.) untersucht werden. Die Bildung von Trübungen oder Niederschlag sowie eine festgestellte Zytotoxizität sollten protokolliert werden. Die Konzentrationen im zweiten und ggf. im dritten Prüflauf sollten ggf. angepasst werden, um die Konzentrations-Reaktions-Kurve besser zu beschreiben und um Konzentrationen zu vermeiden, bei denen keine Lösung mehr erfolgt oder eine übermäßige Zytotoxizität induziert wird.

24. Bei ER-Agonisten und -Antagonisten kann eine zunehmende Zytotoxizität die typische sigmoidale Reaktion erheblich verändern oder vollständig beseitigen und sollte daher bei der Auswertung der Daten berücksichtigt werden. Für die Prüfungen sollten Methoden zur Untersuchung der Zytotoxizität verwendet werden, aus denen Informationen für eine Zellviabilität von 80 % zu entnehmen sind. Die Untersuchung sollte mit einem nach Laborerfahrungen geeigneten Assay durchgeführt werden.

25. Wenn in der Zytotoxizitätsprüfung festgestellt wird, dass die Konzentration der Prüfchemikalie die Anzahl der Zellen um 20 % oder mehr reduziert hat, ist die betreffende Konzentration als zytotoxisch zu betrachten, und Verdünnungen ab der zytotoxischen Konzentration aufwärts sollten bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden.

Chemische Exposition und Anordnung auf der Assay-Platte

26. Das Verfahren für chemische Verdünnungen (Schritte 1 und 2) sowie die Exposition der Zellen (Schritt 3) können wie folgt durchgeführt werden:

Schritt 1: Jede Prüfchemikalie sollte seriell in DMSO oder einem anderen geeigneten Lösungsmittel verdünnt und in die Wells einer Mikrotiterplatte gegeben werden, um die endgültigen seriellen Verdünnungen herzustellen, die in der Dosisfindungsstudie als maßgeblich ermittelt wurde (in der Regel z. B. 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM und 10 pM (10^{-3}-10^{-11} M)) bei dreifacher Prüfung.

Schritt 2: Chemische Verdünnung: Zunächst sind 1,5 µl der Prüfchemikalie im Lösungsmittel auf ein Medienvolumen von 500 µl zu verdünnen.

Schritt 3: Exposition der Zellen gegenüber der Chemikalie: 50 µl der (in Schritt 2 zubereiteten) Verdünnung mit dem Medium werden in einen Assay-Well mit 10^4 Zellen/100 µl/Well gegeben.

Für jedes Well wird ein endgültiges Medienvolumen von 150 µl als erforderlich empfohlen. Die zu untersuchenden Proben und Referenzstandards können angeordnet werden wie in den Tabellen 3 und 4 angegeben.

Tabelle 3

Beispiel für die Anordnung von Konzentrationen der Referenzstandards auf der Assay-Platte des ER-Agonisten-Assays

Reihe	17α-Methyltestosteron			Chemikalie			17α-Estradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Konz. 1 (10 µM)	→	→	100 µM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	Konz. 2 (1 µM)	→	→	10 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	Konz. 3 (100 nM)	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	Konz. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	Konz. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	Konz. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	Konz. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VK	→	→	→	→	→	PK	→	→	→	→	→

VK: Vehikelkontrolle (0,1 % DMSO); PK: Positivkontrolle (1 nM E2)

27. Die Referenzstandards (E2, 17α-Estradiol, 17- Methyltestosteron und Corticosteron) sollten bei jedem Prüflauf untersucht werden (Tabelle 3). PK-Wells mit 1 nM E2, die in ausschließlich mit DMSO (oder mit einem anderen geeigneten Lösungsmittel) behandelten E2- und VK-Wells eine maximale Induktion verursachen können, sollten in alle Assay-Platten einbezogen werden (Tabelle 4). Wenn in einem Versuch Zellen unterschiedlicher Herkunft (unterschiedliche Passagenzahl, unterschiedliche Chargen usw.) verwendet werden, sollten die Referenzstandards für die jeweilige Herkunft der Zellen geprüft werden.

Tabelle 4

Beispiel für die Anordnung von Konzentrationen der Prüf- und der Kontrollchemikalien auf der Assay-Platte des ER-Agonisten-Assays

Reihe	Prüfchemikalie 1			Prüfchemikalie 2			Prüfchemikalie 3			Prüfchemikalie 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Konz. 1 (10 µM)	→	→	1 mM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	Konz. 2 (1 µM)	→	→	100 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	Konz. 3 (100 nM)	→	→	10 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	Konz. 4 (10 nM)	→	→	1 µM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	Konz. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	Konz. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	Konz. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VK	→	→	→	→	→	PK	→	→	→	→	→

VK: Vehikelkontrolle (0,1 % DMSO); PK: Positivkontrolle (1 nM E2)

Tabelle 5

Beispiel für die Anordnung von Konzentrationen der Referenzstandards auf der Assay-Platte des ER-Antagonisten-Assays

Reihe	**Tamoxifen**			**Flutamid**			**Prüfchemikalie 1**			**Prüfchemikalie 2**		
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	**Konz. 1 (10 µM)**	→	→	**10 µM**	→	→	**10 µM**	→	→	**10 µM**	→	→
B	**Konz. 2 (1 µM)**	→	→	**1 µM**	→	→	**1 µM**	→	→	**1 µM**	→	→
C	**Konz. 3 (100 nM)**	→	→	**100 nM**	→	→	**100 nM**	→	→	**100 nM**	→	→
D	**Konz. 4 (10 nM)**	→	→	**10 nM**	→	→	**10 nM**	→	→	**10 nM**	→	→
E	**Konz. 5 (1 nM)**	→	→	**1 nM**	→	→	**1 nM**	→	→	**1 nM**	→	→
F	**Konz. 6 (100 pM)**	→	→	**100 pM**	→	→	**100 pM**	→	→	**100 pM**	→	→
G	**0,1 % DMSO**	→	→	→	→	→	**1 µM OHT**	→	→	**100 µM Dig**	→	→
H	**VK**	→	→	→	→	→	**PK**	→	→	→	→	→

VK: Vehikelkontrolle (0,1 % DMSO), PK: Positivkontrolle (1 nM E2), OHT: 4-Hydroxytamoxifen, Dig: Digitonin.

= gespikt mit 25 pM E2

28. Um die Antagonisten-Aktivität von Chemikalien zu ermitteln, sollten in Reihen von A bis G angeordnete Assay-Wells mit 25 pM E2 gespikt werden. Bei jedem Prüflauf sollten auch die Referenzstandards (Tamoxifen und Flutamid) geprüft werden. Jede Assay-Platte sollte mit 1 nM E2 behandelte PK-Wells, die als Qualitätskontrolle für die hERα-HeLa-9903-Zelllinie dienen kann, mit DMSO (oder einem anderen geeigneten Lösungsmittel) behandelte VK-Wells, Wells mit 0,1 % DMSO, die zusätzlich zum Spiken von E2 durch Zugabe von DMSO entsprechend der Spike-in-Kontrolle behandelt wurden, mit der Endkonzentration von 1 µM OHT behandelte Wells und mit 100 µM Dig behandelte Wells enthalten (Tabelle 5). Die nächste Assay-Platte sollte die gleiche Anordnung aufweisen, allerdings ohne die Wells mit den Referenzstandards (Tabelle 6). Wenn in einem Versuch Zellen unterschiedlicher Herkunft (unterschiedliche Passagenzahl, unterschiedliche Chargen usw.) verwendet werden, sollten die Referenzstandards für die jeweilige Herkunft der Zellen geprüft werden.

Tabelle 6

Beispiel für die Anordnung von Konzentrationen der Prüf- und der Kontrollchemikalien auf der Assay-Platte des ER-Antagonisten-Assays

Reihe	Prüfchemikalie 1			Prüfchemikalie 2			Prüfchemikalie 3			Prüfchemikalie 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Konz. 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	Konz. 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	Konz. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	Konz. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	Konz. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	Konz. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VK	→	→	→	→	→	PK	→	→	→	→	→

VK: Vehikelkontrolle (0,1 % DMSO), PK: Positivkontrolle (1 nM E2), OHT: 4-Hydroxytamoxifen, Dig: Digitonin.

: gespikt mit 25 pM E2

29. Dass keine Randeffekte auftreten, sollte ggf. bestätigt werden, und wenn das Auftreten von Randeffekten als möglich betrachtet wird, sollte die Anordnung der Wells auf den Platten geändert werden, um diese Effekte zu vermeiden. Beispielsweise könnte eine Anordnung gewählt werden, bei der die Rand-Wells nicht berücksichtigt werden.

30. Nach Zugabe der Chemikalien sollten die Assay-Platten 20-24 Stunden in einem Inkubator mit 5 % CO2 bei 37 ± 1 °C inkubiert werden, um die Bildung von Reporter-Genprodukten zu induzieren.

31. Bei stark flüchtigen Verbindungen ist besondere Vorsicht geboten. Bei diesen Verbindungen kann es bei unmittelbar benachbarten Kontroll-Wells zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Dies sollte im Hinblick auf erwartete und historische Kontrollwerte beachtet werden. In den seltenen Fällen, in denen die Flüchtigkeit problematisch sein könnte, können Plattenversiegelungen helfen, einzelne Wells während der Prüfung zu isolieren. Dies ist in den betreffenden Fällen zu empfehlen.

32. Um unabhängige Ergebnisse sicherzustellen, sollten die Hauptprüfungen einer Chemikalie an unterschiedlichen Tagen wiederholt werden.

Luciferase-Assay

33. Für diesen Assay kann ein im Handel erhältliches Reagens für Luciferase-Assays [z. B. Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510 oder gleichwertig)] oder ein Luciferase-Assay-Standardsystem (z. B. Promega, E1500 oder gleichwertig) verwendet werden, wenn das Reagens die Akzeptanzkriterien erfüllt. Die Reagenzien für den Assay sollten nach der Empfindlichkeit des zu verwendenden Luminometers ausgewählt werden. Wenn das Luciferase-Assay-Standardsystem verwendet wird, sollte vor der Zugabe des Substrats der Luciferase Zellkultur-Lysispuffer (Cell Culture Lysis Reagent) (z. B. Promega, E1531 oder gleichwertig) hinzugegeben werden. Die Zugabe des Luciferase-Reagens sollte nach den Herstelleranweisungen erfolgen.

ANALYSE DER DATEN

ER-Agonisten-Assay

34. Zur Erzielung einer relativen transkriptionellen Aktivität bei der PK (1 nM E2) können bei einem ER-Agonisten-Assay die Luminiszenssignale derselben Platte in den folgenden Schritten analysiert werden (wobei auch gleichwertige mathematische Verfahren annehmbar sind):

Schritt 1: Für die VK wird der Mittelwert berechnet.

Schritt 2: Der Mittelwert der VK wird vom Wert jedes einzelnen Wells abgezogen, um die Daten zu normalisieren.

Schritt 3: Für die normalisierte PK wird der Mittelwert berechnet.

Schritt 4: Der normalisierte Wert jedes einzelnen Wells auf der Platte wird durch den Mittelwert der normalisierten PK (PK = 100 %) geteilt.

Der endgültige Wert der einzelnen Wells ist die relative transkriptionelle Aktivität dieses Wells im Vergleich zur Reaktion der PK.

Schritt 5: Der Mittelwert der relativen transkriptionellen Aktivität der einzelnen Konzentrationsgruppen der Prüfchemikalie wird berechnet. Bei der Reaktion sind zwei Dimensionen zu beachten: die gemittelte transkriptionelle Aktivität (Reaktion) und die Konzentration, bei der die Reaktion auftritt (siehe folgender Abschnitt).

Hinweise zur Induktion bei EC_{50}, PC_{50} und PC_{10}

35. Zur Berechnung des EC50-Werts wird die vollständige Konzentrations-Reaktions-Kurve benötigt. Die Erstellung dieser Kurve ist aufgrund von Begrenzungen des Prüfkonzentrationsbereichs (beispielsweise infolge von Zytotoxizität oder von Problemen hinsichtlich der Löslichkeit) allerdings u. U. nicht immer möglich oder praktikabel. Da der EC50-Wert und die maximale Induktion (entsprechend dem Höchstwert der Hill-Gleichung) relevante Parameter sind, sollten diese Parameter nach Möglichkeit angegeben werden. Zur Berechnung des EC50-Wertes und der maximalen Induktion sollte eine geeignete Statistik-Software verwendet werden (z. B. Graphpad Prism). Wenn die Konzentrations-Reaktions-Daten für die Hill-Logistik-Gleichung verwendet werden können, sollte der EC50-Wert mit der folgenden Gleichung (7) berechnet werden:

Y = Bottom + (Top-Bottom) / (1+10 exp ((log EC50 -X) × Hillslope)), wobei gilt:

X = Logarithmus der Konzentration und

Y = Reaktion; Y beginnt beim unteren Niveau (Bottom) und steigt in einer Sigmoidkurve bis zum oberen Niveau (Top). Das untere Niveau ist bei der Hill-Logistik-Gleichung gleich Null.

36. Bei den Prüfchemikalien ist jeweils Folgendes anzugeben:

RPCMax (die durch eine Prüfchemikalie induzierte maximale Reaktion, ausgedrückt als Prozentanteil der durch 1 nM E2 auf derselben Platte induzierten Reaktion) sowie PC_{Max} (die Konzentration bei RPCMax) und

(bei positiven Chemikalien) die Konzentrationen, bei denen PC10 und ggf. PC50 induziert wird.

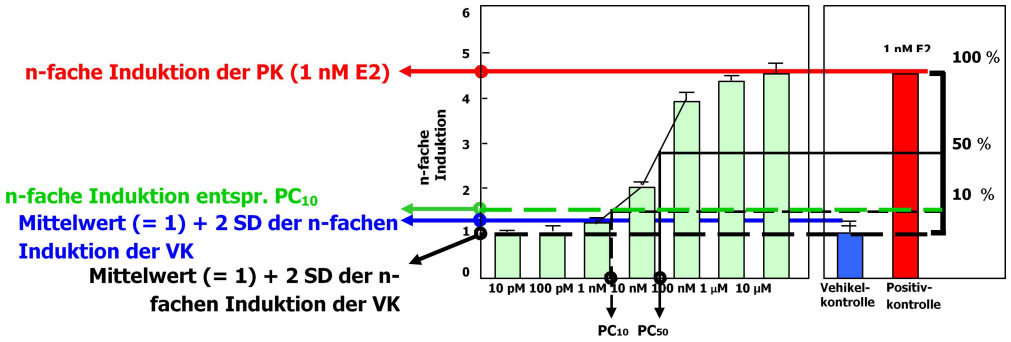
37. Der PCx-Wert kann durch Interpolation zwischen zwei Punkten auf der XY-Koordinate, einem unmittelbar über und einem unmittelbar unter einem PCx-Wert, berechnet werden. Wenn die Datenpunkte unmittelbar über und unter dem PCx-Wert die Koordinaten (a,b) und (c,d) haben, kann der PCx-Wert mit folgender Gleichung berechnet werden:

$$\log[PCx] = \log[c]+(x-d)/(d-b)$$

38. Erläuterungen zu den PK-Werten sind der folgenden Abbildung 1 zu entnehmen.

Abbildung 1

Beispiel zur Ableitung von PK-Werten – Die PK (1 nM E2) wird auf jeder Assay-Platte berücksichtigt.



ER- Antagonisten-Assay

39. Zur Erzielung einer relativen transkriptionellen Aktivität (RTA) der Spike-in-Kontrolle (25 pM E2) können bei einem ER-Antagonisten-Assay die Luminiszenssignale derselben Platte in den folgenden Schritten analysiert werden (wobei auch gleichwertige mathematische Verfahren annehmbar sind):

Schritt 1: Für die VK wird der Mittelwert berechnet.

Schritt 2: Der Mittelwert der VK wird vom Wert jedes einzelnen Wells abgezogen, um die Daten zu normalisieren.
Schritt 3: Für die normalisierte Spike-in-Kontrolle wird der Mittelwert berechnet.

Schritt 4: Der normalisierte Wert jedes einzelnen Wells auf der Platte wird durch den Mittelwert der normalisierten Spike-in-Kontrolle (Spike-in-Kontrolle = 100 %) geteilt.

Der endgültige Wert der einzelnen Wells ist die relative transkriptionelle Aktivität dieses Wells im Vergleich zur Reaktion der Spike-in-Kontrolle.

Schritt 5: Der Mittelwert der relativen transkriptionellen Aktivität der einzelnen Behandlungen wird berechnet.

Hinweise zur Induktion bei IC_{30} und IC_{50}

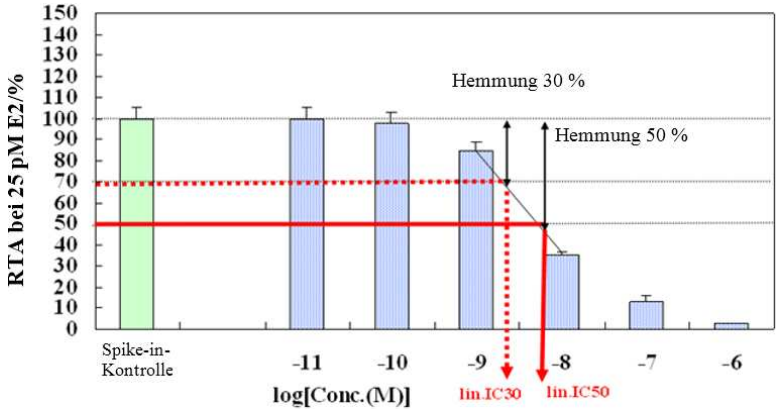
40. Bei positiven Chemikalien sollten die Konzentrationen angegeben werden, bei denen IC_{30} und ggf. IC_{50} induziert wird.

41. Der ICx-Wert kann durch Interpolation zwischen zwei Punkten auf der XY-Koordinate, einem unmittelbar über und einem unmittelbar unter einem ICx-Wert, berechnet werden. Wenn die Datenpunkte unmittelbar über und unter dem ICx-Wert die Koordinaten (c,d) und (a,b) haben, kann der ICx-Wert mit folgender Gleichung berechnet werden:

lin ICx = a-(b-(100-x)) (a-c) /(b-d)

Abbildung 2

Beispiel zur Ableitung von IC-Werten – Der Spike (25 pM E2) wird auf jeder Assay-Platte berücksichtigt.



RTA: relative transkriptionelle Aktivität

42. Die Ergebnisse sollten auf zwei (oder drei) unabhängigen Prüfläufen beruhen. Wenn bei zwei Prüfläufen vergleichbare und daher auch reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden, ist ein dritter Prüflauf nicht erforderlich. Ergebnisse können dann akzeptiert werden, wenn die folgenden Anforderungen erfüllt sind:

— Die Ergebnisse erfüllen die Akzeptanzkriterien (Nummern 14-20)

— und sind reproduzierbar.

Kriterien für die Auswertung von Daten

Tabelle 7

Kriterien für ein positives oder ein negatives Ergebnis beim ER-Agonisten-Assay

Positiv	Wenn RPC_{Max} bei mindestens zwei von zwei oder zwei von drei Prüfläufen größer oder gleich 10 % der Reaktion der Positivkontrolle ist.
Negativ	Wenn RPC_{Max} bei zwei von zwei oder zwei von drei Prüfläufen nicht mindestens gleich 10 % der Reaktion der Positivkontrolle ist.

Tabelle 8

Kriterien für ein positives oder ein negatives Ergebnis beim ER-Antgonisten-Assay

Positiv	Wenn bei mindestens zwei von zwei oder zwei von drei Prüfläufen IC_{30} berechnet wird.
Negativ	Wenn IC_{30} bei zwei von zwei oder zwei von drei Prüfläufen nicht berechnet wird.

43. Kriterien zur Auswertung der Daten sind den Tabellen 7 und 8 zu entnehmen. Positive Ergebnisse werden sowohl durch die Größenordnung der Wirkung als auch durch die Konzentration beschrieben, bei der die Wirkung eintritt. Die Beschreibung von Ergebnissen in Konzentrationen bei denen 50 % (PC_{50}) bzw. 10 % (PC_{10}) der PK-Werte beim Agonisten-Assay erreicht und 50 % (IC_{50}) bzw. 30 % (IC_{30}) des Wertes der Spike-in-Kontrolle beim Antagonisten-Assay gehemmt werden, erfüllt beide Anforderungen. Eine Prüfchemikalie wird jedoch als positiv eingestuft, wenn die durch die Prüfchemikalie induzierte maximale Reaktion (RPC_{Max}) bei mindestens zwei von zwei oder zwei von drei Prüfläufen größer oder gleich 10 % der Reaktion der PK ist. Als negativ werden Prüfchemikalien eingestuft, wenn RPC_{Max} in zwei von zwei oder zwei von drei Prüfläufen nicht mindestens 10 % der Reaktion der Positivkontrolle beträgt.

44. Die Berechnungen von PC10, PC50 und PCMax beim ER-Agonisten-Assay und von IC30 und IC50 beim ER-Antagonisten-Assay kann anhand einer Tabelle vorgenommen werden, die auf der öffentlichen Website der OECD ([2]) mit der Prüfrichtlinie bereitgestellt wird.

45. Es sollte hinreichend sein, die PC10- oder PC50- bzw. IC30- oder IC50-Werte mindestens zweimal zu bestimmen. Wenn die ermittelten Normalwerte von Daten im selben Konzentrationsbereich jedoch Unterschiede mit einem unannehmbar hohen Variationskoeffizienten (VK, %) aufweisen, können die Daten nicht als zuverlässig betrachtet werden. In diesem Fall sollte untersucht werden, worauf die hohe Variabilität zurückzuführen ist. Der VK der dreifachen Rohdaten (d. h. der Daten zur Leuchtdichte) der zur Berechnung von PC10 verwendeten Datenpunkte sollte weniger als 20 % betragen.

46. Die Erfüllung der Akzeptanzkriterien deutet darauf hin, dass das Assay-System ordnungsgemäß funktioniert. Dies gewährleistet jedoch nicht, dass ein bestimmter Prüflauf tatsächlich exakte Daten ergibt. Die Wiederholung der Ergebnisse des ersten Prüflaufs ist die beste Bestätigung dafür, dass exakte Daten ermittelt wurden.

47. Wenn beim ER-Agonisten-Assay über die für die Screening- und Priorisierungszwecke dieser Prüfrichtlinie benötigten Daten zu positiven Prüfchemikalien hinaus weitere Informationen benötigt werden (insbesondere für PC_{10}- bis PC_{49}-Chemikalien sowie bei Chemikalien, bei denen vermutet wird, dass es zu einer Überstimulation der Luciferase kommt), kann mit einem ERα-Antagonisten (siehe Anlage 2.1) bestätigt werden, dass die beobachtete Luciferase-Aktivität ausschließlich eine ERα-spezifische Reaktion ist.

PRÜFBERICHT

48. Siehe Nummer 20 im Abschnitt „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS".

LITERATUR

(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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(2) Escande, A., u. a. (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., u. a. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

([2]) http://www.oecd.org/env/testguidelines

(4) Spaepen, M., u. a. (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, FEMS Microbiol. Lett., 78(1), 89-94.

(5) Kobayashi, H., u. a. (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.

(6) Dussurget, O. und Roulland-Dussoix, D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl*. Environ. *Microbiol*., 60(3), 953-959.

(7) De Lean, A., Munson, P.J. und Rodbard, D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, Am. J. *Physiol*., 235, E97-El02.

Anlage 2.1

FALSCH POSITIVE: BEWERTUNG VON NICHT DURCH REZEPTOREN VERMITTELTEN LUMINISZENZSIGNALEN

1. Falsch positive Ergebnisse beim ER-Agonisten-Assay können auf eine nicht durch ER vermittelte Aktivierung des Luciferase-Gens, auf eine direkte Aktivierung des Genprodukts oder eine sonstige Fluoreszenz zurückzuführen sein. Diese Wirkungen äußern sich in einer unvollständigen oder ungewöhnlichen Dosis-Reaktions-Kurve. Wenn solche Effekte vermutet werden, sollte der Effekt eines ER-Antagonisten (z. B. 4-Hydroxytamoxifen (OHT) in einer nicht toxischen Konzentration) auf die Reaktion untersucht werden. Der reine Antagonist ICI 1827 80 ist für diesen Zweck möglicherweise nicht geeignet, da eine hinreichende Konzentration von ICI 1827 80 eine Reduzierung des VK-Werts bewirken kann und da dies die Datenanalyse beeinträchtigt.

2. Um die Validität dieses Ansatzes sicherzustellen, sollten auf derselben Platte die folgenden Parameter geprüft werden:

   — Agonisten-Aktivität der unbekannten Chemikalie mit/ohne 10 µM OHT,

   — VK (dreifach),

   — OHT (dreifach),

   — 1 nM E2 (dreifach) als Agonisten-PK und

   — 1 nM E2 + OHT (dreifach).

Kriterien für die Auswertung von Daten

Hinweis: Alle Wells sollten mit dem Vehikel in der gleichen Konzentration behandelt werden.

— Wenn die Agonisten-Aktivität der unbekannten Chemikalie durch die Behandlung mit dem ER-Antagonisten NICHT beeinträchtigt wird, ist sie als „negativ“ einzustufen.

— Wird die Agonisten-Aktivität der unbekannten Chemikalie vollständig gehemmt, sind die Entscheidungskriterien zu berücksichtigen.

— Ist die Agonisten-Aktivität bei der niedrigsten Konzentration größer oder gleich der Reaktion bei PC10 ist, wird die unbekannte Chemikalie mindestens in der Größenordnung der Reaktion bei PC10 gehemmt. Die Differenz der Reaktionen zwischen den nicht behandelten und den mit dem ER-Antagonisten behandelten Wells wird berechnet. Diese Differenz ist als tatsächliche Reaktion zu betrachten und sollte zur Berechnung der betreffenden Parameter verwendet werden, damit über die Einstufung entschieden werden kann.

Analyse der Messdaten

Der Leistungsstandard wird geprüft.

Der VK zwischen unter gleichen Bedingungen behandelten Wells wird geprüft.

1. Der Mittelwert der VK wird berechnet.

2. Vom Wert der einzelnen **nicht** mit OHT behandelten Wells wird der Mittelwert der VK abgezogen.

3. Der OHT-Mittelwert wird berechnet.

4. Vom Wert der einzelnen mit OHT behandelten Wells wird der Mittelwert der VK abgezogen.

5. Der Mittelwert der PK wird berechnet.

6. Die relative transkriptionelle Aktivität aller übrigen Wells wird bezogen auf die PK berechnet.

Anlage 2.2

ZUBEREITUNG VON MIT DEXTRANBESCHICHTETER AKTIVKOHLE (DCC) BEHANDELTEM SERUM

1. Die Behandlung von Serum mit dextranbeschichteter Aktivkohle (DDC) ist ein allgemeines Verfahren zur Entfernung von Östrogenverbindungen aus zu einem Zellmedium hinzugegebenem Serum, um verfälschte Reaktionen aufgrund von im Serum verbliebenem Östrogen auszuschließen. Mit diesem Verfahren können 500 ml fetales Rinderserum (FBS) behandelt werden.

Elemente

2. Für das Verfahren werden die folgende Ausrüstung und die folgenden Materialien benötigt:

Materialien

Aktivkohle

Dextran

Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl2·6H2O)

Saccharose

1 M HEPES-Pufferlösung) (pH 7,4)

Mit einem Filtersystem hergestelltes ultrareines Wasser

Ausrüstung

Autoklaviertes Glasgefäß mit geeigneter Größe, normale Laborzentrifuge (die auf eine Temperatur von 4 °C eingestellt werden kann)

Verfahren

3. Das folgende Verfahren wird für die Verwendung von 50-ml-Zentrifugenröhrchen angepasst:

[Tag 1] Zur Zubereitung einer Suspension mit dextranbeschichteter Aktivkohle wird 1 l ultrareines Wasser mit 1,5 mM $MgCl_2$, 0,25 M Saccharose, 2,5 g Aktivkohle, 0,25 g Dextran und 5 mM HEPES gemischt, bei 4 °C umgerührt und über Nacht stehen gelassen.

[Tag 2] Die Suspension wird in 50-ml-Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 4 °C 10 Minuten mit 10 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt, und die Hälfte des Aktivkohlesediments zur Verwendung an Tag 3 bei 4 °C aufbewahrt. Die andere Hälfte der Aktivkohle wird mit FBS suspendiert, das zur Vermeidung von Ausfällungen vorsichtig aufgetaut, 30 Minuten bei 56 °C durch Wärme inaktiviert und dann in ein autoklaviertes Glasgefäß (z. B. einen Erlenmeyer-Kolben) gegeben wurde. Diese Suspension wird über Nacht bei 4 °C vorsichtig umgerührt.

[Tag 3] Die Suspension wird in Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 4 °C 10 Minuten mit 10 000 rpm zentrifugiert. Das FBS wird entnommen und in das an Tag 2 zubereitete und aufbewahrte frische Aktivkohlesediment gegeben. Das Aktivkohlesediment wird suspendiert und die erhaltene Suspension vorsichtig in einem autoklavierten Glasgefäß über Nacht bei 4 °C umgerührt.

[Tag 4] Die Suspension wird 10 Minuten bei einer Temperatur von 4 °C mit 10 000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand durch einen sterilen 0,2-µm-Filter filtriert. Dieses mit DCC behandelte FBS ist bei −20 °C zu lagern und kann dann innerhalb eines Zeitraums von bis zu einem Jahr verwendet werden.

Anlage 3

VM7LUC-ER-TA-ASSAY ZUR BESTIMMUNG VON ÖSTROGENREZEPTOR-AGONISTEN UND -ANTAGONISTEN

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

1. Für diesen Assay wird die VM7Luc4E2-Zelllinie verwendet. ([1]) Diese Zelllinie wurde vom National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) und vom Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) validiert (1). Die VM7Luc-Zelllinien exprimieren hauptsächlich den endogenen ERα sowie in geringerer Menge den endogenen ERβ (2) (3) (4).

2. Dieser Assay ist bei zahlreichen Stoffen anwendbar, die in Dimethylsulfoxid (DMSO; CASRN 67-68-5) gelöst werden können, nicht mit DMSO oder mit dem Zellkulturmedium reagieren und bei der zu untersuchenden Konzentration nicht zytotoxisch wirken. Wenn DMSO nicht verwendet werden kann, kommen auch andere Vehikel wie beispielsweise Ethanol oder Wasser in Betracht (Nummer 12). Angesichts der nachgewiesenen Leistungsfähigkeit des VM7Luc-ER-TA-(Ant)agonisten-Assays ist davon auszugehen, dass mit diesem Assay generierte Daten Aufschluss über durch ER vermittelte Wirkungsmechanismen geben und bei der Priorisierung von Stoffen für weitere Untersuchungen berücksichtigt werden können.

3. Dieser Assay wurde speziell zum Nachweis von hERα und einer durch hERß vermittelten TA anhand einer Messung der Chemiluminiszenz als Endpunkt entwickelt. Die Berücksichtigung der Chemiluminiszenz in Bioassays ist allgemein üblich, da die Luminiszenz ein ausgeprägtes Signal-Rausch-Verhältnis ergibt. Die Aktivität der Leuchtkäfer-Luciferase bei zellbasierten Assays kann jedoch mit der Aktivität von Stoffen verwechselt werden, die das Luciferase-Enzym hemmen und infolge der Proteinstabilisierung sowohl eine erkennbare Hemmung als auch eine erhöhte Luminiszenz bewirken. Außerdem wurden bei einige luciferasebasierten EN-Reporter-Gen-Assays bei Phytoöstrogenkonzentrationen von mehr als 1 µM infolge der Überaktivierung des Luciferase-Reporter-Gens Luminiszenzsignale festgestellt, die nicht durch Rezeptoren vermittelt wurden (9) (11). Die Dosis-Reaktions-Kurve zeigt, dass die tatsächliche Aktivierung des ER-Systems bei niedrigeren Konzentrationen erfolgt; bei stabil transfizierten ER-TA-Assay-Systemen muss die Luciferase-Expression bei hohen Konzentrationen von Phytoöstrogenen oder ähnlichen Verbindungen, bei denen vermutet wird, dass sie eine phytoöstrogenartige Überaktivierung des Luciferase-Reportergens verursachen, jedoch sorgfältig untersucht werden.

4. Vor der Verwendung dieses Assays für rechtliche Zwecke sollten die Abschnitte „ALLGEMEINE EINLEITUNG“ und „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“ gelesen werden. Die in der vorliegenden Prüfmethode verwendeten Begriffe und Abkürzungen werden in Anlage 1 erläutert.

PRINZIP DES ASSAYS (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

5. Mit dem Assay werden ER-Liganden-Bindungen nach einer Translokation des Rezeptor-Liganden-Komplexes an den Zellkern nachgewiesen. Im Zellkern geht der Rezeptor-Liganden-Komplex eine Bindung mit spezifischen DNA-Response-Elements ein und transaktiviert das Reporter-Gen (*luc*). Dadurch wird die Bildung von Luciferase angeregt und anschließend die Emission von Licht bewirkt, das mit einem Luminometer gemessen werden kann. Die Luciferase-Aktivität kann rasch und kostengünstig mit verschiedenen im Handel erhältlichen Test-Kits bewertet werden. Beim VM7Luc-ER-TA-Assay wird eine auf ER reagierende humane Brustadenokarzinom-Zelllinie (VM7) verwendet, die mit einem Leuchtkäfer-*luc*-Reporter-Genprodukt stabil transfiziert wurde, das kontrolliert durch vier Östrogen-Response-Elemente vor

([1]) Vor Juni 2016 wurde diese Zelllinie als BG1Luc-Zelllinie bezeichnet. BG-1-Zellen wurden ursprünglich von Geisinger u. a. (1998) (12) beschrieben und später von Forschern am National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) charakterisiert (13). Erst vor verhältnismäßig kurzer Zeit wurde entdeckt, dass von BG-1-Zellen zwei Varianten existieren, die von Forschern verwendet werden: BG-1 Fr und BG-1 NIEHS. Eingehende Untersuchungen (u. a. DNA-Tests) der beiden Varianten von BG-1-Zelllinien durch Li u. a. (2014) (14) haben gezeigt, dass die Variante BG-1 Fr eine besondere Zelllinie war und dass die Variante BG-1 NIEHS, d. h. die ursprünglich zur Entwicklung des Assays verwendete Zelllinie, nicht die humane Ovarialkarzinom-Zelllinie BG1, sondern eine Variante der humanen Brustkrebs-Zelllinie MCF7 war. Die in dem Assay verwendete und ursprünglich als BG1Luc4E2 bezeichnete Zelllinie (15) wird nun als VM7Luc4E2 („V” = Variante; „M7” = MCF7-Zellen) bezeichnet. Entsprechend wird nun der Assay als VM7Luc-ER-TA-Assay bezeichnet. Die Zelllinien, auf denen der Assay beruht, haben also eine andere Herkunft. Für veröffentlichte Validierungsstudien und für die Verwendbarkeit und den Einsatz dieses Assays zur Untersuchung östrogener/antiöstrogener Chemikalien ist dies jedoch nicht von Bedeutung.

dem Maus-Mammatumorvirus-Promoter (MMTV) angeordnet wurde, um anhand der *In-vitro*-Aktivität eines ER-Agonisten oder -Antagonisten Stoffe nachzuweisen. Dieser MMTV-Promotor bewirkt nur eine geringe Kreuzreaktivität mit anderen Steroiden und nicht steroiden Hormonen (8). Kriterien für die Auswertung der Daten werden in Nummer 41 eingehend beschrieben. Eine positive Reaktion ist kurz gesagt an einer Konzentrations-Reaktions-Kurve mit mindestens drei Punkten mit sich nicht überschneidenden Fehlerbalken (Mittelwert ± SD) sowie an einer Änderung der Amplitude (normalisierte relative Lichteinheiten [RLU]) von mindestens 20 % des Höchstwerts für den betreffenden Referenzstandard (17β-Estradiol [E2; CASRN 50-28-2] beim Agonsten-Assay und Raloxifen HCl [Ral; CASRN 84449-90-1]/E2 beim Antagonisten-Assay) zu erkennen.

VERFAHREN

Zelllinie

6. Für den Assay sollte die stabil transfizierte VM7Luc4E2-Zelllinie verwendet werden. Diese Zelllinie kann gegenwärtig nur nach Maßgabe einer technischen Lizenzvereinbarung von der University of California, Davis, Kalifornien, USA ([2]) und von Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, North Carolina, USA, ([3]) bezogen werden.

Stabilität der Zelllinie

7. Um die Stabilität und die Integrität der Zelllinie aufrechtzuerhalten, sollten die Zellen im Erhaltungsmedium über mehr als eine Passage des tiefgefrorenen Materials vermehrt werden (Nummer 9). Die Kultivierung sollte sich auf höchstens 30 Passagen beschränken. Bei der VM7Luc4E2-Zelllinie werden für 30 Passagen etwa drei Monate benötigt.

Bedingungen für die Haltung der Zellkulturen und für die Plattierung

8. Die in der Guidance on Good Cell Culture Practice spezifizierten Verfahren (5) (6) sollten eingehalten werden, damit die Qualität aller Materialien und Methoden gewährleistet ist und die Integrität, die Validität und die Reproduzierbarkeit aller durchgeführten Arbeiten gewahrt werden.

9. VM7Luc4E2-Zellen werden im RPMI-1640-Medium ergänzt um 0,9 % Pen/Strep und 8,0 % fetales Rinderserum (FBS) in einem eigenen Inkubator für Gewebekulturen bei einer Temperatur von 37 ± 1 °C, 90 ± 5 % Luftfeuchtigkeit und 5,0 ± 1 % CO_2/Luft gehalten.

10. Nach Erreichen einer Konfluenz von ~80 % werden die VM7Luc4E2-Zellen subkultiviert und 48 Stunden in einer östrogenfreien Umgebung konditioniert, bevor sie in 96-Well-Platten plattiert werden, wo sie den Prüfchemikalien ausgesetzt und auf eine öströgenbedingte Induzierung einer Luciferase-Aktivität untersucht werden. Das östrogenfreie Medium (EFM) enthält Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium (DMEM) ohne Phenolrot, ergänzt um 4,5 % mit Aktivkohle/Dextran behandeltes fetales Rinderserum (FBS), 1,9 % L-Glutamin und 0,9 % Pen/Strep. Die Kunststoffmaterialien sollten keine Östrogenaktivität entwickeln [siehe detailliertes Protokoll (7)].

Akzeptanzkriterien

11. Ob eine Prüfung akzeptiert oder verworfen wird, hängt von der Auswertung der Ergebnisse mit den Referenzstandards und mit den Kontrollen aller auf einer 96-Well-Platte durchgeführten Prüfungen ab. Jeder Referenzstandard wird in mehreren Konzentrationen geprüft, und von allen Konzentrationen der Referenzstandards und der Kontrollen

([2]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, E-Mail:msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649.

([3]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, E-Mail: info@dioxins.com, Telefon: 919-688-4804, Telefax: 919-688-4404.

sind mehrere Proben verfügbar. Die Ergebnisse werden mit Qualitätskontrollen (QC) der Parameter verglichen, die aus Datenbanken mit historischen Daten zu Agonisten und Antagonisten abgeleitet wurden, die zum Nachweis ihrer Leistungsfähigkeit von den einzelnen Labors ermittelt wurden. Die Datenbanken mit historischen Datenbanken werden unter Eingabe der Werte der Referenzstandards und der Kontrollen kontinuierlich aktualisiert. Nach Änderungen der Ausrüstung oder der Laborbedingungen müssen die Datenbanken mit historischen Daten unter Umständen aktualisiert werden.

Agonisten-Prüfung

Dosisfindungsstudie

- Induktion: Zur Messung der Plattenindukion wird der höchste mittlere RLU-Wert (RLU = relative Lichteinheit) des E2-Referenzstandards durch den mittleren RLU-Wert der DMSO-Kontrolle geteilt. In der Regel wird eine 5-fache Induktion erreicht; als Akzeptanzkriterium gilt jedoch, dass die Induktion größer oder gleich der 4-fachen Induktion sein sollte.

- Ergebnisse der DMSO-Kontrolle: Die RLU-Werte der Lösungsmittelkontrolle sollten das 2,5-Fache der Standardabweichung des historischen mittleren RLU-Werts der Lösungsmittelkontrolle betragen.

- Eine Prüfung, die keines der beiden Akzeptanzkriterien erfüllt, sollte verworfen und wiederholt werden.

Hauptversuch

Der Hauptversuch beinhaltet Akzeptanzkriterien aus der Agonisten-Dosisfindungsstudie sowie Folgendes:

- Ergebnisse der Referenzstandards: Die Konzentrations-Reaktions-Kurve des E2-Referenzstandards sollte sigmoidal verlaufen und mindestens drei Werte im linearen Bereich enthalten.

- Ergebnisse der Positivkontrolle: Die RLU-Werte der Methoxychlor-Kontrolle sollten höher sein als der Mittelwert für DMSO zuzüglich der 3-fachen Standardabweichung vom DMSO-Mittelwerts.

- Eine Prüfung, die keines der Akzeptanzkriterien erfüllt, sollte verworfen und wiederholt werden.

Antagonisten-Prüfung

Dosisfindungsstudie

- Reduktion: Zur Messung der Plattenreduktion wird der höchste mittlere RLU-Wert des Ral/E2-Referenzstandards durch den mittleren RLU-Wert der DMSO-Kontrolle geteilt. In der Regel wird eine 5-fache Reduktion erreicht; als Akzeptanzkriterium gilt jedoch, dass die Reduktion größer oder gleich der 3-fachen Reduktion sein sollte.

- Ergebnisse der E2-Kontrolle: Die RLU-Werte der E2-Kontrolle sollten das 2,5-Fache der Standardabweichung des historischen mittleren RLU-Werts der E2-Kontrolle betragen.

- Ergebnisse der DMSO-Kontrolle: Die RLU-Werte der DMSO-Kontrolle sollten das 2,5-Fache der Standardabweichung des historischen mittleren RLU-Werts der Lösungsmittelkontrolle betragen.

- Eine Prüfung, die keines der Akzeptanzkriterien erfüllt, wird verworfen und wiederholt.

Hauptversuch

Der Hauptversuch beinhaltet Akzeptanzkriterien aus der Antagonisten-Dosisfindungsstudie sowie Folgendes:

- Ergebnisse der Referenzstandards: Die Konzentrations-Reaktions-Kurve des Ral/E2-Referenzstandards sollte sigmoidal verlaufen und mindestens drei Werte im linearen Bereich enthalten.

- Ergebnisse der Positivkontrolle: Die RLU-Werte der Tamoxifen/E2-Kontrolle sollten höher sein als der Mittelwert der E2-Kontrolle zuzüglich der 3-fachen Standardabweichung vom Mittelwert der E2-Kontrolle.

- Eine Prüfung, die keines der Akzeptanzkriterien erfüllt, wird verworfen und wiederholt.

Referenzstandards, Positivkontrolle und Vehikelkontrolle

Vehikelkontrolle (Agonisten- und Antagonisten-Assay)

12. Das zur Auflösung einer Prüfchemikalie verwendete Vehikel sollte als Vehikelkontrolle geprüft werden. Bei der Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays wurde 1 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO, CASRN 67-68-5) verwendet (Nummer 24). Wenn ein anderes Vehikel als DMSO verwendet wird, sollten alle Referenzstandards, Kontrollen und Prüfchemikalien mit diesem Vehikel geprüft werden.

Referenzstandard (Dosisfindung beim Agonisten-Assay)

13. Als Referenzstandard wird E2 (CASRN 50-28-2) verwendet. Der Referenzstandard für die Dosisfindungsstudie besteht aus einer seriellen Verdünnung mit vier Konzentrationen E2 ($1{,}84 \times 10^{-10}$, $4{,}59 \times 10^{-11}$, $1{,}15 \times 10^{-11}$ und $2{,}87 \times 10^{-12}$ M), wobei jede Konzentration in zwei Wells geprüft wird.

Referenzstandard (Dosisfindung beim Agonisten-Assay)

14. E2 für den Hauptversuch besteht aus einer seriellen Verdünnung 1:2 mit 11 E2-Konzentrationen (von $3{,}67 \times 10^{-10}$ bis $3{,}59 \times 10^{-13}$ M) jeweils in zwei Wells.

Referenzstandard (Dosisfindung beim Antagonisten-Assay)

15. Der Referenzstandard besteht aus einer Kombination von Ral (CASRN 84449-90-1) und E2 (CASRN 50-28-2). Ral/E2 für die Dosisfindungsstudie umfasst eine serielle Verdünnung mit Ral in drei Konzentrationen ($3{,}06 \times 10^{-9}$, $7{,}67 \times 10^{-10}$ und $1{,}92 \times 10^{-10}$ M) sowie einer festen Konzentration ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M) E2 in zwei Wells.

Referenzstandard (Agonisten-Hauptversuch)

16. Ral/E2 für den Hauptversuch besteht aus einer seriellen Verdünnung von Ral (1:2) mit neun Ral/E2-Konzentrationen von $2{,}45 \times 10^{-8}$ bis $9{,}57 \times 10^{-11}$ M sowie einer festen Konzentration ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M) E2 jeweils in zwei Wells.

Schwache Positivkontrolle (Agonist)

17. Die schwache Positivkontrolle besteht aus 9,06 x 10^{-6} M *p,p'*-Methoxychlor (Methoxychlor; CASRN 72-43-5) in einem EFM.

Schwache Positivkontrolle (Antagonist)

18. Die schwache Positivkontrolle besteht aus 3,36 x 10^{-6} M Tamoxifen (CASRN 10540-29-1) mit 9,18 × 10^{-11} M E2 in einem EFM.

E2-Kontrolle (nur Antagonisten-Assay)

19. Die E2-Kontrolle besteht aus 9,18 × 10^{-11} M E2 in einem EFM und dient als Normalwert-Negativkontrolle.

n-fache Induktion (Agonist)

20. Die Induktion der Luciferase-Aktivität des Referenzstandards (E2) wird gemessen, indem der höchste mittlere RLU-Wert des E2-Referenzstandards durch den mittleren RLU-Wert der DMSO-Kontrolle geteilt wird; dabei sollte das Ergebnis mehr als das 4-Fache betragen.

n-fache Reduktion (Antagonist)

21. Die mittlere Luciferase-Aktivität des Referenzstandards (Ral/E2) wird gemessen, indem der höchste mittlere RLU-Wert des Ral/E2-Referenzstandards durch den mittleren RLU-Wert der DMSO-Kontrolle geteilt wird; dabei sollte das Ergebnis mehr als das 3-Fache betragen.

Zum *Nachweis der Eignung des Labors* siehe Nummer 14 und Tabellen 3 und 4 im Abschnitt „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“ bei dieser Prüfmethode.

Vehikel

22. Die Prüfchemikalien sollten in einem Lösungsmittel gelöst werden, das die betreffende Prüfchemikalie löst und sich mit dem Zellmedium mischt. Geeignete Vehikel sind Wasser, Ethanol (Reinheit 95-100 %) und DMSO. Wenn DMSO verwendet wird, sollte die Konzentration höchstens 1 % (v/v) betragen. Bei jedem Vehikel sollte nachgewiesen werden, dass die verwendete Höchstmenge nicht zytotoxisch ist und keine Auswirkungen auf den Assay hat. Die Referenzstandards und die Kontrollen werden in 100 % Lösungsmittel gelöst und dann in einem EFM auf geeignete Konzentrationen verdünnt.

Zubereitung der Prüfchemikalien

23. Die Referenzstandards und die Kontrollen werden in 100 % DMSO (oder einem anderen geeigneten Lösungsmittel) gelöst und dann in einem EFM auf geeignete Konzentrationen verdünnt. Alle Prüfchemikalien sollten sich vor der Lösung und Verdünnung an die Raumtemperatur anpassen können. Die Lösungen der Prüfchemikalien sollten für jeden Versuch neu zubereitet werden. In den Lösungen sollten kein Niederschlag und keine Trübung zu erkennen sein. Der Referenzstandard und die Kontrollen können in größeren Mengen zubereitet und vorgehalten werden. Der endgültige Referenzstandard, die Verdünnungen der Kontrollen und die Prüfchemikalien sollten jedoch für jeden Versuch frisch zubereitet und innerhalb von 24 Stunden nach der Zubereitung verwendet werden.

Löslichkeit und Zytotoxizität: Hinweise zur Dosisfindung

24. Die Dosisfindungsstudie umfasst serielle Verdünnungen (1:10) mit sieben Verdünnungspunkten, die jeweils zweimal geprüft werden. Zunächst werden die Prüfchemikalien bis zur Höchstkonzentration von 1 mg/ml (~1 mM) beim Agonisten-Assay bzw. von 20 µg/ml (~10 µM) beim Antagonisten-Assay geprüft. Mit den Dosisfindungsstudien werden

— die im Hauptversuch zu verwendenden Ausgangskonzentrationen der Prüfchemikalien und

— die im Hauptversuch zu verwendenden Verdünnungen der Prüfchemikalien (1:2 oder 1:5) ermittelt.

25. Die Prüfprotokolle des Agonisten- und der Antagonisten-Assays umfassen eine Bewertung der Zellviabilität/Zytotoxizität (7) im Rahmen der Dosisfindung und des Hauptversuchs. Die Methode zur Ermittlung der Zytotoxizität zur Bewertung der Zellviabilität bei der Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays (1) bestand in einer skalierten qualitativen visuellen Beobachtung; allerdings kann die Zytotoxizität auch mit einer quantitativen Methode bestimmt werden (siehe Protokoll (7)). Daten aufgrund von Konzentrationen der Prüfchemikalien, bei denen die Viabilität um mehr als 20 % beeinträchtigt wird, können nicht berücksichtigt werden.

Prüfung der chemischen Exposition und Anordnung auf der Assay-Platte

26. Die Zellen werden gezählt und in 96-Well-Gewebekulturplatten (2 x 10^5 Zellen pro Well) in ein EFM gegeben und 24 Stunden inkubiert, damit die Zellen an der Platte anhaften können. Das EFM wird entfernt und durch die Prüf- und Referenzchemikalien im EFM ersetzt und 19-24 Stunden inkubiert. Besondere Aufmerksamkeit ist bei stark flüchtigen Stoffen geboten, da durch benachbarte Kontroll-Wells falsch positive Ergebnisse entstehen können. In diesen Fällen können „Plattenversiegelungen" helfen, die einzelnen Wells während der Prüfung zu isolieren. Dies ist in den betreffenden Fällen zu empfehlen.

Dosisfindungsstudien

27. Bei Dosisfindungsstudien werden alle Wells der 96-Well-Platte verwendet, um bis zu sechs Prüfchemikalien in seriellen Verdünnungen (1:10) mit sieben Verdünnungspunkten jeweils zweimal zu prüfen (siehe Abbildungen 1 und 2).

— Bei der Dosisfindungsstudie für *Agonisten* werden als Referenzstandard vier E2-Konzentrationen (jeweils zwei) und vier Replikat-Wells für die DMSO-Kontrolle verwendet.

— Bei der Dosisfindungsstudie für *Antagonisten* werden als Referenzstandard drei Ral/E2-Konzentrationen mit 9,18 × 10^{-11} M E2 (jeweils zwei) und drei Replikat-Wells für die E2- und die DMSO-Kontrolle verwendet.

Abbildung 1

Anordnung bei Prüfungen zur Dosisfindung bei Agonisten mit einer 96-Well-Platte

	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	VK	VK	VK	VK	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Abkürzungen: E2-1 bis E2-4 = Konzentrationen des E2-Referenzstandards (hoch bis niedrig); TC1-1 bis TC1-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 1 (TC1); TC2-1 bis TC2-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 2 (TC2); TC3-1 bis TC3-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 3 (TC3); TC4-1 bis TC4-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 4 (TC4); TC5-1 bis TC5-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 5 (TC5); TC6-1 bis TC6-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 6 (TC6); VK = Vehikelkontrolle (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Abbildung 2

Anordnung bei Prüfungen zur Dosisfindung bei Antagonisten mit einer 96-Well-Platte

	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	VK	VK	VK	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Abkürzungen: E2 = E2-Kontrolle; Ral-1 bis Ral-3 = Konzentrationen des Raloxifen/E2-Referenzstandards (hoch bis niedrig); TC1-1 bis TC1-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 1 (TC1); TC2-1 bis TC2-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 2 (TC2); TC3-1 bis TC3-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 3 (TC3); TC4-1 bis TC4-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 4 (TC4); TC5-1 bis TC5-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 5 (TC5); TC6-1 bis TC6-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 6 (TC6); VK = Vehikelkontrolle (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Hinweis: Alle Prüfchemikalien werden mit 9,18 × 10-11 M E2 geprüft.

28. Für jedes Well wird ein endgültiges Medienvolumen von 200 µl als erforderlich empfohlen. Für die Prüfung sind ausschließlich Prüfplatten zu verwenden, bei denen die Zellviabilität in allen Wells mindestens 80 % beträgt.

29. Die Bestimmung von Ausgangskonzentrationen für ***Agonisten***-Hauptversuche wird im Protokoll für Agonisten-Assays eingehend beschrieben (7). Dabei sind die folgenden Kriterien zu berücksichtigen:

    — Wenn die Konzentrationskurve der Prüfchemikalie keine Punkte enthält, die über dem Mittelwert zuzüglich der 3-fachen Standardabweichung der DMSO-Kontrolle liegen, wird der Hauptversuch an einer seriellen Verdünnung (1:2) mit 11 Verdünnungspunkten beginnend mit der maximalen löslichen Konzentration vorgenommen.

    — Wenn die Konzentrationskurve der Prüfchemikalie keine Punkte enthält, die über dem Mittelwert zuzüglich der 3-fachen Standardabweichung der DMSO-Kontrolle liegen, sollte die beim Hauptversuch zu verwendende Verdünnungsreihe mit 11 Verdünnungspunkten um eine logarithmische Einheit höher als die Konzentration sein, bei der beim Vorversuch der höchste bereinigte RLU-Wert ermittelt wurde. Die Verdünnungsreihe mit 11 Verdünnungspunkten beruht auf Verdünnungen im Verhältnis 1:2 oder 1:5; das Verdünnungsverhältnis richtet sich nach den folgenden Kriterien:

      Eine serielle Verdünnung im Verhältnis 1:2 mit 11 Verdünnungspunkten sollte verwendet werden, wenn der sich ergebende Konzentrationsbereich das gesamte Spektrum der Reaktionen aufgrund der in der Dosisfindungsstudie ermittelten Konzentrations-Reaktions-Kurve abdeckt. Ansonsten ist eine Verdünnung im Verhältnis 1:5 zu verwenden.

    — Wenn eine Prüfchemikalie in der Dosisfindungsstudie eine biphasige Konzentrations-Reaktions-Kurve ergibt, sollten die beiden Phasen auch im Hauptversuch berücksichtigt werden.

30. Die Bestimmung von Ausgangskonzentrationen für ***Antagonisten***-Hauptversuche wird im Protokoll für Antagonisten-Assays eingehend beschrieben (7). Dabei sind die folgenden Kriterien zu berücksichtigen:

    — Wenn die Konzentrationskurve der Prüfchemikalie keine Punkte enthält, die unter dem Mittelwert abzüglich der 3-fachen Standardabweichung der E2-Kontrolle liegen, wird der Hauptversuch mit einer seriellen Verdünnung (1:2) mit 11 Verdünnungspunkten beginnend mit der maximalen löslichen Konzentration vorgenommen.

— Wenn die Konzentrationskurve der Prüfchemikalie keine Punkte enthält, die unter dem Mittelwert abzüglich der 3-fachen Standardabweichung der E2-Kontrolle liegen, sollte beim Hauptversuch für die Verdünnungsreihe mit 11 Verdünnungspunkten eine der folgenden Ausgangskonzentrationen verwendet werden:

• die Konzentration mit dem niedrigsten angepassten RLU-Wert bei der Dosisfindung,

• die maximal lösliche Konzentration (siehe Protokoll zum Antagonisten-Assay (7), Abbildung 14-2),

• die niedrigste zytotoxische Konzentration (Beispiel siehe Antagonisten-Protokoll (7), Abbildung 14-3).

— Die Verdünnungsreihe mit 11 Verdünnungspunkten beruht auf Verdünnungen im Verhältnis 1:2 oder 1:5; das Verdünnungsverhältnis richtet sich nach den folgenden Kriterien:

Eine serielle Verdünnung im Verhältnis 1:2 mit 11 Verdünnungspunkten sollte verwendet werden, wenn der sich ergebende Konzentrationsbereich das gesamte Spektrum der Reaktionen aufgrund der in der Dosisfindungsstudie ermittelten Konzentrations-Reaktions-Kurve abdeckt. Ansonsten sollte eine Verdünnung im Verhältnis 1:5 verwendet werden.

Hauptversuche

31. Ein Hauptversuch besteht aus seriellen Verdünnungen mit 11 Verdünnungspunkten (je nach Ausgangskonzentration für die Kriterien des Hauptversuchs entweder 1:2 oder 1:5), wobei jede Konzentration an drei Wells der 96-Well-Platte zu prüfen ist (siehe Abbildungen 3 und 4).

— Bei den *Agonisten*-Hauptversuchen wird E2 in 11 Konzentrationen jeweils zweifach als Referenzstandard geprüft. Jede Platte enthält 4 Replikat-Wells mit der DMSO-Kontrolle und 4 Replikat-Wells mit der Methoxychlor-Kontrolle ($9{,}06 \times 10^{-6}$ M).

— Bei den *Antagonisten*-Hauptversuchen werden Ral/E2 in 9 Konzentrationen mit $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 jeweils zweifach als Referenzstandard, 4 Replikat-Wells mit der $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 als Kontrolle, 4 Replikat-Wells als DMSO-Kontrolle und 4 Replikat-Wells mit $3{,}36 \times 10^{-6}$ M Tamoxifen geprüft.

Abbildung 3

Anordnung bei Agonisten-Hauptversuchen mit 96-Well-Platten

	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	VK
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VK
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VK
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VK
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

Abkürzungen: TC1-1 bis TC1-11 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 1; TC2-1 bis TC2-11 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 2; E2-1 bis E2-11 = Konzentrationen des E2-Referenzstandards (hoch bis niedrig); Meth = p,p'-Methoxychlor, schwach positive Kontrolle; VK = DMSO (1 % v/v) EFM Vehikelkontrolle.

Abbildung 4

Anordnung bei Antagonisten-Hauptversuchen mit 96-Well-Platten

	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	VK
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VK
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VK
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VK
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

Abkürzungen: E2 = E2-Kontrolle; Ral-1 bis Ral-9 = Konzentrationen des Raloxifen-/E2-Referenzstandards (hoch bis niedrig); Tam = Tamoxifen/E2, schwach positive Kontrolle; TC1-1 bis TC1-11 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 1 (TC1); TC2-1 bis TC2-11 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 2 (TC2); VK = Vehikelkontrolle (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Hinweis: Alle Referenz- und alle Prüf-Wells enthalten jeweils E2 in einer bestimmten Konzentration ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M).

32. Um unabhängige Ergebnisse sicherzustellen, sollten die Hauptversuche zur Prüfung der Chemikalien an unterschiedlichen Tagen wiederholt werden. In jedem Fall sollten mindestens zwei Hauptversuche durchgeführt werden. Wenn die Prüfergebnisse einander widersprechen (z. B. eine positives und ein negatives Ergebnis) oder wenn eine der durchgeführten Prüfungen nicht berücksichtigt werden kann, sollte eine dritte Prüfung durchgeführt werden.

Messung der Luminiszenz

33. Die Luminiszenz wird im Bereich von 300-650 nm mit einem Injektionsluminometer und einer Software zur Steuerung des Injektionsvolumens und des Messintervalls gemessen (7). Die Lichtemission der einzelnen Wells wird in RLU pro Well angegeben.

ANALYSE DER DATEN

Bestimmung von EC_{50} /IC_{50}

34. Aus den Konzentrations-Reaktions-Daten werden der EC_{50}-Wert (die Hälfte der maximalen Wirkungskonzentration einer Prüfchemikalie [Agonisten]) und der IC_{50}-Wert (die Hälfte der maximalen Hemmkonzentration einer Prüfchemikalie [Antagonisten]) bestimmt. Bei Prüfchemikalien, die in einer oder mehreren Konzentrationen positiv bewertet wurden, wird die Konzentration, die die Hälfte der maximalen Wirkung auslöst, (IC_{50} bzw. EC_{50}) mit einer Hill-Funktion oder mit einer geeigneten alternativen Funktion berechnet. Die Hill-Funktion ist ein logistisches mathematisches Modell mit vier Parametern, bei dem die Konzentration einer Prüfchemikalie mit der folgenden Formel in Bezug zu einer Wirkung (die gewöhnlich einer Sigmoidkurve folgt) gesetzt wird:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)HillSlope}$$

Dabei gilt:

Y = Wirkung (d. h. RLU-Werte),

X = Logarithmus der Konzentration,

Bottom = Mindestwirkung,

Top = maximale Wirkung,

lg EC_{50} (bzw. lg IC_{50}) = Logarithmus von X als Mittelwert der Mindestwirkung und der maximalen Wirkung und

Hillslope = Steilheit der Kurve.

Mit dem Modell wird die beste Anpassung (best fit) für die Parameter Top, Bottom, Hillslope, und IC_{50} und EC_{50} ermittelt. Für die Berechnung der EC_{50}- und der IC_{50}-Werte sollte eine geeignete Statistik-Software verwendet werden (z. B. Graphpad Prism®).

Bestimmung von Ausreißern

35. Eine fundierte statistische Bewertung könnte (u. a.) durch die Einbeziehung des Q-Tests (siehe Protokolle zum Agonisten- und zum Antagonisten-Assay (7)) zur Ermittlung nicht verwendbarer und aus der Datenanalyse auszuschließender Wells erleichtert werden.

36. Beim E2-Referenzstandard (zwei Proben) werden alle angepassten RLU-Werte eines Replikat-Wells bei einer bestimmten E2-Konzentration als Ausreißer betrachtet, bei denen der Wert mehr als 20 % über oder unter dem angepassten RLU-Wert dieser Konzentration in der Datenbank der historischen Daten liegt.

Erfassung und Anpassung von Luminometer-Daten für die Dosisfindungsstudie

37. Die Rohdaten des Luminometers werden in ein Tabellenformular für den Assay übertragen. Dabei sollte geprüft werden, ob die Daten auszuschließende Ausreißer beinhalten (siehe Akzeptanzkriterien der Prüfung in Bezug auf die in den Analysen ermittelten Parameter). Folgende Berechnungen sind durchzuführen:

Agonisten

Schritt 1 Der Mittelwert der DMSO-Vehikelkontrolle (VK) wird berechnet.

Schritt 2 Der Mittelwert der DMSO-VK wird vom Wert jedes einzelnen Wells abgezogen, um die Daten zu normalisieren.

Schritt 3 Für den Referenzstandard (E2) wird die mittlere n-fache Induktion ermittelt.

Schritt 4 Für die Prüfchemikalien wird der mittlere EC_{50}-Wert ermittelt.

Antagonisten

Schritt 1 Der Mittelwert der DMSO-VK wird berechnet.

Schritt 2 Der Mittelwert der DMSO-VK wird vom Wert jedes einzelnen Wells abgezogen, um die Daten zu normalisieren.

Schritt 3 Für den Referenzstandard (E2) wird die mittlere n-fache Reduktion ermittelt.

Schritt 4 Der Mittelwert des E2-Referenzstandards wird berechnet.

Schritt 5 Für die Prüfchemikalien wird der mittlere IC_{50}-Wert ermittelt.

Erfassung und Anpassung von Luminometer-Daten für Hauptversuche

38. Die Rohdaten des Luminometers werden in ein Tabellenformular für den Assay übertragen. Dabei sollte geprüft werden, ob die Daten auszuschließende Ausreißer beinhalten (siehe Akzeptanzkriterien der Prüfung in Bezug auf die in den Analysen ermittelten Parameter). Folgende Berechnungen sind durchzuführen:

Agonisten

Schritt 1 Der Mittelwert der DMSO-VK wird berechnet.

Schritt 2 Der Mittelwert der DMSO-VK wird vom Wert jedes einzelnen Wells abgezogen, um die Daten zu normalisieren.

Schritt 3 Für den Referenzstandard (E2) wird die mittlere n-fache Induktion ermittelt.

Schritt 4 Für die Prüfchemikalien wird der mittlere EC_{50}-Wert ermittelt.

Schritt 5 Für Methoxychlor wird der mittlere angepasste RLU-Wert berechnet.

Antagonisten

Schritt 1 Der Mittelwert der DMSO-VK wird berechnet.

Schritt 2 Der Mittelwert der DMSO-VK wird vom Wert jedes einzelnen Wells abgezogen, um die Daten zu normalisieren.

Schritt 3 Für den Referenzstandard (Ral/E2) wird die mittlere n-fache Induktion ermittelt.

Schritt 4 Für Ral/E2 und für die Prüfchemikalien wird der mittlere IC_{50}-Wert ermittelt.

Schritt 5 Für Tamoxifen wird der mittlere angepasste RLU-Wert berechnet.

Schritt 6 Der Mittelwert des E2-Referenzstandards wird berechnet.

Kriterien für die Auswertung von Daten

39. Der VM7Luc-ER-TA-Assay soll im Rahmen einer Beweiskraftermittlung die Priorisierung von Stoffen für die *In-vivo*-Prüfung von ED unterstützen. In diesem Verfahren werden die Prüfchemikalien hinsichtlich der Aktivität von ER-Agonisten oder -Antagonisten als positiv oder negativ eingestuft. Die Kriterien für die Einstufung als positiv oder negativ in der Studie zur Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays werden in Tabelle 1 beschrieben:

Tabelle 1

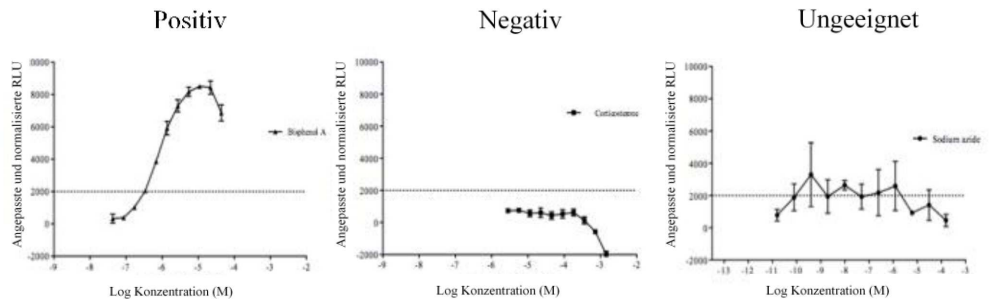
Kriterien für die Einstufung als positiv oder als negativ

AGONISTEN-AKTIVITÄT	
Positiv	— Bei allen hinsichtlich der ER-Agonisten-Aktivität als *positiv* eingestuften Prüfchemikalien sollte die Konzentrations-Reaktions-Kurve eine Basislinie gefolgt von einer positiven Steigung aufweisen und in einem Plateau oder einem Peak schließen. Manchmal sind vielleicht nur zwei dieser Merkmale (Basislinie – positive Steigung oder positive Steigung – Peak) ausgeprägt. — Der Kurvenverlauf im Bereich der positiven Steigung sollte mindestens drei Punkte mit einander nicht überschneidenden Fehlerbalken enthalten (Mittelwert ± SD). Die Punkte auf der Basislinie werden nicht berücksichtigt. Der lineare Verlauf der Kurve kann jedoch den Peak oder den ersten Punkt des Plateaus beinhalten. — Eine Einstufung als positiv setzt eine bestimmte Reaktionsamplitude voraus, d. h. eine Differenz zwischen Basislinie und Peak von mindestens 20 % des maximalen Wertes beim Referenzstandard E2 (mindestens 2 000 RLU, wenn der maximale Reaktionswert der Referenzstandards [E2] auf 10 000 RLU angepasst wurde). — Nach Möglichkeit sollte für jede positiv eingestufte Prüfchemikalie ein EC_{50}-Wert berechnet werden.
Negativ	Der mittlere angepasste RLU-Wert einer bestimmten Konzentration entspricht höchstens dem mittleren RLU-Wert der DMSO-Kontrolle zuzüglich der 3-fachen Standardabweichung des DMSO-RLU-Werts.
Ungeeignet	Daten, die aufgrund erheblicher qualitativer oder quantitativer Einschränkungen nicht als gültig zum Nachweis des Vorliegens oder des Fehlens einer Aktivität akzeptiert werden können, sind als ungeeignet zu betrachten und können für die Entscheidung, ob eine Prüfchemikalie als positiv oder als negativ einzustufen ist, nicht herangezogen werden. In diesen Fällen sollten die betreffenden Chemikalien nochmals geprüft werden.
ANTAGONISTEN-AKTIVITÄT	
Positiv	— Die Prüfchemikalie ergibt eine Konzentrations-Reaktions-Kurve bestehend aus einer Basislinie mit anschließender negativer Steigung. — Der Kurvenverlauf im Bereich der negativen Steigung sollte mindestens drei Punkte mit einander nicht überschneidenden Fehlerbalken enthalten. Die Punkte auf der Basislinie werden nicht berücksichtigt. Der lineare Bereich der Kurve kann jedoch den ersten Punkt des Plateaus enthalten. — Die Aktivität des Werts der maximalen Reaktion beim Referenzstandard Ral/E2 sollte um mindestens 20 % reduziert werden (d. h. auf höchstens 8 000 RLU, wenn der Wert der maximalen Reaktion des Referenzstandards [Ral/E2] auf 10 000 RLU angepasst wurde). — Die höchsten nicht zytotoxischen Konzentrationen der Prüfchemikalie sollten höchstens $1x10^{-5}$ M betragen. — Nach Möglichkeit sollte für jede positiv eingestufte Prüfchemikalie ein IC_{50}-Wert berechnet werden.
Negativ	Alle Datenpunkte liegen bei Konzentrationen unter $1,0 \times 10^{-5}$ M über dem EC_{80}-Wert (80 % der E2-Rektion oder 8 000 RLU).
Ungeeignet	Daten, die aufgrund erheblicher qualitativer oder quantitativer Einschränkungen nicht als gültig zum Nachweis des Vorliegens oder des Fehlens einer Aktivität akzeptiert werden können, sind als ungeeignet zu betrachten und können für die Entscheidung, ob eine Prüfchemikalie als positiv oder als negativ einzustufen ist, nicht herangezogen werden. In diesen Fällen sollten die betreffenden Chemikalien nochmals geprüft werden.

40. Positive Ergebnisse werden möglichst sowohl durch die Größenordnung der Wirkung als auch durch die Konzentration beschrieben, bei der die Wirkung eintritt. Den Abbildungen 5 und 6 sind Beispiele für als positiv, negativ und nicht geeignet zu bewertende Daten zu entnehmen.

Abbildung 5

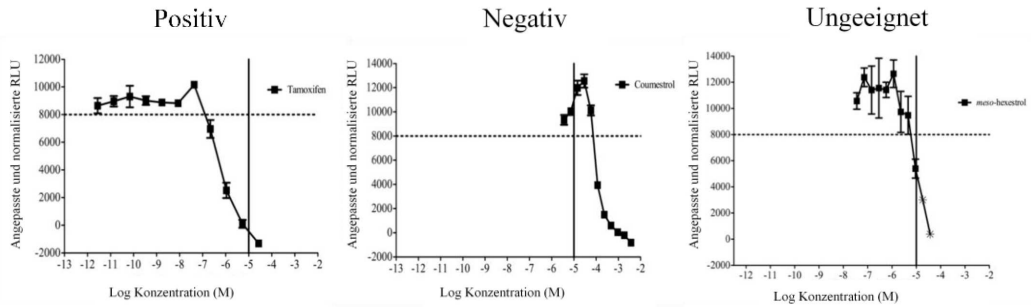
Beispiele Agonisten: Als positiv, negativ und nicht geeignet zu bewertende Daten



Die gestrichelte Linie bezeichnet 20 % der E2-Reaktion, 2 000 angepasste und normalisierte RLU-Werte.

Abbildung 6

Beispiele Antagonisten: Als positiv, negativ und nicht geeignet zu bewertende Daten



Die gestrichelte Linie bezeichnet 80 % der Ral/E2-Reaktion, 8 000 angepasste und normalisierte RLU-Werte.

Die durchgehende Linie bezeichnet die Konzentration 1,00 x 10^{-5} M. Eine als positiv einzustufende Reaktion sollte bei Konzentrationen unter 1,00 x 10^{-5} M unter der 8 000-RLU-Linie liegen.

Bei mit einem Sternchen gekennzeichneten Konzentrationen im meso-Hexestrol-Diagramm liegt die Viabilität bei mindestens 2.

Die Prüfergebnisse für meso-Hexestrol werden als nicht geeignete Daten betrachtet, da die einzige Reaktion unter 8 000 RLU bei einer Konzentration von 1,00 x 10^{-5} M erfolgt.

41. Die Berechnung der EC_{50}- und der IC_{50}-Werte kann mit einer Hill-Funktion mit vier Parametern vorgenommen werden (siehe Protokolle zu Agonisten- und Antagonisten-Assays (7)). Die Erfüllung der Akzeptanzkriterien deutet darauf hin, dass das System ordnungsgemäß funktioniert. Dies gewährleistet jedoch nicht, dass ein bestimmter Prüflauf tatsächlich exakte Daten ergibt. Die Wiederholung der Ergebnisse des ersten Prüflaufs ist die beste Bestätigung dafür, dass exakte Daten ermittelt wurden (siehe Nummer 19 im Abschnitt „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“).

PRÜFBERICHT

42. Siehe Nummer 20 im Abschnitt „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“.

LITERATUR

(1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, J. Cell Biochem., 82(3): 467-479.

(3) Pujol P., *et al*. (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer Res., 58(23): 5367-5373.

(4) Weihua Z., *et al*. (2000). Estrogen Receptor (ER) β, a Modulator of ERα in the Uterus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(11): 936-5941.

(5) Balls M., *et al*. (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), ALTEX, 23(Suppl): S 270-273.

(6) Coecke, S., u. a. (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: S. 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., u. a. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. *Pharmacol*., 71(10):1459-1469.

(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):646-657.

(11) Kuiper, G.G, u. a. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology,139(10):4252-4263.

(12) Geisinger u. a. (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(13) Baldwin u. a. (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., u. a. (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. und Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors:development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenicand anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

ANLAGE 4

ASSAY ZUR TRANSAKTIVIERUNG DES STABIL TRANSFIZIERTEN HUMANEN ÖSTROGENREZEPTORS A ZUM NACHWEIS DER WIRKUNG VON CHEMIKALIEN AUF ÖSTROGEN-AGONISTEN UND -ANTAGONISTEN MIT DER ERA-CALUX-ZELLLINIE

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

1. Beim ERα-CALUX-Transaktivierungs-Assay wird die humane U2OS-Zelllinie zum Nachweis einer durch den humanen Östrogenrezeptor α (hERα) vermittelten Östrogen-Agonisten- und -Antagonisten-Aktivität verwendet. In der Studie zur Validierung des ERα-CALUX-Bioassays mit stabil transfiziertem ERα durch BioDetection Systems BV (Amsterdam, Niederlande) wurden die Relevanz und die Zuverlässigkeit des Assays für den vorgesehenen Zweck nachgewiesen (1). Die ERα-CALUX-Zelllinie exprimiert ausschließlich den humanen ERα (2) (3),

2. Dieser Assay wurde speziell zum Nachweis von hERα und einer durch hERα vermittelten Transaktivierung anhand einer Messung der Bioluminiszenz als Endpunkt entwickelt. In Anbetracht des hohen Signal-Rausch-Verhältnisses ist bei Bioassays die Berücksichtigung der Bioluminiszenz allgemein üblich (4).

3. Bei Phytoöstrogen-Konzentrationen von mehr als 1 μM wurde eine Überaktivierung des Luciferase-Reportergens mit der Folge einer nicht durch den Rezeptor vermittelten Lumineszenz festgestellt (5) (6) (7). Daher müssen höhere Konzentrationen von Phytoöstrogenen oder ähnlichen Verbindungen sorgfältig untersucht werden, die bei Transaktivierungs-Assays mit stabil transfiziertem ER zu einer Überaktivierung der Luciferase-Expression führen können (siehe Anlage 2).

4. Vor der Verwendung dieses Assays für rechtliche Zwecke sollten die Abschnitte „ALLGEMEINE EINLEITUNG“ und „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“ gelesen werden. Die in der vorliegenden Prüfmethode verwendeten Begriffe und Abkürzungen werden in Anlage 1 erläutert.

PRINZIP DES ASSAYS (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

5. Mit dem Bioassay werden ER-Liganden-Bindungen nach einer Translokation des Rezeptor-Liganden-Komplexes an den Zellkern bewertet. Im Zellkern bindet der Rezeptor-Liganden-Komplex spezifische DNA-Response-Elemente und transaktiviert ein Leuchtkäfer-Luciferase-Reporter-Gen. Dies führt zu einer verstärkten zellulären Expression des Luciferase-Enzyms. Nach der Zugabe des Luciferase-Substrats Luciferin wird das Luciferin in ein bioluminezierendes Produkt umgewandelt. Das emittierte Licht kann mit einem Luminometer leicht erkannt und gemessen werden.

6. Für das Prüfsystem werden stabil transfizierte ERα-CALUX-Zellen verwendet. Die ERα-CALUX-Zellen stammen aus der humanen Osteoblasten-Osteosarkom-Zelllinie U2OS. Die humanen U2OS-Zellen wurden durch Copräzipitation mit Calciumphosphat mit 3xHRE-TATA-Luc und pSG5-neo-hERα stabil transfiziert. Die U2OS-Zelllinie wurde als am besten geeignete Responsive-Reporter-Zelllinie für Östrogen (und andere Steroidhormone) ausgewählt, da diese Zelllinie nur eine geringe bzw. keinerlei endogene Rezeptor-Aktivität entwickelte. Das Fehlen endogener Rezeptoren wurde nur mit Luciferase-Reporter-Plasmiden geprüft, bei denen nach Zugabe von Rezeptor-Liganden keine Aktivität festgestellt werden konnte. Außerdem stimulierte diese Zelllinie starke hormonvermittelte Reaktionen bei vorübergehender Zugabe verwandter Rezeptoren (2) (3) (8).

7. Die Prüfung von Chemikalien auf eine östrogene bzw. antiöstrogene Aktivität mit der ERα-CALUX-Zelllinie besteht aus einem Vorversuch mit anschließenden Hauptversuchen. Im Vorversuch werden die Löslichkeit, die Zytotoxizität und ein engerer Konzentrationsbereich von Prüfchemikalien für den Hauptversuch ermittelt. Bei den Hauptversuchen werden die engeren Konzentrationsbereiche der Prüfchemikalien zunächst mit den ERα-CALUX-Bioassays untersucht. Anschließend erfolgt die Einstufung der Prüfchemikalien aufgrund ihrer Wirkung als Agonisten oder Antagonisten.

8. Kriterien für die Auswertung der Daten werden in Nummer 59 eingehend beschrieben. Eine Prüfchemikalie wird kurz gesagt dann als Agonist eingestuft, wenn zwei aufeinander folgende Konzentrationen der Prüfchemikalie eine Reaktion induzieren, die größer oder gleich 10 % der maximalen Reaktion des Referenzstandards 17β-Estradiol (PC_{10}) ist. Entsprechend wird eine Prüfchemikalie als Antagonist eingestuft, wenn zwei aufeinander folgende Konzentrationen der Prüfchemikalie eine Reaktion induzieren, die kleiner oder gleich 80 % der maximalen Reaktion des Referenzstandards Tamoxifen (PC_{80}) ist.

VERFAHREN

Zelllinien

9. Für den Assay sollte die stabil transfizierte U2OS-ERα-CALUX-Zelllinie verwendet werden. Die Zelllinie kann nach Maßgabe einer technischen Lizenzvereinbarung von BioDetection Systems BV, Amsterdam, Niederlande, bezogen werden.

10. Für die Prüfung sollten ausschließlich mycoplasmafreie Zellkulturen verwendet werden. Die zu verwendenden Zellchargen sollten entweder in Bezug auf Mycoplasma-Kontaminationen als negativ zertifiziert sein oder vor der Verwendung auf Mycoplasma untersucht werden. Die RT-PCR (Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion) sollte für den empfindlichen Nachweis einer Mycoplasma-Infektion verwendet werden (9).

Stabilität der Zelllinie

11. Um die Stabilität und die Integrität der CALUX-Zellen zu erhalten, sollten die Zellen in flüssigem Stickstoff (bei -80 ^{0}C) aufbewahrt werden. Nach dem Auftauen der Zellen zum Ansetzen einer neuen Kultur sollten die Zellen mindestens zweimal subkultiviert werden, bevor sie zur Bewertung der Agonisten- bzw. Antagonisten-Aktivität von Chemikalien verwendet werden. Die Subkultivierung sollte sich auf höchstens 30 Passagen beschränken.

12. Zur Überwachung der Stabilität der Zelllinie sollte die Empfindlichkeit des Systems zur Prüfung der Agonisten- bzw. Antagonisten-Wirkung anhand der EC_{50}- bzw. der IC_{50}-Werte des Referenzstandards untersucht werden. Außerdem sollten die relative Induktion der Positivkontrollprobe (PK) und der Negativkontrollprobe (NK) überwacht werden. Die Ergebnisse sollten mit den Akzeptanzkriterien des ERα-CALUX-Bioassays zur Untersuchung der Agonisten- (Tabelle 3C) bzw. der Antagonisten-Wirkung (Tabelle 4C) übereinstimmen. Die Referenzstandards sowie die Positiv- und die Negativkontrollen für Agonisten und Antagonisten sind in den Tabellen 1 und 2 angegeben.

Bedingungen für die Haltung der Zellkulturen und für die Plattierung

13. Die U2OS-Zellen sollten im Nährmedium (DMEM/F12 (1:1) mit Phenolrot als pH-Indikator ergänzt um fetales Rinderserum (7,5 %), nicht essentielle Aminosäuren (1 %), 10 Einheiten/ml Penicillin, Streptomycin und Geneticin (G-418) als Selektionsmarker) kultiviert werden. Anschließend werden die Zellen bei 37 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit in einem CO_2-Inkubator (5 % CO_2) inkubiert. Wenn die Zellen eine Konfluenz von 85-95 % erreicht haben, werden sie entweder subkultiviert oder zum Überimpfen in 96-Well-Mikrotiterplatten vorbereitet. Im letztgenannten Fall sind $1x10^5$ Zellen/ml im östrogenfreien Assay-Medium (DMEM/F12 (1:1) (ohne Phenolrot und ergänzt um mit dextranbeschichteter Aktivkohle behandeltes fetales Rinderserum (5 % v/v), nicht essentielle Aminosäuren (1 % v/v) und 10 Einheiten/ml Penicillin und Streptomycin) neu zu suspendieren und in die Wells der 96-Well-Mikrotiterplatten (100 µl homogenisierte Zellsuspension) zu plattieren. Vor der Exposition werden die Zellen 24 Stunden in einem CO_2-Inkubator (5 % CO_2, 37 ^{0}C, 100 % Luftfeuchtigkeit) vorinkubiert. Verwendetes Kunststoffmaterial muss östrogenfrei sein.

Akzeptanzkriterien

14. Die Agonisten- und die Antagonisten-Aktivität der Prüfchemikalie(n) werden in Prüfreihen untersucht. Eine Prüfreihe umfasst höchstens 6 Mikrotiterplatten. Jede Prüfreihe beinhaltet mindestens eine vollständige Verdünnungsreihe eines Referenzstandards, eine Positivkontrollprobe, eine Negativkontrollprobe und Lösungsmittelkontrollen. In den Abbildungen 1 und 2 ist die Anordnung auf den Platten für Prüfreihen zur Ermittlung der Agonisten- bzw. Antagonisten-Aktivität dargestellt.

15. Jede Verdünnung der Referenzstandards, der Prüfchemikalien und aller Lösungsmittelkontrollen sowie alle Positiv- und alle Negativkontrollen sollten jeweils dreimal untersucht werden. Jede der drei Untersuchungen sollte die in den Tabellen 3A und 4A genannten Anforderungen erfüllen.

16. Bei allen Prüfreihen wird jeweils auf der ersten Platte eine vollständige Verdünnungsreihe des Referenzstandards (17β-Estradiol für Agonisten und Tamoxifen für Antagonisten) gemessen. Um die Ergebnisse der Untersuchungen der übrigen 5 Mikrotiterplatten mit den Ergebnissen der ersten Mikrotiterplatte mit der vollständigen Konzentrations-Reaktions-Kurve des Referenzstandards vergleichen zu können, sollten alle Platten 3 Kontrollproben enthalten: die Lösungsmittelkontrolle, die höchste geprüfte Konzentration des Referenzstandards und die ungefähre EC_{50}- (Agonisten) bzw. IC_{50}-Konzentration (Antagonisten) des Referenzstandards. Das Verhältnis der durchschnittlichen Kontrollproben auf der ersten Platte und den übrigen 5 Platten sollte die Anforderungen in Tabelle 3C (Agonisten) bzw. in Tabelle 4C (Antagonisten) erfüllen.

17. Für jede der Mikrotiterplatten einer Prüfreihe wird der z-Faktor berechnet (10). Die Berechnung des z-Faktors ist anhand der Reaktionen bei der höchsten und bei der niedrigsten Konzentration des Referenzstandards vorzunehmen. Eine Mikrotiterplatte ist dann gültig, wenn sie die Anforderungen in Tabelle 3C (Agonisten) bzw. in Tabelle 4C (Antagonisten) erfüllt.

18. Die Dosis-Reaktions-Kurve des Referenzstandards muss sigmoidal verlaufen. Die aus der Reaktion der Verdünnungsreihe des Referenzstandards abgeleiteten EC_{50}- bzw. IC_{50}-Werte sollten die Anforderungen in Tabelle 3C (Agonisten) bzw. Tabelle 4C (Antagonisten) erfüllen.

19. Jede Prüfreihe sollte mindestens eine Positivkontrollprobe und eine Negativkontrollprobe enthalten. Die berechnete relative Induktion der Positiv- und der Negativkontrollprobe sollte die Anforderungen in Tabelle 3C (Agonisten) bzw. in Tabelle 4C (Antagonisten) erfüllen.

20. Bei allen Messungen wird der Induktionsfaktor der höchsten Konzentration des Referenzstandards gemessen, indem der höchste mittlere RLU-Wert des 17β-Estradiol-Referenzstandards durch den mittleren RLU-Wert der Referenz-Lösungsmittelkontrolle geteilt wird. Dieser Induktionsfaktor sollte die Mindestanforderungen für die n-fache Induktion in Tabelle 3C (Agonisten) bzw. in Tabelle 4C (Antagonisten) erfüllen.

21. Nur Mikrotiterplatten, die alle oben genannten Akzeptanzkriterien erfüllen, werden als gültig betrachtet und können zur Bewertung der Reaktion der Prüfchemikalien berücksichtigt werden.

22. Die Akzeptanzkriterien gelten sowohl für Vorversuche als auch für die Hauptversuche.

Tabelle 1

Konzentrationen des Referenzstandards, der Positivkontrolle (PK) und der Negativkontrolle (NK) beim CALUX-Antagonisten-Bioassay

	Stoff	CAS-Nr.	Prüfbereich (M)
Referenzstandard	17β-Estradiol	50-28-2	$1*10^{-13}$ - $1*10^{-10}$
Positivkontrolle (PK)	17α-Methyltestosteron	58-18-4	$3*10^{-6}$
Negativkontrolle (NK)	Corticosteron	50-22-6	$1*10^{-8}$

Tabelle 2

Konzentrationen des Referenzstandards, der Positivkontrolle (PK) und der Negativkontrolle (NK) beim CALUX-Agonisten-Bioassay

	Stoff	CAS-Nr.	Prüfbereich (M)
Referenzstandard	Tamoxifen	10540-29-1	$3*10^{-9}$ - $1*10^{-5}$
Positivkontrolle (PK)	4-Hydroxytamoxifen	68047-06-3	$1*10^{-9}$
Negativkontrolle (NK)	Resveratrol	501-36-0	$1*10^{-5}$

Tabelle 3

Akzeptanzkriterien des ERα-CALUX-Agonisten-Bioassays

	A – einzelne Proben auf einer Platte	**Kriterium**
1	Maximale %SD bei 3 Wells (NK und PK sowie alle Verdünnungen der Prüfchemikalie und des Referenzstandards außer C0)	< 15 %
2	Maximale %SD bei 3 Wells (Referenzstandard und Lösungsmittelkontrollen der Prüfchemikalie (C0, SC))	< 30 %
3	Maximale LDH-Freisetzung als Maß der Zytotoxizität	< 120 %
	B – innerhalb einer einzelnen Mikrotiterplatte	
4	Verhältnis der Lösungsmittelkontrolle des Referenzstandards (C0, Platte 1) und der Lösungsmittelkontrolle der Prüfchemikalie (SC, Platten 2 bis x)	0,5 bis 2,0
5	Verhältnis zwischen der ungefähren EC_{50} und den höchsten Konzentrationen des Referenzstandards auf Platte 1 und der ungefähren EC_50 und den höchsten Konzentrationen des Referenzstandards auf den Platten 2 bis x (C4, C8)	0,70 bis 1,30
6	z-Faktor der einzelnen Platten	> 0,6
	C – innerhalb einer Untersuchungsreihe (alle Platten einer Reihe)	
7	Sigmoidkurve des Referenzstandards	Ja (17ß-Estradiol)
8	EC50-Bereich des Referenzstandards 17ß-Estradiol	$4*10^{-12}$ – $4*10^{-11}$ M
9	Geringste n-fache Induktion der höchsten 17ß-Estradiol-Konzentration bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle des Referenzstandards	5
10	Relative Induktion (%) PK	> 30 %
11	Relative Induktion (%) NK	< 10 %

PK: Positivkontrolle; NK: Negativkontrolle; SC: Lösungsmittelkontrolle der Prüfchemikalie; C0: Lösungsmittelkontrolle des Referenzstandards; SD: Standardabweichung; LDH: Laktatdehydrogenase

Tabelle 4

Akzeptanzkriterien des ERα-CALUX-Antagonisten-Bioassays

A – einzelne Proben auf einer Platte		**Kriterium**
1	Maximale %SD bei 3 Wells (NK und PK sowie alle Verdünnungen der Prüfchemikalie und des Referenzstandards, Lösungsmittelkontrolle (C0))	< 15 %
2	Maximale %SD bei 3 Wells (Vehikelkontrolle (VK) und höchste Konzentration des Referenzstandards (C8))	< 30 %
3	Maximale LDH-Freisetzung als Maß der Zytotoxizität	< 120 %
B – innerhalb einer einzelnen Mikrotiterplatte		
4	Verhältnis der Lösungsmittelkontrolle des Referenzstandards (C0, Platte 1) und der Lösungsmittelkontrolle der Prüfchemikalie (SC, Platten 2 bis x)	0,70 bis 1,30
5	Verhältnis zwischen der ungefähren IC_{50}-Konzentrationen des Referenzstandards auf Platte 1 und den ungefähren IC_{50}-Konzentrationen des Referenzstandards auf den Platten 2 bis x (C8)	0,70 bis 1,30
6	Verhältnis der höchsten Konzentrationen des Referenzstandards auf Platte 1 und den höchsten Konzentrationen des Referenzstandards auf den Platten 2 bis x (C8)	0,50 bis 2,0
7	z-Faktor der einzelnen Platten	> 0,6
C – innerhalb einer Untersuchungsreihe (alle Platten einer Reihe)		
8	Sigmoidkurve des Referenzstandards	Ja (Tamoxifen)
9	IC_{50}-Bereich des Referenzstandards (Tamoxifen)	$1*10^{-8}$ - $1*10^{-7}$ M
10	Niedrigste n-fache Induktion der Lösungsmittelkontrolle des Referenzstandards in Bezug auf die höchste Tamoxifen-Konzentration	2,5
11	Relative Induktion (%) PK	< 70 %
12	Relative Induktion (%) NK	< 85 %

PK: Positivkontrolle; NK: Negativkontrolle; VK: Vehikelkontrolle (Lösungsmittelkontrolle ohne feste Konzentration des Agonisten-Referenzstandards); SC: Lösungsmittelkontrolle der Prüfchemikalie; C0: Lösungsmittelkontrolle des Referenzstandards; SD: Standardabweichung; LDH: Laktatdehydrogenase

Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle, Referenzstandards, Positivkontrollen, Negativkontrollen

23. Sowohl für den Vorversuch als auch für die Hauptversuche sollten die gleichen Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen, Referenzstandards, Positivkontrollen und Negativkontrollen verwendet werden. Außerdem sollte die Konzentration von Referenzstandards, Positivkontrollen und Negativkontrollen identisch sein.

Lösungsmittelkontrolle

24. Das zur Auflösung einer Prüfchemikalie verwendete Lösungsmittel sollte als Lösungsmittelkontrolle geprüft werden. Bei der Validierung des ERα-CALUX-Bioassays wurde Dimethylsulfoxid (DMSO, 1 % (v/v); CASRN 67-68-5) als Vehikel verwendet. Wenn ein anderes Vehikel als DMSO verwendet wird, sollten alle Referenzstandards, Kontrollen und Prüfchemikalien mit diesem Vehikel geprüft werden. Dabei ist zu beachten, dass die Lösungsmittelkontrolle bei den Agonisten-Untersuchungen den Agonisten-Referenzstandard 17β-Estradiol in einer bestimmten Konzentration (etwa EC_{50}) enthält. Zur Untersuchung des bei Antagonisten-Assays zu verwendenden Lösungsmittels sollte eine Vehikelkontrolle zubereitet und geprüft werden.

Vehikelkontrolle (Antagonisten)

25. Dabei ist zu beachten, dass zum Assay-Medium der Agonisten-Referenzstandard 17β-Estradiol in einer bestimmten Konzentration (etwa EC_{50}) hinzugegeben wurde. Um das zur Lösung der Prüfchemikalien für Antagonisten zu verwendende Lösungsmittel zu prüfen, ist ein Assay-Medium ohne bestimmte Konzentration des Agonisten-Referenzstandards 17β-Estradiol zuzubereiten. Diese Kontrollprobe wird als Vehikelkontrolle bezeichnet. Bei der Validierung des ERα-CALUX-Bioassays wurde Dimethylsulfoxid (DMSO, 1 % (v/v); CASRN 67-68-5) als Vehikel verwendet. Wenn ein anderes Vehikel als DMSO verwendet wird, sollten alle Referenzstandards, Kontrollen und Prüfchemikalien mit diesem Vehikel geprüft werden.

Referenzstandards

26. Der Referenzstandard für Agonisten ist 17β-Estradiol (Tabelle 1). Die Referenzstandards umfassen eine Verdünnungsreihe mit 17β-Estradiol in acht Konzentrationen ($1*10^{-13}$, $3*10^{-13}$, $1*10^{-12}$, $3*10^{-12}$, $6*10^{-12}$, $1*10^{-11}$, $3*10^{-11}$ und $1*10^{-10}$ M).

27. Der Referenzstandard für Antagonisten ist Tamoxifen (Tabelle 2). Die Referenzstandards umfassen eine Verdünnungsreihe mit Tamoxifen in acht Konzentrationen ($3*10^{-9}$, $1*10^{-8}$, $3*10^{-8}$, $1*10^{-7}$, $3*10^{-7}$, $1*10^{-6}$, $3*10^{-6}$ und $1*10^{-5}$ M). Jede der Konzentrationen des Antagonisten-Referenzstandards wird parallel mit einer bestimmten Konzentration des Agonisten-Referenzstandards 17β-Estradiol ($3*10^{-12}$ M) inkubiert.

Positivkontrolle

28. Als Positivkontrolle für Agonisten-Assays wird 17α-Methyltestosteron verwendet (Tabelle 1).

29. Die Positivkontrolle für Antagonisten-Assays besteht aus 4-Hydroxytamoxifen (Tabelle 2). Die Antagonisten-Positivkontrolle wird parallel mit einer bestimmten Konzentration des Agonisten-Referenzstandards 17β-Estradiol ($3*10^{-12}$ M) inkubiert.

Negativkontrolle

30. Als Negativkontrolle für Agonisten-Assays wird Corticosteron verwendet (Tabelle 1).

31. Die Negativkontrolle für Antagonisten-Assays besteht aus Resveratrol (Tabelle 2). Die Antagonisten-Negativkontrolle wird parallel mit einer bestimmten Konzentration des Agonisten-Referenzstandards 17β-Estradiol ($3*10^{-12}$ M) inkubiert.

Zum Nachweis der Eignung des Labors siehe Nummer 14 und Tabellen 3 und 4 im Abschnitt „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“ bei dieser Prüfmethode.

Vehikel

32. Das Vehikel zur Lösung von Prüfchemikalien sollte die Prüfchemikalien vollständig auflösen und sich mit dem Zellmedium mischen. Geeignete Lösungsmittel sind DMSO, Wasser und Ethanol (mit einer Reinheit 95-100 %). Wenn DMSO als Lösungsmittel verwendet wird, sollte die maximale DMSO-Konzentration nicht mehr als 1 % (v/v) betragen. Vor der Verwendung sollte in einer Prüfung sichergestellt werden, dass das Lösungsmittel nicht zytotoxisch wirkt und die Durchführung des Assays nicht beeinflusst.

Zubereitung der Referenzstandards, Positivkontrollen, Negativkontrollen und Prüfchemikalien

33. Referenzstandards, Positivkontrollen, Negativkontrollen und Prüfchemikalien werden in 100 % DMSO (oder einem sonstigen geeigneten Lösungsmittel) gelöst. Anschließend werden von diesem Lösungsmittel geeignete (serielle) Verdünnungen zubereitet. Vor der Lösung sollten sich alle Stoffe an die Raumtemperatur anpassen können. Frisch zubereitete Vorratslösungen der Referenzstandards, der Positivkontrollen, der Negativkontrollen und der Prüfchemikalien sollten keine erkennbaren Niederschläge oder Trübungen aufweisen. Vorräte des Referenzstandards und der Kontrollen können in größeren Mengen zubereitet werden. Vorratslösungen der Prüfchemikalien sollten für jeden Versuch frisch zubereitet werden. Endverdünnungen von Referenzstandards, Positivkontrollen, Negativkontrollen und Prüfchemikalien sollten für jeden Versuch frisch zubereitet und innerhalb von 24 Stunden nach der Zubereitung verwendet werden.

Löslichkeit, Zytotoxizität und Dosisfindung

34. Beim Vorversuch wird die Löslichkeit der Prüfchemikalien im gewählten Lösungsmittel bestimmt. Für den Versuch wird eine Vorratslösung mit einer Konzentration von maximal 0,1 M zubereitet. Bei Lösungsproblemen bei dieser Konzentration sollten Vorratslösungen mit niedrigeren Konzentrationen zubereitet werden, bis die Prüfchemikalien vollständig gelöst sind. Beim Vorversuch werden serielle Verdünnungen der Prüfchemikalie im Verhältnis 1:10 untersucht. Bei der Prüfung von Agonisten und Antagonisten liegt die maximale Assay-Konzentration bei 1 mM. Nach dem Vorversuch wird ein geeigneter angepasster Konzentrationsbereich für die Prüfchemikalien ermittelt, der dann bei den Hauptversuchen zu untersuchen ist. Für Hauptversuche sollten folgende Verdünnungen verwendet werden: 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x und 3000x.

35. Im Protokoll des Agonisten- und des Antagonisten-Assays ist eine Zytotoxizitätsprüfung vorgesehen (11). Die Zytotoxizitätsprüfung ist Bestandteil sowohl des Vorversuchs als auch der Hauptversuche. Bei der Validierung des ERα-CALUX-Bioassays wurde die Zytotoxizität nach der Exposition gegenüber den Prüfchemikalien anhand einer Untersuchung auf freigesetzte Laktatdehydrogenase (LDH) in Verbindung mit einer qualitativen visuellen Prüfung der Zellen (siehe Anlage 4.1) bewertet. Andere quantitative Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität (z. B. eine auf Tetrazolium beruhende kolorimetrische (MTT-)Prüfung oder ein CALUX-Bioassay zur Zytotoxizitätsprüfung) können aber ebenfalls zur Anwendung kommen. Im Allgemeinen werden Konzentrationen von Prüfchemikalien, die die Zellviabilität um mehr als 20 % beeinträchtigen, als zytotoxisch betrachtet und können bei der Auswertung der Daten daher nicht berücksichtigt werden. Bei der Untersuchung auf freigesetztes LDH ist die jeweilige Konzentration der Prüfchemikalie dann als zytotoxisch zu betrachten, wenn der Anteil des freigesetzten LDH mehr als 120 % beträgt.

Prüfung der chemischen Exposition und Anordnung auf der Assay-Platte

36. Nach der Trypsinierung eines Fläschchens konfluenter kultivierter Zellen werden die Zellen mit einer Konzentration von $1x10^5$ Zellen/ml in einem östrogenfreien Assay-Medium resuspendiert. 100 µl resuspendierte Zellen werden in die inneren Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte resuspendiert. In die äußeren Wells werden 200 µl Phosphatpuffer (PBS) gegeben (siehe Abbildungen 1 und 2). Die plattierten Zellen werden 24 Stunden in einem CO_2-Inkubator (5 % CO_2, 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit) vorinkubiert.

37. Nach der Vorinkubierung werden die Platten auf sichtbare Anzeichen von Zytotoxizität (siehe Anlage 4.1) sowie auf Kontaminationen und auf Konfluenz untersucht. Nur Platten ohne sichtbare Anzeichen für eine Zytotoxizität und für Kontaminationen sowie Platten mit einer Konfluenz von mindestens 85 % werden für die Versuche verwendet. Das Medium aus den inneren Wells wird vorsichtig entnommen und durch 200 µl östrogenfreies Assay-Medium mit geeigneten seriellen Verdünnungen von Referenzstandards, Prüfchemikalien, Positivkontrollen, Negativkontrollen und

Lösungsmittelkontrollen ersetzt (Tabelle 5: Agonisten-Assays; Tabelle 6: Antagonisten-Assays). Alle Referenzstandards, Prüfchemikalien, Positivkontrollen, Negativkontrollen und Lösungsmittelkontrollen werden dreimal geprüft. In Abbildung 1 ist die Anordnung auf der Platte bei Agonisten-Assays dargestellt. Abbildung 2 ist die Anordnung auf der Platte bei Antagonisten-Assays zu entnehmen. Die Anordnung auf den Platten beim Vorversuch und beim Hauptversuch ist identisch. Bei der Untersuchung von Agonisten enthalten alle inneren Wells mit Ausnahme der Wells mit der Vehikelkontrolle (VK) auch eine bestimmte Konzentration des Agonisten-Referenzstandards 17β-Estradiol ($3*10^{-12}$ M). Auf alle Platten mit der Prüfchemikalie (TC) sollten auch die Referenzstandards C8 und C4 gegeben werden.

38. Nachdem die Zellen allen Chemikalien ausgesetzt wurden, werden die 96-Well-Mikrotiterplatten weitere 24 Stunden in einem CO_2-Inkubator (5 % CO_2, 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert.

Abbildung 1

Anordnung auf der 96-Well-Mikrotiterplatte für Vorversuche und für die endgültige Bewertung der Agonisten-Wirkung

Platte 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PK	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PK	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PK	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NK:	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NK:	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NK:	
H												

Folgende Platten

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC_{50})	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC_{50})	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC_{50})	
H												

C0 = Lösungsmittel Referenzstandard

C(1-8) = Verdünnungsreihe (1-8, niedrige bis hohe Konzentrationen) des Referenzstandards

PK = Positivkontrolle

NK = Negativkontrolle

TCx-(1-8) = Verdünnungen (1-8, niedrige bis hohe Konzentrationen) der Prüfchemikalie für den Vorversuch und für die Bewertung der Agonisten-Wirkung der Prüfchemikalie x.

SC = Lösungsmittelkontrolle der Prüfchemikalie (möglichst desselben Lösungsmittels wie bei C0, wobei dies aber aus einer anderen Charge stammen kann)

Graue Zellen: = Äußere Wells, aufgefüllt mit 200 µl PBS

Abbildung 2

Anordnung auf der 96-Well-Mikrotiterplatte für Vor- und Hauptversuche zur Bewertung der Antagonisten-Wirkung

Platte 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VK	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VK	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VK	
E		NK:	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PK	
F		NK:	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-		
G		NK:	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PK	
H												

Folgende Platten

	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									
E		C4 (IC_{50})	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC_{50})	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC_{50})	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = Lösungsmittel Referenzstandard

C(1-8) = Verdünnungsreihe (1-8, niedrige bis hohe Konzentrationen) des Referenzstandards

NK = Negativkontrolle

PK = Positivkontrolle

TCx-(1-8) = Verdünnungen (1-8, niedrige bis hohe Konzentrationen) der Prüfchemikalie für den Vorversuch und für die Bewertung der Agonisten-Wirkung der Prüfchemikalie x.

SC = Lösungsmittelkontrolle der Prüfchemikalie (möglichst desselben Lösungsmittels wie bei C0, wobei dies aber aus einer anderen Charge stammen kann)

VK = Vehikelkontrolle (Lösungsmittelkontrolle ohne feste Konzentration des Agonisten-Referenzstandards 17β-Estradiol).

Graue Zellen: = Äußere Wells, aufgefüllt mit 200 µl PBS

Hinweis: Die inneren Wells mit Ausnahme der Wells mit der Vehikelkontrolle (VK) enthalten alle auch eine bestimmte Konzentration des Agonisten-Referenzstandards 17β-Estradiol ($3{,}0*10^{-12}$ M).

Messung der Luminiszenz

39. Die Messung der Luminiszenz wird im Protokoll zum Agonisten- und zum Atagonisten-Assay (10) eingehend beschrieben. Das Medium wird aus den Wells entnommen. Nach 24-stündiger Inkuation werden die Zellen lysiert, um die Zellmembran aufzuschließen und die Luciferase-Aktivität messen zu können.

40. Zur Messung der Luminiszenz wird für dieses Verfahren ein Luminometer mit zwei Injektoren benötigt. Die Luciferase-Reaktion wird durch Injektion des Luciferinsubstrats induziert. Durch Zugabe von 0,2 M NaOH wird die Reaktion gestoppt. Dadurch werden Luminiszenzübertragungen zwischen den Wells verhindert.

41. Das von den einzelnen Wells emittierte Licht wird in RLU (relativen Lichteinheiten) pro Well ausgedrückt.

Vorversuch

42. Anhand der Vorversuche wird ein optimierter Konzentrationsbereich der Prüfchemikalien für den Hauptversuch ermittelt. Die Auswertung der Ergebnisse des Vorversuchs und die Ermittlung des optimierten Konzentrationsbereichs der Prüfchemikalien für den Hauptversuch werden eingehend im Protokoll zum Agonisten- und zum Antagonisten-Assay (10) beschrieben. Im Folgenden werden die Verfahren zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs der Prüfchemikalien für die Agonisten- und die Antagonisten-Prüfung beschrieben. Informationen zur Gestaltung der Verdünnungsreihen sind den Tabellen 5 und 6 zu entnehmen.

Auswahl von Konzentrationen zur Bewertung agonistischer Wirkungen

43. Im Vorversuch sollten die Prüfchemikalien mit den in den Tabellen 5 (Agonisten) und 6 (Antagonisten) genannten Verdünnungen geprüft werden. Alle Konzentrationen sind in drei Wells zu prüfen, die auf den Platten angeordnet werden, wie in Abbildung 1 (Agonisten) bzw. Abbildung 2 (Antagonisten) beschrieben.

44. Nur Untersuchungsergebnisse, die die in Tabelle 3 genannten Akzeptanzkriterien erfüllen, werden als gültig betrachtet und können zur Bewertung der Reaktion der Prüfchemikalien berücksichtigt werden. Wenn bei einer Untersuchung eine oder mehrere Mikrotiterplatten die Akzeptanzkriterien nicht erfüllen, sollten die betreffenden Mikrotiterplatten nochmals geprüft werden. Erfüllt die erste Platte mit der vollständigen Verdünnungsreihe des Referenzstandards die Akzeptanzkriterien nicht, muss die gesamte Prüfreihe (6 Platten) neu geprüft werden.

45. In folgenden Fällen sollten die Ausgangskonzentrationsbereiche der Prüfchemikalien angepasst und der Vorversuch wiederholt werden:

— In der Prüfung wurde eine zytotoxische Wirkung festgestellt. Der Vorversuch sollte mit niedrigeren nicht zytotoxischen Konzentrationen der Prüfchemikalie wiederholt werden.

— Im Vorversuch mit der Prüfchemikalie wurde keine vollständige Dosis-Reaktions-Kurve ermittelt, weil bei den geprüften Konzentrationen bereits die maximale Induktion erreicht wird. Der Vorversuch sollte mit niedrigeren Konzentrationen der Prüfchemikalie wiederholt werden.

46. Wenn eine gültige dosisabhängige Reaktion festgestellt wird, sollte die (niedrigste) Konzentration mit maximaler Induktion, aber ohne Anzeichen einer Zytotoxizität, gewählt werden. Die in den Hauptversuchen zu prüfende höchste Konzentration der Prüfchemikalie wird dreimal mit dieser gewählten Konzentration geprüft.

47. Beginnend mit der oben ermittelten maximalen Konzentration wird eine vollständige optimierte Verdünnungsreihe der Prüfchemikalie mit den in Tabelle 5 angegebenen Verdünnungsschritten zubereitet.

48. Prüfchemikalien, bei denen keine agonistische Wirkung festgestellt wurde, werden in den Hauptversuchen beginnend mit der im Vorversuch ermittelten maximalen nicht zytotoxischen Konzentration geprüft.

Auswahl von Konzentrationen zur Bewertung antagonistischer Wirkungen

49. Nur Untersuchungsergebnisse, die die in Tabelle 4 genannten Akzeptanzkriterien erfüllen, werden als gültig betrachtet und können zur Bewertung der Reaktion der Prüfchemikalien berücksichtigt werden. Wenn bei einer Untersuchung eine oder mehrere Mikrotiterplatten die Akzeptanzkriterien nicht erfüllen, sollten die betreffenden Mikrotiterplatten nochmals geprüft werden. Erfüllt die erste Platte mit der vollständigen Verdünnungsreihe des Referenzstandards die Akzeptanzkriterien nicht, muss die gesamte Prüfreihe (6 Platten) neu geprüft werden.

50. In folgenden Fällen sollten die Ausgangskonzentrationsbereiche der Prüfchemikalien angepasst und der Vorversuch wiederholt werden:

— In der Prüfung wurde eine zytotoxische Wirkung festgestellt. Der Vorversuch sollte mit niedrigeren nicht zytotoxischen Konzentrationen der Prüfchemikalie wiederholt werden.

— Im Vorversuch mit der Prüfchemikalie wurde keine vollständige Dosis-Reaktions-Kurve ermittelt, weil bei den geprüften Konzentrationen bereits die maximale Hemmung erreicht wird. Der Vorversuch sollte mit niedrigeren Konzentrationen der Prüfchemikalie wiederholt werden.

51. Wenn eine gültige dosisabhängige Reaktion festgestellt wird, sollte die (niedrigste) Konzentration mit maximaler Hemmung, aber ohne Anzeichen einer Zytotoxizität, gewählt werden. Die in den Hauptversuchen zu prüfende höchste Konzentration der Prüfchemikalie wird dreimal mit dieser gewählten Konzentration geprüft.

52. Beginnend mit der oben ermittelten maximalen Konzentration wird eine vollständige optimierte Verdünnungsreihe der Prüfchemikalie mit den in Tabelle 6 angegebenen Verdünnungsschritten zubereitet.

53. Prüfchemikalien, bei denen keine antagonistische Wirkung festgestellt wurde, werden in den Hauptversuchen beginnend mit der im Vorversuch geprüften maximalen nicht zytotoxischen Konzentration geprüft.

Hauptversuche

54. Nach der Bestimmung der optimalen Konzentrationsbereiche sollten die Prüfchemikalien mit den in den Tabellen 5 (Agonisten) und 6 (Antagonisten) genannten Verdünnungen geprüft werden. Alle Konzentrationen sind in drei Wells zu prüfen, die auf den Platten angeordnet werden, wie in Abbildung 1 (Agonisten) bzw. Abbildung 2 (Antagonisten) beschrieben.

55. Nur Untersuchungsergebnisse, die die in den Tabellen 3 und 4 genannten Akzeptanzkriterien erfüllen, werden als gültig betrachtet und können zur Bewertung der Reaktion der Prüfchemikalien berücksichtigt werden. Wenn bei einer Untersuchung eine oder mehrere Mikrotiterplatten die Akzeptanzkriterien nicht erfüllen, sollten die betreffenden Mikrotiterplatten nochmals geprüft werden. Erfüllt die erste Platte mit der vollständigen Verdünnungsreihe des Referenzstandards die Akzeptanzkriterien nicht, muss die gesamte Prüfreihe (6 Platten) neu geprüft werden.

Tabelle 5

Konzentrationen und Verdünnungen von Referenzstandards, Kontrollen und Prüfchemikalien für die Agonisten-Prüfung

Referenzstandard 17β-Estradiol		TCx – Vorversuch		TCx – Vorversuch		Kontrollen	
Konz. (M)		Verdünnung		Verdünnung		Konz. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PK	$3*10^{-6}$
C1	$1*10^{-13}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1*10^{-8}$
C2	$3*10^{-13}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$1*10^{-12}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$3*10^{-12}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$6*10^{-12}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1*10^{-11}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3*10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1*10^{-10}$						

TCx –Prüfchemikalie x
PK –Positivkontrolle (17α-Methyltestosteron)
NK –Negativkontrolle (Corticosteron)
C0 –Lösungsmittelkontrolle Referenzstandard
SC –Lösungsmittelkontrolle Prüfchemikalie

Tabelle 6

Konzentrationen und Verdünnungen von Referenzstandards, Kontrollen und Prüfchemikalien für die Antagonisten-Prüfung

Referenzstandard Tamoxifen		TCx – Vorversuch		TCx – Vorversuch		Kontrollen	
Konz. (M)		Verdünnung		Verdünnung		Konz. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PK	$1*10^{-9}$
C1	$3*10^{-9}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NK	$1*10^{-5}$
C2	$1*10^{-8}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3*10^{-8}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1*10^{-7}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3*10^{-7}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Hinzugegebener Agonist**	
C6	$1*10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**Konz. (M)**	
C7	$3*10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-Estradiol	$3*10^{-12}$
C8	$1*10^{-5}$						

TCx –Prüfchemikalie x
PK –Positivkontrolle (4-Hydroxytamoxifen)
NK –Negativkontrolle (Resveratrol)
C0 –Lösungsmittelkontrolle Referenzstandard
SC –Lösungsmittelkontrolle Prüfchemikalie
VK –Vehikelkontrolle (enthält keine bestimmte Konzentration des Agonisten-Referenzstandards 17β-Estradiol ($3,0*10^{-12}$ M))

Erfassung und Auswertung der Daten

56. Nach dem Vorversuch und dem Hauptversuch sollten EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50} und die maximale Induktion (TCx_{max}) der Prüfchemikalien für Agonisten-Prüfungen ermittelt werden. Bei Antagonisten-Prüfungen sollten IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50} und die niedrigste Induktion (TCx_{min}) berechnet werden. In den Abbildungen 3 (Agonisten) und 4 (Antagonisten) werden diese Parameter grafisch dargestellt. Die benötigten Parameter werden ausgehend von der relativen Induktion der einzelnen Prüfchemikalien (bezogen auf die maximale Induktion des Referenzstandards (= 100 %) berechnet. Zur Auswertung der Daten wird eine nicht lineare Regression (variable Steigung, 4 Parameter) mit der folgenden Formel vorgenommen.

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{(1 + 10^{(lgEC_{50} - X) * Hill\ Slope})}$$

Dabei gilt:

X = Logarithmus der Dosis bzw. Konzentration

Y = Reaktion (relative Induktion (%))

Top = Maximale Induktion (%)

Bottom = Niedrigste Induktion (%)

$LogEC_{50}$ = Logarithmus der Konzentration, bei der 50 % der maximalen Reaktion beobachtet werden

HillSlope = Steigungsfaktor oder Hillslope

57. Die Rohdaten des Luminometers in RLU (relative Lichteinheiten) werden in die Tabelle zur Analyse der Daten der Vorversuche und der Hauptversuche übertragen. Die Rohdaten sollten die in den Tabellen 3A und 3B (Agonisten) und 4A und 4B (Antagonisten) genannten Akzeptanzkriterien erfüllen. Wenn die Rohdaten die Akzeptanzkriterien erfüllen, werden mit den folgenden Schritten die benötigten Parameter berechnet:

Agonisten

— Die durchschnittlichen RLU der Lösungsmittelkontrolle des Referenzstandards werden von den Rohdaten der Untersuchung der Referenzstandards abgezogen.

— Die durchschnittlichen RLU der Lösungsmittelkontrolle der Prüfchemikalie werden von den Rohdaten der Untersuchung der Prüfchemikalien abgezogen.

— Die relative Induktion der einzelnen Konzentrationen des Referenzstandards wird berechnet. Die Induktion der höchsten Konzentration des Referenzstandards wird als 100 % angenommen.

— Die relative Induktion der einzelnen Konzentrationen der Prüfchemikalie wird in Bezug zur höchsten Konzentration des als 100 % angenommenen Referenzstandards gesetzt.

— Die Untersuchungsergebnisse werden durch nicht lineare Regression (variable Steigung, 4 Parameter) berechnet.

— EC_{50} und EC_{10} des Referenzstandards werden berechnet.

— EC_{50} und EC_{10} der Prüfchemikalien werden berechnet.

— Die maximale relative Induktion der Prüfchemikalie (TC_{max}) wird berechnet.

— PC_{10} und PC_{50} der Prüfchemikalien werden berechnet.

Bei Prüfchemikalien kann infolge einer bestehenden Zytotoxizität oder aufgrund von Löslichkeitsproblemen möglicherweise nicht immer eine vollständige Dosis-Reaktions-Kurve dargestellt werden. In diesen Fällen können EC_{50}, EC_{10} und PC_{50} nicht bestimmt werden, und die Darstellung beschränkt sich auf PC_{10} und TC_{max}.

Antagonisten

— Die durchschnittlichen RLU der höchsten Konzentration des Referenzstandards werden von den Rohdaten der Untersuchung der Referenzstandards abgezogen.

— Die durchschnittlichen RLU der höchsten Konzentration des Referenzstandards werden von den Rohdaten der Untersuchung der Prüfchemikalien abgezogen.

— Die relative Induktion der einzelnen Konzentrationen des Referenzstandards wird berechnet. Die Induktion der niedrigsten Konzentration des Referenzstandards wird als 100 % angenommen.

— Die relative Induktion der einzelnen Konzentrationen der Prüfchemikalie wird in Bezug zur niedrigsten Konzentration des als 100 % angenommenen Referenzstandards gesetzt.

— Die Untersuchungsergebnisse werden durch nicht lineare Regression (variable Steigung, 4 Parameter) berechnet.

— IC_{50} und IC_{20} des Referenzstandards werden berechnet.

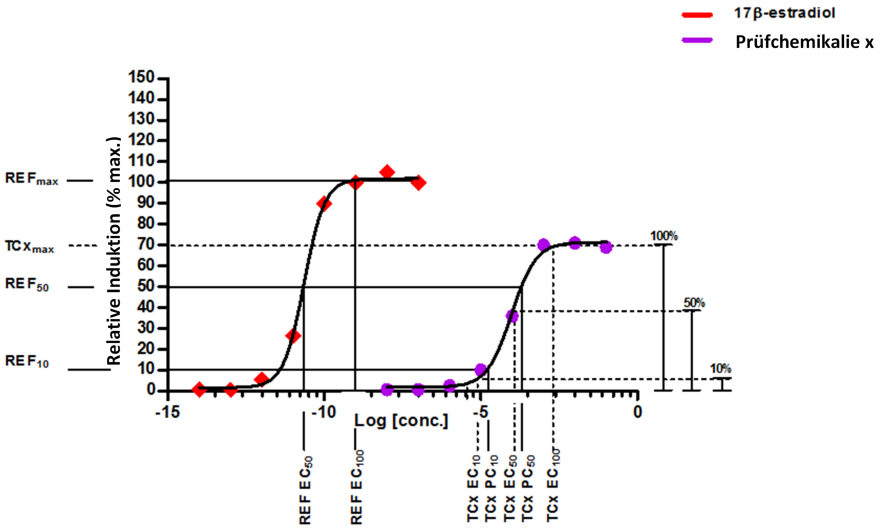
— IC_{50} und IC_{20} der Prüfchemikalien werden berechnet.

— Die niedrigste relative Induktion der Prüfchemikalie (TC_{max}) wird berechnet.

— PC_{80} und PC_{50} der Prüfchemikalien werden berechnet.

Abbildung 3

Im Agonisten-Assay bestimmte Parameter



EC_{10} = Konzentration eines Stoffs, bei der 10 % seiner maximalen Reaktion beobachtet werden

EC_{50} = Konzentration eines Stoffs, bei der 50 % seiner maximalen Reaktion beobachtet werden

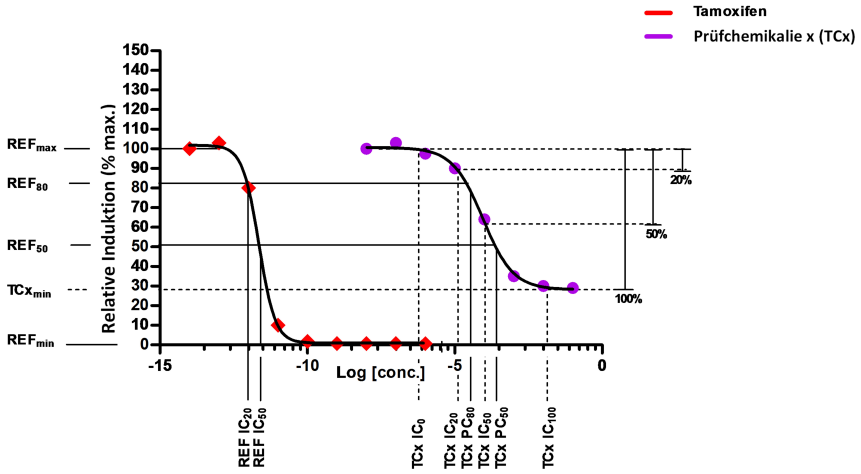
PC_{10} = Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der deren Reaktion EC_{10} des Referenzstandards entspricht

PC_{50} = Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der deren Reaktion EC_{50} des Referenzstandards entspricht

TCx_{max} = maximale relative Induktion der Prüfchemikalie

Abbildung 4

Im Antagonisten-Assay bestimmte Parameter



IC_{20} = Konzentration eines Stoffs, bei der 80 % seiner maximalen Reaktion (Hemmung 20 %) beobachtet werden

IC_{50} = Konzentration eines Stoffs, bei der 50 % seiner maximalen Reaktion (Hemmung 50 %) beobachtet werden

PC_{80} = Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der deren Reaktion IC_{20} des Referenzstandards entspricht

PC_{50} = Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der deren Reaktion IC_{50} des Referenzstandards entspricht

TCx_{min} = niedrigste relative Induktion der Prüfchemikalie

Bei Prüfchemikalien kann infolge einer bestehenden Zytotoxizität oder aufgrund von Löslichkeitsproblemen möglicherweise nicht immer eine vollständige Dosis-Reaktions-Kurve dargestellt werden. In diesen Fällen können IC_{50}, IC_{20} und PC_{50} nicht bestimmt werden, und die Darstellung beschränkt sich auf PC_{20} und TC_{min}.

58. Die Ergebnisse sollten auf zwei (oder drei) unabhängigen Prüfläufen beruhen. Wenn bei zwei Prüfläufen vergleichbare und daher auch reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden, ist ein dritter Prüflauf nicht erforderlich. Ergebnisse können dann akzeptiert werden, wenn die folgenden Anforderungen erfüllt sind:

— Die Ergebnisse erfüllen die Akzeptanzkriterien (Nummern 14-22)

— und sind reproduzierbar.

Kriterien für die Auswertung von Daten

59. Bei der Auswertung der Daten und der Einstufung einer Prüfchemikalie als positiv oder negativ sind die folgenden Kriterien zu berücksichtigen:

Agonisten

Bei jedem Hauptversuch wird eine Prüfchemikalie als **positiv** betrachtet, wenn die folgenden Bedingungen erfüllt sind:

1 TC_{max} ist größer oder gleich 10 % der maximalen Reaktion des Referenzstandards (REF_{10}).

2 Mindestens 2 aufeinander folgende Konzentrationen der Prüfchemikalie sind größer oder gleich REF_{10}.

Bei jedem Hauptversuch wird eine Prüfchemikalie als **negativ** betrachtet, wenn die folgenden Bedingungen erfüllt sind:

1 TC_{max} beträgt nicht mehr als 10 % der maximalen Reaktion des Referenzstandards (REF_{10}).

2 Weniger als 2 aufeinander folgende Konzentrationen der Prüfchemikalie sind größer oder gleich REF_{10}.

Antagonisten

Bei jedem Hauptversuch wird eine Prüfchemikalie als **positiv** betrachtet, wenn die folgenden Bedingungen erfüllt sind:

1 TC_{min} ist kleiner oder gleich 80 % der maximalen Reaktion des Referenzstandards (REF_{80} = Hemmung 20 %).

2 Mindestens 2 aufeinander folgende Konzentrationen der Prüfchemikalie sind kleiner oder gleich REF_{80}.

Bei jedem Hauptversuch wird eine Prüfchemikalie als **negativ** betrachtet, wenn die folgenden Bedingungen erfüllt sind:

1 TC_{min} ist größer als 80 % der maximalen Reaktion des Referenzstandards (REF_{80} = Hemmung 20 %).

2 Weniger als 2 aufeinander folgende Konzentrationen der Prüfchemikalie sind kleiner oder gleich REF_{80}.

60. Zur Beschreibung der Wirkung der positiven Reaktion einer Prüfchemikalie sollten die Wirkstärke (Agonisten: TC_{max}; Antagonisten: TC_{min}) und die Konzentration angegeben werden, bei der die Wirkung eintritt (Agonisten: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}; Antagonisten: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}).

PRÜFBERICHT

61. Siehe Nummer 20 im Abschnitt „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS".

LITERATUR

(1) OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ERα CALUX bioassay – transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(2) Sonneveld, E., Jansen, H.J., Riteco, J.A., 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, M.E., van den Brink, C.E., Wissink, S., Schreurs, R.H.M.M., Gustafsson, J.A., van der Saag, P.T. und van der Burg, B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER)α and not through ERβ. *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.

(4) Thorne, N, Inglese, J. und Auld, D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology17(6):646-657.

(5) Escande, A., Pillon, A., Servant, N., Cravedi, J.P., Larrea, F., Muhn, P., Nicolas, J.C., Cavaillès, V. und 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, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B. und Gustafsson, J.A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

(7) Sotoca, A.M., Bovee, T.F.H., Brand, W., Velikova, N., Boeren, S., Murk, A.J., Vervoort, J., Rietjens, I.M.C.M. (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, J.A.C., Jansen, H.J., Pieterse, B., Brouwer, A., Schoonen, W.G. und 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.

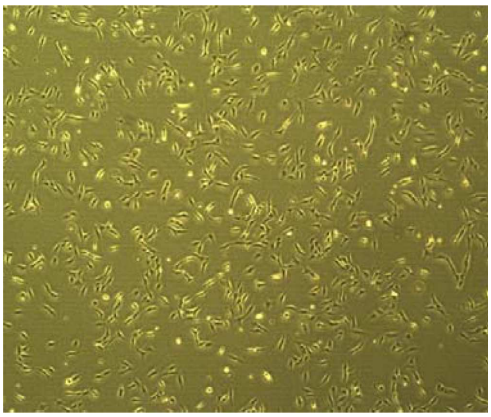
(9) Kobayashi, H., Yamamoto, K., Eguchi, M., Kubo, M., Nakagami, S., Wakisaka, S., Kaizuka, M. und Ishii, H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.,* 57(4), 769-771.

(10) Zhang, J.-H., Chung,T.D.Y. und Oldenburg, K.R. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays. J. Biomol. Sci., 4, 67-73.

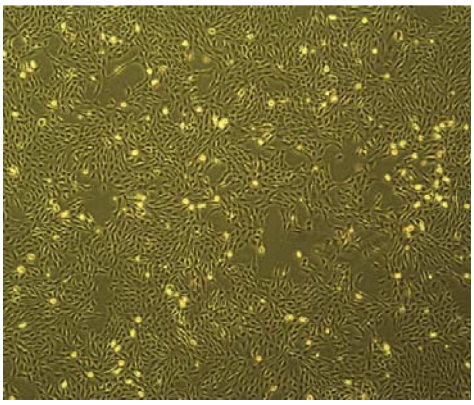
(11) Besselink, H., Middelhof, I. und Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, Niederlande.

Anlage 4.1

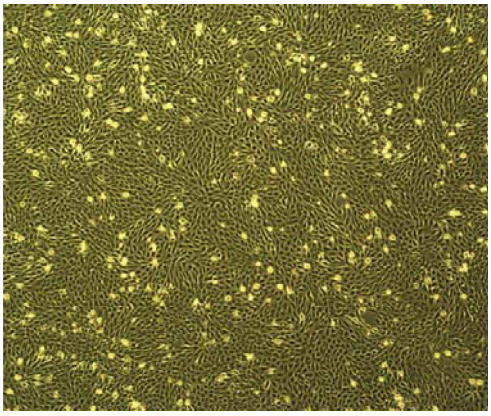
VISUELLE PRÜFUNG DER ZELLVIABILITÄT



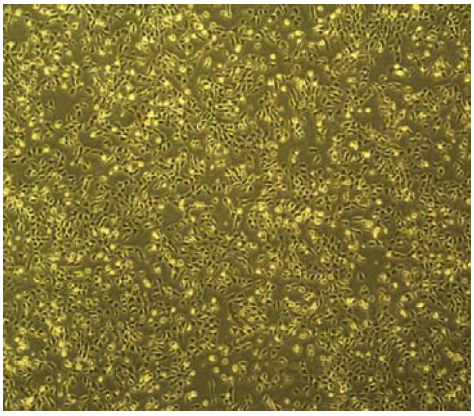
<5 % Konfluenz Die Zellen wurden gerade geimpft. Zellviabilität 100 % Einstufung: „Keine Zytotoxizität“



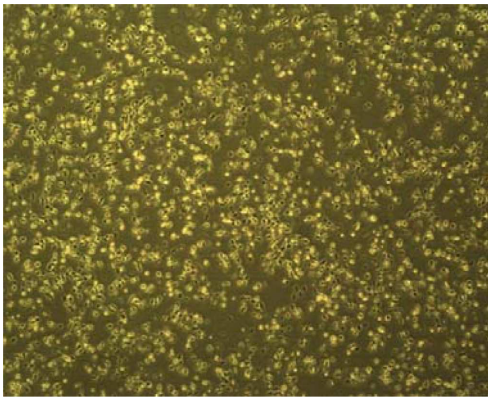
Konfluenz > 85 % In diesem Stadium erfolgt die Exposition der Zellen gegenüber der Prüfchemikalie. Zellviabilität > 95 %
Einstufung: „Keine Zytotoxizität“



Konfluenz > 95 % Die Zellen sind dicht gepackt und beginnen zu überwachsen. Zellviabilität > 95 %
Einstufung: „Keine Zytotoxizität“



Zellviabilität < 25 % Die Zellen lösen sich, und der Kontakt zwischen den Zellen wird geringer. Die Zellen runden sich ab. Einstufung: „Zytotoxizität“



Zellviabilität < 5 %. Die Zellen sind vollständig abgelöst, und der Kontakt zwischen den Zellen ist unterbrochen. Die Zellen runden sich ab. Einstufung: „Zytotoxizität“

B.67 *IN-VITRO*-GENMUTATIONSPRÜFUNG AN SÄUGETIERZELLEN ANHAND DES THYMIDINKINASE-GENS

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode (PM) entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 490 (2016). Die Prüfmethoden werden regelmäßig geprüft und überarbeitet, um dem wissenschaftlichen Fortschritt, den rechtlichen Anforderungen und den Belangen des Tierschutzes gerecht zu werden. Der Maus-Lymphom-Assay (MLA) und die TK6-Prüfung mit dem Thymidinkinase-Lokus (TK-Lokus) waren ursprünglich Bestandteil der Prüfmethode B.17. Die MLA Expert Workgroup des Internationalen Workshops für Genotoxizitätsprüfungen (International Workshop on Genotoxicity Testing, IWGT) hat später jedoch international harmonisierte Empfehlungen zu Akzeptanzkriterien für den Assay und zur Auswertung der Daten des MLA entwickelt (1) (2) (3) (4) (5). Diese Empfehlungen wurden in dieser neuen Prüfmethode B.67 berücksichtigt. Diese Prüfmethode wurde für den MLA sowie (da dabei ebenfalls der TK-Lokus verwendet wird) für die TK6-Prüfung entwickelt. Der MLA ist für rechtliche Zwecke allgemein üblich. Die TK6-Prüfung hingegen ist erheblich weniger verbreitet. Ungeachtet der Ähnlichkeit der Endpunkte sind die beiden Zelllinien allerdings nicht austauschbar, und in rechtlichen Vorgaben kann im Zusammenhang mit einem bestimmten rechtlichen Zweck durchaus eine Präferenz für die eine oder andere Zelllinie zum Ausdruck gebracht werden. Beispielsweise wurde mit der Validierung des MLA nachgewiesen, dass mit dem Assay nicht nur Genmutationen erkannt werden können, sondern dass auch die Fähigkeit einer Prüfchemikalie zur Induzierung struktureller Chromosomenschäden festgestellt werden kann. Diese Prüfmethode ist Bestandteil einer Reihe von Prüfmethoden zur genetischen Toxikologie. Die OECD hat ein Dokument erstellt, das kurz gefasste und hilfreiche Informationen zu Untersuchungen zur genetischen Toxikologie sowie eine Übersicht über die jüngsten Änderungen der OECD-Prüfrichtlinien zur genetischen Toxikologie enthält (6).

2. Die *In-vitro*-Genmutationsprüfungen an Säugetierzellen werden zum Nachweis chemisch induzierter Genmutationen verwendet. Mit den in diesen Prüfungen verwendeten Zelllinien können Vorwärtsmutationen an Reporter-Genen, insbesondere am endogenen Thymidinkinase-Gen (*TK* bei menschlichen Zellen und *Tk* bei Nagerzellen, bei dieser Prüfmethode gemeinsam als *TK* bezeichnet) gemessen werden. Diese Prüfmethode ist zur Verwendung mit zwei Zelllinien vorgesehen: der Maus-Lymphom-Zelllinie L5178Y $TK^{+/-}$−3.7.2C (im Allgemeinen als L5178Y-Zelllinie bezeichnet) und der humanen Lymphoblastoid-Zelllinie TK6 (allgemein als TK6-Zelllinie bezeichnet). Die beiden Zelllinien unterscheiden sich zwar u. a. in Bezug auf ihre Herkunft, das Zellwachstum und den p53-Status. Die *TK*-Genmutationsprüfungen können jedoch bei beiden Zelltypen ähnlich durchgeführt werden, wie in dieser Prüfmethode beschrieben.

3. Die autosomale und heterozygote Beschaffenheit des Thymidin-Kinase-Gens ermöglicht die Erkennung lebensfähiger Kolonien von Zellen, denen infolge einer Mutation von $TK^{+/-}$ nach $TK^{-/-}$ das Enzym Thymidin-Kinase fehlt. Das Fehlen des Enzyms kann auf genetische Prozesse zurückzuführen sein, die das *TK*-Gen beeinträchtigen (u. a. auf Genmutationen (Punktmutationen, Frame-Shift-Mutationen, kleine Deletionen usw.) und auf Chromosomenveränderungen (große Deletionen, Chromosomen-Rearragements und mitotische Rekombinationen)). Letztere äußern sich in einem Verlust der Heterozygotie, der bei der humanen Tumorgenese häufig mit einer genetischen Veränderung von Tumorsuppressorgenen einhergeht. Theoretisch *kann* der Verlust des gesamten Chromosoms mit dem *TK*-Gen infolge der Hemmung der Spindelfaserbildung und/oder durch mitotische Non-disjunction mit dem MLA nachgewiesen werden. Eine kombinierte zytogenetische und molekulare Untersuchung zeigt tatsächlich eindeutig, dass einige MLA-TK-Mutanten auf eine Non-disjunction zurückzuführen sind. Mit *TK*-Genmutationsprüfungen werden Aneugene durch die Berücksichtigung von Standardkriterien zur Feststellung einer Zytotoxizität (wie bei dieser Prüfmethode beschrieben) jedoch nachweislich nicht zuverlässig erkannt. Daher sind diese Prüfungen zum Nachweis von Aneugenen nicht geeignet (7) (8) (9).

4. Bei den *TK*-Genmutationsprüfungen werden zwei verschiedene Phänotypklassen von *TK*-Mutanten erzeugt: die normal wachsenden Mutanten, die so schnell wachsen wie die heterozygoten TK-Zellen, und die langsam wachsenden Mutanten mit längeren Verdopplungszeiten. Die normal und die langsam wachsenden Mutanten werden beim MLA als Mutanten mit starker bzw. geringer Koloniebildung und bei der TK6-Prüfung als Mutanten mit früh bzw. spät auftretender Koloniebildung festgestellt. Die molekulare und zellgenetische Beschaffenheit von MLA-Mutanten mit starker bzw. geringer Koloniebildung wurde eingehend untersucht (8) (10) (11) (12) (13). Die molekulare und zellgenetische Beschaffenheit der früh und der spät auftretenden TK6-Mutanten wurde ebenfalls eingehend untersucht (14) (15) (16) (17). Langsam wachsende Mutanten bei beiden Zelltypen entwickelten genetische Schäden (einschließlich möglicherweise wachstumsregulierender Gene in der Nähe des *TK*-Locus), die zu längeren Verdopplungszeiten und zur späteren Bildung kleinerer Kolonien führen (18). Eine Induzierung langsam wachsender Mutanten erfolgt vor allem bei Chemikalien, die erhebliche strukturelle Änderungen auf der Chromosomenebene hervorrufen. Zellen, bei denen die Schäden die möglicherweise wachstumsregulierenden Gene in der Nähe des TK-Locus nicht betreffen, teilen sich ähnlich schnell wie die Elternzellen und entwickeln sich zu normal wachsenden Mutanten. Eine Induzierung normal wachsender Mutanten erfolgt bei Chemikalien, die hauptsächlich als Punktmutagene wirken. Daher ist entscheidend, dass sowohl langsam als auch normal wachsende Mutanten gezählt werden, um alle Mutanten zu erfassen und Aufschluss über den Typ (die Typen) der Schäden (Mutagene vs. Klastogene) zu erhalten, die durch die Prüfchemikalie induziert werden (10) (12) (18) (19).

5. Die Prüfmethode wurde so gestaltet, dass sie allgemeine Informationen sowohl beim MLA als auch bei der TK6-Prüfung liefert. Außerdem enthält sie spezifische Hinweise zur Durchführung der einzelnen Prüfungen.

6. Es gelten die Begriffsbestimmungen in Anlage 1.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

7. *In vitro* durchgeführte Prüfungen erfordern in der Regel die Verwendung eines exogenen Fremdstoff-Metabolisierungssystems. Mit diesem exogenen Stoffwechselaktivierungssystem lassen sich die *In-vivo*-Bedingungen jedoch nicht gänzlich nachvollziehen.

8. Bedingungen, die zu künstlich verursachten Positivergebnissen führen könnten (d. h. mögliche Wechselwirkungen mit dem Prüfsystem), die nicht von einer Interaktion zwischen der Prüfchemikalie und dem genetischen Material der Zelle herrühren, sind unbedingt zu vermeiden; zu solchen Bedingungen gehören Veränderungen des pH-Wertes bzw. der Osmolalität, eine Interaktion mit einzelnen Komponenten des Mediums (20) (21) oder eine hochgradige Zytotoxizität (22) (23) (24). Zytotoxizitätswerte, die die empfohlenen Höchstwerte nach Nummer 28 überschreiten, werden für den MLA und TK6-Prüfung als zu hoch betrachtet. Außerdem ist zu beachten, dass Prüfchemikalien, bei denen es sich um Thymidin-Nachbildungen handelt oder die sich wie Thymidin-Nachbildungen verhalten, bei der Behandlung der Zellen infolge der selektiven Vermehrung der spontanen Hintergrundmutationen die Mutantenhäufigkeit erhöhen und Untersuchungen mit weiteren Prüfmethoden erforderlich machen können, um eine angemessene Auswertung zu ermöglichen (25).

9. Für hergestellte Nanomaterialien sind möglicherweise spezielle Anpassungen dieser Prüfmethode erforderlich, die an dieser Stelle jedoch nicht beschrieben werden.

10. Bevor die Prüfmethode zur Untersuchung eines Gemischs für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regulierungszweck verwendet wird, ist zu prüfen, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefern kann und, wenn dem so ist, warum. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs rechtlich vorgeschrieben ist.

11. Mutantenzellen, die infolge der Mutation von $TK^{+/-}$ zu $TK^{-/-}$ keine Aktivität des Enzyms Thymidinkinase (TK) entwickeln, sind gegenüber der zytotoxischen Wirkung des Pyrimidinanalogons Trifluorthymidin (TFT) resistent. Bei Anwesenheit von *TK* sind Zellen hingegen empfindlich gegenüber TFT, das die Hemmung des Zellstoffwechsels verursacht und eine weitere Zellteilung verhindert. Somit können Mutantenzellen sich in Anwesenheit von TFT vermehren und erkennbare Kolonien bilden. Zellen, die das Enzym TK enthalten, sind dazu nicht in der Lage.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

12. Zellen in Suspensionskultur werden über einen angemessenen Zeitraum (Nummer 19) mit und ohne exogenes Fremdstoff-Metabolisierungssystem (Nummer 33) mit der Prüfchemikalie behandelt und anschließend subkultiviert, um die Zytotoxizität zu bestimmen und vor der Mutantenselektion die Expression des Phänotyps zu ermöglichen. Die Zytotoxizität wird anhand des relativen Gesamtwachstums (RTG) (Nummer 25) beim MLA bzw. anhand der relativen Überlebensrate (RS) (Nummer 26) bei der TK6-Prüfung ermittelt. Die behandelten Kulturen werden für einen ausreichenden Zeitraum, der für den jeweils gewählten Zelltyp charakteristisch ist (Nummer 37), in einem Wachstumsmedium gehalten, um eine annähernd optimale Expression des Phänotyps der induzierten Mutationen zu ermöglichen. Nach der Expression des Phänotyps wird die Mutantenhäufigkeit bestimmt, indem eine bekannte Anzahl von Zellen auf ein Medium mit dem selektierenden Agens zur Bestimmung der Mutantenkolonien und auf ein Medium ohne selektierendes Agens zur Bestimmung der Klonierungseffizienz (Lebensfähigkeit) geimpft wird. Nach einer geeigneten Inkubationszeit werden die Kolonien gezählt. Die Mutantenhäufigkeit wird anhand der entsprechend der Klonierungseffizienz bei der Mutantenselektion bereinigten Anzahl der Mutantenkolonien berechnet.

BESCHREIBUNG DER METHODE

Vorbereitungen

Zellen

13. MLA: Da der MLA mit der $TK^{+/-}$−3.7.2C-Zelllinie als Unterzelllinie der L5178Y-Zelllinie entwickelt und beschrieben wurde, ist für den MLA diese spezielle Unterzelllinie zu verwenden. Die L5178Y-Zelllinie wurde aus einem durch Methylcholanthren induzierten Thymuslymphom einer DBA-2-Maus abgeleitet (26). Clive u. a. behandelten L5178Y-Zellen (von Clive als $TK^{+/+}$−3 bezeichnet) mit Ethylmethansulfonat und isolierten einen $TK^{-/-}$-Klon (bezeichnet als

$TK^{-/-}$−3.7-Klon) mit Bromodeoxyuridin als selektierendes Agens. Aus dem $TK^{-/-}$-Klon wurden ein spontaner $TK^{+/-}$-Klon (als $TK^{+/-}$−3.7.2. bezeichnet) und ein Subklon (bezeichnet als $TK^{+/-}$−3.7.2C) zur Verwendung im MLA isoliert und charakterisiert (27). Der Karyotyp der Zelllinie wurde veröffentlicht (28) (29) (30) (31). Der Modalwert der Chromosomen beträgt 40. Das metazentrische Chromosom (t12;13) ist als ein Chromosom zu zählen. Der *TK*-Locus bei Mäusen befindet sich am distalen Ende des Chromosoms 11. Die Zelllinie L5178Y $TK^{+/-}$−3.7.2C hat Mutationen auf den p53-Allelen und erzeugt mutantes p53-Protein (32) (33). Der p53-Status der $TK^{+/-}$−3.7.2C-Zelllinie ist wahrscheinlich die Ursache dafür, dass mit der Prüfung größere Schäden erkannt werden können (17).

14. TK6: TK6 ist eine humane lymphoblastoide Zelllinie. Die Elternzelllinie ist eine mit dem Epstein-Barr-Virus transformierte Zelllinie (WI-L2), die ursprünglich von einem 5-jährigen Jungen mit hereditärer Sphärozytose abgeleiet wurde. Der erste isolierte Klon (HH4) wurde mit ICR191 mutagenisiert; dabei wurde eine heterozygote *TK*-Zelllinie (TK6) erzeugt (34). TK6-Zellen sind annähernd diploid; der entsprechende Karyotyp ist 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Der *TK*-Locus beim Menschen befindet sich am langen Arm des Chromosoms 17. TK6 ist eine p53-kompetente Zelllinie, da sie auf beiden Allelen eine Wildtyp-p53-Sequenz aufweist und ausschließlich Wildtyp-p53-Protein exprimiert (36).

15. Sowohl beim MLA als auch bei der TK6-Prüfung empfiehlt sich, dass das Prüflabor beim erstmaligen Herstellen oder beim Auffüllen der Master-Zellenbestände sicherstellt, dass keine *Mycoplasma*-Kontamination vorliegt, sowie dass es den Karyotyp der Zellen bestimmt oder die Chromosomen markiert, auf denen sich der *TK*-Locus befindet, und dass es die Zeiten für die Verdopplung der Populationen ermittelt. Die normale Dauer des Zellzyklus sollte bei den im Prüflabor verwendeten Zellen bekannt sein und mit veröffentlichten Zellcharakteristiken übereinstimmen (16) (19) (37). Dieser Master-Zellenbestand sollte bei -150 °C (oder noch niedrigeren Temperaturen) aufbewahrt und zur Herstellung aller Arbeitsstämme verwendet werden.

16. Entweder vor der Herstellung einer großen Anzahl an kryokonservierten Arbeitsstämmen oder unmittelbar vor der Verwendung in einem Versuch müssen die Zellkulturen möglicherweise von noch vorhandenen Mutanten gereinigt werden [wenn die Mutantenhäufigkeit (MF) der Lösungsmittelkontrolle nicht bereits im akzeptablen Bereich liegt – für MLA siehe Tabelle 2]. Dazu wird Methotrexat (Aminopterin) zur Selektion von Zellen ohne TK verwendet und Thymidin, Hypoxanthin und Glycin (L5178Y) bzw. 2'-Deoxycytidin (TK6) zur Kultur hinzugegeben, um ein optimales Wachstum der TK-kompetenten Zellen sicherzustellen (19) (38) (39) bzw. (40) für TK6. Allgemeine Hinweise zu bewährten Verfahren bei der Haltung von Zellkulturen sowie spezifische Hinweise zu L5178Y- und TK6-Zellen siehe (19) (31) (37) (39) und (41). Für Labors, die Master-Zellenbestände als Ausgangszellen für den MLA oder die TK6-Prüfung benötigen, sowie allgemein, wenn neue Master-Zellenbestände benötigt werden, ist ein Zellendepot mit gut charakterisierten Zellen verfügbar (37).

Medien und Kulturbedingungen

17. Bei beiden Prüfungen erfordert die Kultivierung geeignete Kulturmedien und Inkubationsbedingungen (z. B. Kulturgefäße, eine befeuchtete Atmosphäre mit einer CO_2-Konzentration von 5 % und eine Inkubationstemperatur von 37 °C). Die Zellkulturen sollten immer unter Bedingungen gehalten werden, bei denen das Wachstum in der Log-Phase sichergestellt ist. Vor allem ist für Medien- und Kulturbedingungen zu sorgen, die ein optimales Zellwachstum während der Expressionszeit und der Klonierung der mutierenden und nichtmutierenden Zellen gewährleisten. Für den MLA und die TK6-Prüfung ist ferner wichtig, dass die Kulturlösungen ein optimales Wachstum sowohl der großen Kolonien bzw. frühzeitig auftretender TK-Mutanten als auch der kleinen Kolonien bzw. spät auftretender TK-Mutanten gewährleisten. Nähere Informationen zur Haltung der Kulturen einschließlich der Notwendigkeit der Inaktivierung von Pferdeserum durch angemessene Erwärmung (wenn bei der Mutantenselektion RPMI-Medium verwendet wird) siehe (19) (31) (38) (39) (40) und (42).

Vorbereitung der Kulturen

18. Die Zellen werden aus Stammkulturen gewonnen und im Kulturmedium in einer solchen Dichte überimpft, dass die Suspensionskulturen während der Behandlung und der Expressionszeit weiterhin exponentiell wachsen.

Stoffwechselaktivierung

19. Bei der Verwendung von L5178Y- und TK6-Zellen sollten exogene metabolisierende Systeme verwendet werden, da diese Zellen eine unzulängliche endogene Stoffwechselkapazität entwickeln. Das gängigste und – sofern nicht anders begründet – standardmäßig empfohlene System, ist eine durch Ko-Faktoren ergänzte post-mitochondriale Fraktion (S9) aus der Leber von Nagetieren (in der Regel Ratten), die mit enzyminduzierenden Agenzien wie Aroclor 1254 (43) (44) (45) oder einer Kombination aus Phenobarbiton und β-Naphtoflavon (46) (47) (48) (49) (50) (51) vorbehandelt wurde. Die letztgenannte Kombination verstößt nicht gegen das Stockholmer Übereinkommen

über persistente organische Schadstoffe (52) und hat sich für die Induktion von Multifunktionsoxidasen als ebenso wirksam wie Aroclor 1254 erwiesen (45) (46) (47) (48) (49). Die S9-Fraktion wird im Endmedium in der Regel in Konzentrationen von 1-2 % verwendet, kann jedoch auf 10 % v/v erhöht werden. Die Wahl der Art und Konzentration des exogenen Metabolisierungssystems oder metabolischen Agens ist möglicherweise von der Klasse der Prüfchemikalien abhängig.

Vorbereitung der Prüfchemikalie

20. Feste Prüfchemikalien sollten vor der Behandlung der Zellen in geeigneten Lösungsmitteln gelöst und ggf. verdünnt werden (Nummer 21). Flüssige Prüfchemikalien können vor der Behandlung direkt zum Versuchssystem gegeben und/oder verdünnt werden. Gasförmige oder flüchtige Prüfchemikalien sind durch entsprechende Modifikationen der Standardprotokolle zu prüfen, z. B. durch Behandlung in hermetisch verschlossenen Kulturgefäßen (53) (54) (55). Zubereitungen der Prüfchemikalie sollten kurz vor der Behandlung hergestellt werden, es sei denn, die Stabilität der Chemikalie bei der Lagerung wird nachgewiesen.

PRÜFBEDINGUNGEN

Lösungsmittel

21. Das Lösungsmittel sollte so gewählt werden, dass zum einen eine optimale Löslichkeit der Prüfchemikalie gewährleistet ist, zum anderen aber die Durchführung der Prüfung nicht beeinträchtigt wird, z. B. durch Veränderung des Zellwachstums, Beeinträchtigung der Integrität der Prüfchemikalie, Reaktion mit Kulturgefäßen oder Behinderung des Metabolisierungssystems. Als erste Wahl ist möglichst die Verwendung eines wässrigen Lösungsmittels (oder Kulturmediums) zu empfehlen. Gründlich erprobte Lösungsmittel sind Wasser oder Dimethylsulfoxid. Organische Lösungsmittel sollten 1 % (v/v) und wässrige Lösungsmittel (Kochsalzlösung oder Wasser) 10 % (v/v) im Endmedium möglichst nicht überschreiten. Kommen weniger gründlich erprobte Lösungsmittel zum Einsatz (z. B Ethanol oder Aceton), ist deren Verwendung anhand von Daten zu begründen, die ihre Verträglichkeit mit den Prüfchemikalien und dem Versuchssystem und ihre nicht gentoxische Wirkung in der verwendeten Konzentration belegen. Sind keine entsprechenden Belege verfügbar, sollten unbedingt unbehandelte Kontrollen (siehe Anlage 1, Begriffsbestimmungen) einbezogen werden, um nachzuweisen, dass durch die gewählten Lösungsmittel keine schädlichen oder mutagenen Wirkungen ausgelöst werden.

MESSUNG DER ZYTOTOXIZITÄT UND AUSWAHL DER BEHANDLUNGSKONZENTRATIONEN

22. Bei der Bestimmung der höchsten Konzentration der Prüfchemikalie sind Konzentrationen zu vermeiden, die zu künstlich positiven Reaktionen führen können, z. B. zu übermäßiger Zytotoxizität (Nummer 28), Niederschlag (Nummer 29) oder ausgeprägten Veränderungen des pH-Werts oder der Osmolalität (Nummer 8). Wenn die Prüfchemikalie zum Zeitpunkt der Zugabe den pH-Wert des Mediums erheblich verändert, lässt sich der pH-Wert auch durch Anwendung eines Puffers im Endmedium einstellen, damit künstlich positive Reaktionen vermieden und geeignete Kulturbedingungen aufrechterhalten werden.

23. Die Konzentrationen werden u. a. nach der Zytotoxizität ausgewählt (Nummern 27-30). Wenngleich die Bewertung der Zytotoxizität im Rahmen eines Vorversuchs nützlich sein kann, um die im Hauptversuch verwendeten Konzentrationen besser bestimmen zu können, ist ein Vorversuch nicht erforderlich. Auch wenn die anfängliche Zytotoxizität bewertet wird, ist im Hauptversuch die Zytotoxizität jeder einzelnen Kultur zu messen. Wenn ein Dosisfindungsversuch durchgeführt wird, sollte dieser ein breites Spektrum an Konzentrationen abdecken. Der Dosisfindungsversuch kann entweder an Tag 1 nach der Behandlung abgebrochen werden oder über die 2-tägige Expression bis zur Mutantenselektion fortgesetzt werden (wenn sich die verwendeten Konzentrationen als geeignet erweisen sollten).

24. Die Zytotoxizität sollte für jede Prüfkultur und für jede Kontrollkultur separat ermittelt werden. Hinsichtlich der Methoden für den MLA (2) und die TK6-Prüfung (15) ist die international anerkannte Praxis maßgeblich.

25. Für die Durchführung des MLA mit der Agar- und der Microwell-Methode gilt: Die Zytotoxizität sollte anhand des relativen Gesamtwachstums (RTG) ermittelt werden (erstmals im Jahr 1975 von Clive und Spector beschrieben (2)). Dieser Parameter beinhaltet das relative Suspensionswachstum (RSG: Prüfkultur vs. Lösungsmittelkontrolle) während der Behandlung der Zellen, die Expressionszeit und die relative Klonierungseffizienz (RCE: Prüfkultur vs. Lösungsmittelkontrolle) zum Zeitpunkt der Mutantenselektion (2). Das RSG beinhaltet alle Zellverluste in der Prüfkultur während der Behandlung (Formel siehe Anlage 2).

26. Für die TK6-Prüfung gilt: Die Zytotoxizität sollte anhand der relativen Überlebensrate (RS) (d. h. der Klonierungseffizienz von unmittelbar nach der Behandlung ausplattierten Zellen) ermittelt werden; dabei ist eine Bereinigung um Zellverluste während der Behandlung auf der Grundlage der Zellzahl im Vergleich zur Negativkontrolle (mit einer Überlebensrate von 100 %) vorzunehmen (Formel siehe Anlage 2).

27. Es sollten mindestens vier Prüfkonzentrationen (ausgenommen das Lösungsmittel und Positivkontrollen) ausgewertet werden, die die Akzeptanzkriterien erfüllen (geeignete Zytotoxizität, Anzahl der Zellen usw.). Die Verwendung von Zweifachkulturen ist zu empfehlen, doch können für jede überprüfte Konzentration auch Replikat- oder Einfachkulturen herangezogen werden. Die Ergebnisse aus Replikatkulturen bei einer gegebenen Konzentration sollten getrennt angegeben werden, können zu Datenanalysezwecken aber auch gepoolt werden (55). Bei Prüfchemikalien mit geringer Zytotoxizität oder ohne zytotoxische Wirkung sind in der Regel Konzentrationsintervalle mit zwei- bis dreifacher Konzentration geeignet. Wenn Zytotoxizität auftritt, sollten die Konzentrationen einen Zytotoxizitätsbereich ausgehend vom Wert, bei dem Zytotoxizität auftritt (siehe Beschreibung unter Nummer 28), bis zu Konzentrationen mit mäßiger oder geringer oder nicht vorhandener Toxizität umfassen. Viele Prüfchemikalien zeigen steile Konzentrations-Reaktions-Kurven. Um Daten zu mäßiger oder geringer Toxizität zu erhalten oder um die Dosis-Reaktions-Beziehungen im Einzelnen auszuwerten, kann es daher erforderlich sein, Konzentrationen mit kleineren Abständen und/oder mehr als vier Konzentrationen zu verwenden, insbesondere in Fällen, in denen ein Wiederholungsversuch erforderlich ist (Nummer 70). Die Verwendung von mehr als 4 Konzentrationen kann besonders bei Einfachkulturen wichtig sein.

28. Wenn die Höchstkonzentration auf der Zytotoxizität beruht, sollte bei der Höchstkonzentration beim MLA ein relatives Gesamtwachstum von 10-20 % und bei der TK6-Prüfung eine relative Überlebensrate von 10 % erreicht werden (Nummer 67).

29. Im Falle schwer löslicher Chemikalien, die bei Konzentrationen unterhalb der niedrigsten unlöslichen Konzentration nicht zytotoxisch sind, sollte die höchste analysierte Konzentration am Ende der Behandlung mit der Prüfchemikalie eine Trübung oder eine mit bloßem Auge oder mithilfe eines Inversmikroskops erkennbare Ausfällung bewirken. Auch wenn Zytotoxizität oberhalb der niedrigsten unlöslichen Konzentration auftritt, ist es ratsam, nur eine Konzentration zu testen, bei der es zu einer Trübung oder sichtbaren Ausfällung kommt, da infolge dieser Ausfällungen künstliche Wirkungen auftreten können. Da beim MLA und bei der TK6-Prüfung Suspensionskulturen verwendet werden, ist bei der Konzentration, bei der es zu einer Ausfällung kommt, unbedingt sicherzustellen, dass die Ausfällung nicht die Durchführung des Versuchs beeinträchtigt. Unter Umständen empfiehlt es sich, die Löslichkeit im Kulturmedium vor dem Versuch zu bestimmen.

30. Wird keine Ausfällung bzw. keine grenzwertige Zytotoxizität beobachtet, sollte die höchste Versuchskonzentration 10 mM, 2 mg/ml oder 2 µl/ml entsprechen, je nachdem, welcher Wert der niedrigere ist (57) (58). Wenn die Zusammensetzung der Prüfchemikalie nicht genau definiert ist (bei Stoffen mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexen Reaktionsprodukten oder biologischen Materialien (UVCB), Umweltextrakten usw.), muss die höchste Konzentration möglicherweise höher angesetzt werden (z. B. 5 mg/ml), sofern keine ausreichende Zytotoxizität vorhanden ist, um die Konzentration der einzelnen Bestandteile zu erhöhen. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass diese Anforderungen sich von denen für Humanpharmazeutika unterscheiden können (59).

Kontrollen

31. Bei allen Versuchsbedingungen sind jeweils gleichzeitige Negativkontrollen (Nummer 21) anzulegen, bei denen das Behandlungsmedium lediglich Lösungsmittel enthält, die ansonsten aber auf die gleiche Weise behandelt wurden wie die Behandlungskulturen.

32. Die Eignung des Labors zum Nachweis von Mutagenen unter den Bedingungen des verwendeten Prüfprotokolls und (ggf.) die Wirksamkeit des exogenen Stoffwechselaktivierungssystems sowie eine angemessene Erkennung sowohl kleiner/spät auftretender als auch großer/früh auftretender *TK*-Mutanten sind anhand gleichzeitiger Positivkontrollen nachzuweisen. Beispiele für Positivkontrollen sind Tabelle 1 zu entnehmen. In begründeten Fällen können andere geeignete Positivkontrollstoffe verwendet werden. Da *In-vitro*-Tests auf Genotoxizität in Säugetierzellen für die gleichzeitigen Kurzzeitbehandlungen (3-4 Stunden) mit und ohne Zusatz eines Stoffwechselaktivierungssystems über die gleiche Behandlungsdauer ausreichend standardisiert sind, kann sich die Hinzuziehung von Positivkontrollen auf ein Mutagen beschränken, das eine Stoffwechselaktivierung erfordert. In diesem Fall wird durch die Reaktion einer einzelnen Positivkontrolle sowohl die Aktivität des Stoffwechselaktivierungssystems als auch die Empfindlichkeit des Prüfsystems nachgewiesen. Im Falle einer Langzeitbehandlung (d. h. 24 Stunden ohne S9) sollte jedoch eine gesonderte Positivkontrolle erfolgen, da der Versuch mit Stoffwechselaktivierung eine andere Behandlungsdauer hat. Jede Positivkontrolle sollte bei einer oder mehreren Konzentrationen durchgeführt werden, die voraussichtlich eine reproduzierbare und erkennbare Zunahme gegenüber dem Hintergrund ergeben (womit sich die Empfindlichkeit des Versuchssystems nachweisen lässt), und die Wirkung sollte nicht durch einen Zytotoxizitätswert beeinträchtigt werden, der die in dieser Prüfmethode vorgegebenen Grenzen überschreitet (Nummer 28).

Tabelle 1

Zur Beurteilung der Eignung des Labors und zur Wahl der Positivkontrollen empfohlene Referenzstoffe

Kategorie	Stoff	CAS-Nr.
1. Mutagene, die ohne Stoffwechselaktivierung wirken		
	Methylmethansulfonat	66-27-3
	Mitomycin C	50-07-7
	4-Nitroquinolin-N-oxid	56-57-5
2. Mutagene, die eine Stoffwechselaktivierung erfordern		
	Benzo(a)pyren	50-32-8
	Cyclophosphamid(monohydrat)	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-Dimethylbenzanthracen	57-97-6
	3-Methylcholanthren	56-49-5

VERFAHREN

Behandlung mit der Prüfchemikalie

33. Proliferierende Zellen werden mit und ohne Stoffwechselaktivierungssystem mit der Prüfchemikalie behandelt. Die Exposition sollte über einen geeigneten Zeitraum (gewöhnlich 3-4 Stunden) erfolgen. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass diese Anforderungen sich von denen für Humanpharmazeutika unterscheiden können (59). Wenn die Kurzzeit-Behandlung zu negativen Ergebnissen führt und verfügbare Informationen eine längere Behandlung als erforderlich erscheinen lassen [z. B. bei Nucleosidanalogen oder schlecht löslichen Chemikalien (5) (59)], ist beim MLA die Durchführung der Prüfung mit längeren Behandlungszeiten (d. h. 24 Stunden ohne S9) in Erwägung zu ziehen.

34. Wie viele Zellen für jede Prüfung und für jedes Stadium der Prüfung (Kontrolle und behandelte Kultur) mindestens zu verwenden sind, hängt von der Spontanmutationshäufigkeit ab. Als Faustregel gilt, dass in jeder Versuchskultur ausreichend Zellen behandelt werden sollten und eine hinreichende Passagenanzahl erreicht werden sollte, um in allen Stadien der Prüfung (Behandlung, Expression des Phänotyps und Mutantenselektion) mindestens 10 bzw. im Idealfall 100 Spontanmutationen zu erhalten (56).

35. Beim MLA liegt eine annehmbare Spontanmutationshäufigkeit bei 35-140 × 10^{-6} (Agar-Methode) bzw. bei 50-170 × 10^{-6} (Microwell-Methode) (siehe Tabelle 2). Um pro Prüfkultur mindestens 10 und im Idealfall 100 Spontanmutationen zu erhalten, die die Behandlung überleben, müssen mindestens 6 × 10^{6} Zellen behandelt werden. Die Behandlung dieser Anzahl an Zellen und der Erhalt einer hinreichenden Anzahl an Zellen während der Expression und beim Klonen für die Mutantenselektion führt in allen Phasen des Versuchs zu einer hinreichenden Anzahl an Spontanmutationen (mindestens 10) – selbst bei Kulturen, die mit Konzentrationen behandelt wurden, bei denen sich eine Zytotoxizität von 90 % ergibt (nachgewiesen anhand eines RTG von 10 %) (19) (38) (39).

36. Die Spontanmutationshäufigkeit liegt bei Tk6 in der Regel zwischen 2 und 10 × 10^{-6}. Um pro Prüfkultur mindestens 10 Spontanmutationen zu erhalten, die die Behandlung überleben, müssen in jeder Kultur mindestens 20 × 10^{6} Zellen behandelt werden. Die Behandlung dieser Anzahl an Zellen führt selbst bei Kulturen, die mit Konzentrationen behandelt wurden, bei denen sich eine Zytotoxizität von 90 % (RS 10 %) ergibt, zu einer hinreichenden Anzahl an Spontanmutationen (mindestens 10). Außerdem muss während der Expressionszeit eine hinreichende Anzahl an Zellen kultiviert und zur Mutantenselektion plattiert werden (60).

Expressionszeit des Phänotyps und Messung der Zytotoxizität und der Mutantenhäufigkeit

37. Im Anschluss an die Behandlungsphase werden die Zellen über einen bestimmten Zeitraum kultiviert, um für jede Zelllinie eine annähernd optimale spezifische Expression des Phänotyps neu induzierter Mutanten zu ermöglichen. Beim MLA beträgt die Expressionszeit des Phänotyps 2 Tage. Bei der TK6-Prüfung dauert die Expression des Phänotyps 3-4 Tage. Bei einer 24-stündigen Behandlung beginnt die Expressionszeit am Ende der Behandlung.

38. Während der Expressionszeit des Phänotyps werden die Zellen täglich gezählt. Beim MLA wird anhand der täglichen Zellzählungen das tägliche Suspensionswachstum (SG) berechnet. Nach der 2-tägigen Expressionszeit werden die Zellen mit und ohne selektierendes Agens zur Bestimmung der Mutantenzahl (Selektionsplatten) bzw. der Klonierungseffizienz (Viabilitätsplatten) im Medium suspendiert. Beim MLA sind zwei Methoden zum Klonen für die Mutantenselektion annehmbar: die Soft-Agar-Methode und die Methode mit dem flüssigen Medium in 96-Well-Platten (19) (38) (39). Die Klonierung bei der TK6-Prüfung erfolgt mit flüssigen Medien und einer 96-Well-Platte (16).

39. Als selektierendes Agens für *TK*-Mutanten wird ausschließlich Triflurothymidin (TFT) empfohlen (61).

40. Beim MLA werden die Agar- und die Microwell-Platten nach 10- bis 12-tägiger Inkubation gezählt. Bei der TK6-Prüfung werden die Kolonien der früh auftretenden Mutanten auf den Microwell-Platten nach 10-14 Tagen gezählt. Zur Rückgewinnung der langsam wachsenden (spät auftretenden) TK6-Mutanten müssen die Zellen nach dem Zählen der früh auftretenden Mutanten nochmals mit dem Wachstumsmedium versorgt und mit TFT behandelt werden. Anschließend werden die Platten weitere 7-10 Tage inkubiert (62). Hinweise zur Zählung langsam und normal wachsender *TK*-Mutanten siehe Nummern 42 und 44.

41. Die Berechnungen bei den beiden Untersuchungen mit den beiden Methoden (Agar- und Microwell-Methode) beim MLA werden in Anlage 2 erläutert. Beim MLA mit der Agar-Methode werden die Kolonien gezählt, und die Anzahl der Mutantenkolonien wird entsprechend der Klonierungseffizienz bereinigt, um die Mutantenhäufigkeit (MF) zu berechnen. Beim MLA mit der Microwell-Methode und bei der TK6-Prüfung wird die Klonierungseffizienz sowohl der Platten zur Selektion als auch der Platten zur Bestimmung der Klonierungseffizienz nach der Poisson-Verteilung bestimmt (63). Aufgrund der jeweils ermittelten Klonierungseffizienz wird die MF berechnet.

Charakterisierung der Mutantenkolonien

42. Wenn die Prüfchemikalie beim MLA einen positiven Befund ergibt (Nummern 62 und 63), sollte die Charakterisierung nach Größe und Wachstumsentwicklung der Kolonien zumindest bei einer der Prüfkulturen (im Allgemeinen der mit der höchsten positiven Konzentration) sowie bei den Negativ- und den Positivkontrollen erfolgen. Ergibt sich bei der Prüfchemikalie ein negativer Befund (Nummer 64), so ist eine Charakterisierung der Mutantenkolonien bei den Negativ- und Positivkontrollen vorzunehmen. Beim MLA mit der Microwell-Methode werden Mutantenkolonien als klein betrachtet, die weniger als 25 % des Durchmessers eines Wells bedecken. Als groß gelten Mutantenkolonien, die mehr als 25 % des Well-Durchmessers bedecken. Bei der Agar-Methode werden die Mutantenkolonien und die Koloniegrößen mit einem automatischen Kolonienzähler bestimmt. Die Ansätze zur Bestimmung von Koloniegrößen werden in der Fachliteratur erläutert (19) (38) (40). Die Charakterisierung der Kolonien auf der Negativ- und der Positivkontrolle wird als Nachweis dafür benötigt, dass die Untersuchungen ordnungsgemäß durchgeführt wurden.

43. Für eine Prüfchemikalie kann kein negativer Befund festgestellt werden, wenn in der Positivkontrolle weder große noch kleine Mutantenkolonien angemessen nachgewiesen werden können. Die Charakterisierung der Kolonien kann allgemein Aufschluss darüber geben, ob eine Prüfchemikalie Punktmutationen und/oder Chromosomenveränderungen auslösen kann (Nummer 4).

44. TK6: Normal und langsam wachsende Mutanten unterscheiden sich durch die Inkubationszeit (Nummer 40). Bei der TK6-Prüfung werden sowohl früh als auch spät auftretende Mutanten bei allen Kulturen einschließlich der Negativ- und der Positivkontrollen bewertet. Die Charakterisierung der Kolonien der Negativ- und der Positivkontrolle wird als Nachweis dafür benötigt, dass die Untersuchungen ordnungsgemäß durchgeführt wurden. Für eine Prüfchemikalie kann kein negativer Befund festgestellt werden, wenn in der Positivkontrolle weder früh noch spät auftretende Mutantenkolonien angemessen nachgewiesen werden können. Die Charakterisierung der Kolonien kann allgemein Aufschluss darüber geben, ob eine Prüfchemikalie Punktmutationen und/oder Chromosomenveränderungen auslösen kann (Nummer 4).

Kompetenz des Labors

45. Um ausreichende Erfahrungen mit der Prüfung nachzuweisen, bevor routinemäßige Prüfungen erfolgen, sollte das Labor eine Reihe von Versuchen mit positiven Referenzstoffen durchgeführt haben, die sich unterschiedlicher Mechanismen (mindestens ein aktiver Mechanismus mit und ein aktiver Mechanismus ohne Stoffwechselaktivierung, ausgewählt aus den in Tabelle 1 aufgeführten Stoffen) und verschiedener Negativkontrollen (unter Verwendung verschiedener Lösungsmittel/Vehikel) bedienen. Die Reaktionen dieser Positiv- und Negativkontrollen sollten mit der Literatur im Einklang stehen. Dies gilt nicht für erfahrene Laboratorien, d. h. für Laboratorien, die über eine historische Datenbank im Sinne der Nummern 47-50 verfügen. Bei der MLA sollten die für die Positiv- und die Negativkontrollen ermittelten Werte im Einklang mit den IWGT-Empfehlungen stehen (siehe Tabelle 2).

46. Bei kurzer Behandlungsdauer sowie dann, wenn keine Stoffwechselaktivierung erfolgt ist, sollte eine Auswahl von Positivkontrollstoffen (siehe Tabelle 1) mit kurzer und (bei längeren Behandlungen) mit langer Behandlungsdauer untersucht werden, um die Fähigkeit zur Erkennung mutagener Chemikalien nachzuweisen und die Wirksamkeit des Stoffwechselaktivierungssystems zu ermitteln und zum einen die Eignung der Bedingungen für das Zellwachstum während der Behandlung sowie für die phänotypische Expression und für die Mutantenselektion und zum anderen die Eignung der Auswertungsverfahren zu belegen. Zum Nachweis der Empfindlichkeit und dynamischen Bandbreite des Versuchssystems sollte eine Spanne der Konzentrationen der ausgewählten Stoffe festgelegt werden, um reproduzierbare und konzentrationsabhängige Zunahmen gegenüber dem Hintergrund zu erhalten.

Historische Kontrolldaten

47. Das Labor sollte Folgendes bestimmen:

— den Bereich und die Verteilung historischer Positivkontrollen und

— den Bereich und die Verteilung historischer Negativkontrollen (unbehandelt, Lösungsmittel).

48. Bei der erstmaligen Erfassung von Daten zur Verteilung einer historischen Negativkontrolle sollten gleichzeitige Negativkontrollen veröffentlichten Negativkontrolldaten entsprechen. Werden weitere Versuchsdaten zur Verteilung der Kontrollen hinzugefügt, sollten gleichzeitige Negativkontrollen idealerweise innerhalb der Kontrollgrenzen von 95 % der gewählten Verteilung liegen (64) (65).

49. Die Datenbank des Labors zu historischen Negativkontrollen sollte zunächst mit mindestens 10 Versuchen angelegt werden. Vorzugsweise sollte sie jedoch aus mindestens 20 Versuchen bestehen, die unter vergleichbaren Versuchsbedingungen durchgeführt wurden. Labors sollten Qualitätskontrollverfahren anwenden, wie z. B. Qualitätsregelkarten (z. B. C-Karten oder X-Bar-Karten) (65), um zu ermitteln, wie variabel ihre Positiv- und Negativkontrolldaten sind, und um nachzuweisen, dass die Methodik in ihrem Labor kontrolliert wird (66). Nähere Informationen und Empfehlungen zum Sammeln und zur Verwendung historischer Daten sind der Fachliteratur zu entnehmen (64).

50. Negativkontrolldaten sollten die Mutantenhäufigkeit aus einer Einzelkultur oder vorzugsweise aus Replikatkulturen erfassen, wie in Nummer 27 beschrieben. Gleichzeitige Negativkontrollen sollten idealerweise innerhalb der Kontrollgrenzen von 95 % der Verteilung in der Datenbank des Labors zu historischen Negativkontrollen liegen. Sofern Negativkontrolldaten außerhalb der Kontrollgrenze von 95 % liegen, ist es zulässig, sie in die historische Kontrollverteilung aufzunehmen, solange es sich bei den Daten nicht um „extreme Ausreißer" handelt und nachgewiesen werden kann, dass das Prüfsystem kontrolliert wird (Nummer 49) und dass kein technisches oder menschliches Versagen vorliegt.

51. Sämtliche Änderungen am Versuchsprotokoll sind auf Übereinstimmung mit den bereits vorhandenen historischen Kontrolldaten zu prüfen. Bei größeren Inkonsistenzen sollte eine neue Datenbank historischer Kontrolldaten erstellt werden.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Darstellung der Prüfergebnisse

52. Die Darstellung der Daten des MLA und der TK6-Prüfung sollte für behandelte Kulturen und für Kontrollkulturen die erforderlichen Daten für die Berechnung der Zytotoxizität (RTG bzw. RS) und die Mutantenhäufigkeit beinhalten wie im Folgenden beschrieben.

53. Beim MLA sollten für die jeweiligen Kulturen das RSG und das RTG, die Kolonierungseffizienz zum Zeitpunkt der Mutantenselektion und die Anzahl der Mutantenkolonien (Agar-Methode) bzw. die Anzahl der leeren Wells (Microwell-Methode) angegeben werden. Unter der Mutantenhäufigkeit ist der zahlenmäßige Anteil der Mutantenzellen pro Million überlebender Zellen zu verstehen. Bei einer positiven Reaktion sollten die Mutantenhäufigkeiten kleiner und großer Kolonien (und/oder die Prozentanteile der Gesamtmutationshäufigkeit) für mindestens eine Konzentration der Prüfchemikalie (im Allgemeinen die höchste Konzentration mit positivem Befund) sowie für die Negativ- und die Positivkontrolle angegeben werden. Bei einer negativen Reaktion sollte die Mutantenhäufigkeit für die Negativ- und für die Positivkontrolle angegeben werden.

54. Bei der TK6-Prüfung sollten für die einzelnen Kulturen jeweils die relative Überlebensrate (RS), die Klonierungseffizienz zum Zeitpunkt der Mutantenselektion und die Anzahl der leeren Wells bei früh und bei spät auftretenden Mutanten angegeben werden. Die MF sollte als Anzahl der Mutantenzellen bezogen auf die Anzahl der überlebenden Zellen angegeben werden und die Gesamtmutationshäufigkeit sowie die Mutantenhäufigkeit (und/oder den Prozentanteil der Gesamtmutationshäufigkeit) der früh und der spät auftretenden Mutanten beinhalten.

Akzeptanzkriterien

55. Beim MLA und bei der TK6-Prüfung sollten die folgenden Anforderungen erfüllt sein, bevor die Gesamtergebnisse einer Prüfchemikalie ermittelt werden.

— Beide Versuchsanordnungen (kurzzeitige Behandlung mit und ohne Stoffwechselaktivierung – siehe Nummer 33) wurden geprüft, sofern nicht bereits mit einer Versuchsanordnung ein positiver Befund ermittelt wurde.

— Für die Untersuchung ist eine angemessene Anzahl an Zellen und Konzentrationen verfügbar (Nummern 27 und 34-36).

— Die Kriterien für die Auswahl der höchsten Konzentration entsprechen den Kriterien unter den Nummern 28-30.

Akzeptanzkriterien für Positiv- und Negativkontrollen

56. Die von der IWGT Expert MLA Workgroup durchgeführte Untersuchung umfangreicher MLA-Daten führte zu einem internationalen Konsens in Bezug auf bestimmte Akzeptanzkriterien für den MLA (1) (2) (3) (4) (5). Daher enthält die Prüfmethode spezifische Empfehlungen für die Akzeptanz negativer und positiver Kontrollen und für die Bewertung der Ergebnisse einzelner Stoffe beim MLA. Bei der TK6-Prüfung ist die Datenbasis erheblich kleiner, und die verfügbaren Daten wurden nicht von der Arbeitsgruppe evaluiert.

57. Beim MLA sollte bei jedem Versuch geprüft werden, ob die nicht behandelte Kultur/Lösungsmittelkontrolle die Akzeptanzkriterien der IWGT MLA Workgroup ((4) und folgende Tabelle 2) in Bezug auf die folgenden Punkte erfüllt: (1) MF (wobei zu beachten ist, dass die IWGT beim MLA je nach Verwendung der Agar- oder der Microwell-Methode unterschiedliche MFs ansetzt), (2) Klonierungseffizienz (CE) zum Zeitpunkt der Mutantenselektion und (3) Suspensionswachstum (SG) der Lösungsmittelkontrolle (Formel siehe Anlage 2).

Tabelle 2

Akzeptanzkritieren des MLA

Parameter	Soft-Agar-Methode	Microwell-Methode
Mutantenhäufigkeit	35-140 × 10^{-6}	50-170 × 10^{-6}
Klonierungseffizienz	65-120 %	65-120 %
Suspensionswachstum	8- bis 32-fach (3- bis 4-stündige Behandlung) 32- bis 180-fach (24-stündige Behandlung, wenn durchgeführt)	8- bis 32-fach (3- bis 4-stündige Behandlung) 32- bis 180-fach (24-stündige Behandlung, wenn durchgeführt)

58. Beim MLA sollte bei jeder Prüfung auch bewertet werden, ob die Positivkontrolle/n mindestens eines der beiden folgenden von der IWGT-Arbeitsgruppe entwickelten Akzeptanzkriterien erfüllt/erfüllen:

— Bei der Positivkontrolle ist eine absolute Zunahme der Gesamtmutationshäufigkeit (d. h. eine Zunahme über die Häufigkeit der spontanen Hintergrundmutationen hinaus [eine induzierte MF (IMF)] von mindestens 300×10^{-6}) festzustellen. Mindestens 40 % der IMF sollten sich in der Häufigkeit kleiner Mutantenkolonien widerspiegeln.

— Die Positivkontrolle führt zu einer Zunahme der Häufigkeit kleiner Mutantenkolonien um mindestens 150×10^{-6} gegenüber der Häufigkeit bei der gleichzeitigen unbehandelten Kontrolle/Lösungsmittelkontrolle (eine induzierte Häufigkeit kleiner Mutantenkolonien von 150×10^{-6}).

59. Bei der TK-Prüfung gilt eine Untersuchung als annehmbar, wenn die gleichzeitige Negativkontrolle als zulässig für die Aufnahme in die Datenbank des Labors mit historischen Negativkontrolldaten betrachtet wird (Nummern 48 und 49). Außerdem sollten die gleichzeitigen Positivkontrollen (Nummer 32) Reaktionen hervorrufen, die mit den Reaktionen kompatibel sind, die in der Datenbank für historische Positivkontrollen erzeugt werden, und gegenüber den gleichzeitigen Negativkontrollen eine statistisch signifikante Zunahme aufweisen.

60. Bei beiden Prüfungen sollte der obere Grenzwert der bei der Positivkontrolle festgestellten Zytotoxizität identisch mit dem Wert der Versuchskulturen sein. Das RTG bzw. die RS darf nicht weniger als 10 % betragen. Die Verwendung einer einzelnen Konzentration (bzw. einer der Konzentrationen der Positivkontrollkulturen, wenn mehrere Konzentrationen verwendet werden) ist hinreichend für den Nachweis, dass die Akzeptanzkriterien der Positivkontrolle erfüllt wurden. Außerdem muss die MF der Positivkontrolle im für das Labor festgestellten annehmbaren Bereich liegen.

Beurteilung und Auswertung der Ergebnisse

61. Im Zusammenhang mit der MLA hat die Mauslymphom-Sachverständigengruppe (Mouse Lymphoma Expert Workgroup) der IWGT umfangreiche Arbeiten zur biologischen Relevanz und zu den Kriterien für eine positive Reaktion durchgeführt (4). Daher enthält diese Prüfmethode spezifische Empfehlungen für die Auswertung der mit dem MLA ermittelten Ergebnisse der Prüfchemikalien (Nummern 62-64). Bei der TK6-Prüfung ist die Datenbasis erheblich kleiner, und die verfügbaren Daten wurden nicht von der Arbeitsgruppe evaluiert. Daher sind die Empfehlungen zur Auswertung der Daten bei der TK6-Prüfung allgemeiner gehalten (Nummern 65 und 66). Weitere Empfehlungen gelten für beide Prüfungen (Nummern 67-71).

MLA

62. Ein Ansatz zur Festlegung positiver und negativer Reaktionen wird empfohlen, um sicherzustellen, dass die erhöhte MF biologisch relevant ist. Anstelle der bei anderen Prüfungen üblichen statistischen Analysen wird bei dieser Prüfung von der Verwendung einer festgelegten induzierten Mutantenhäufigkeit (d. h. einer Zunahme der MF gegenüber der gleichzeitigen Kontrolle) ausgegangen; dieser globale Bewertungsfaktor (GEF) beruht auf der Analyse der Verteilung der MF-Daten der Negativkontrolle der beteiligten Labors (4). Beim MLA unter Verwendung der Agar-Methode beträgt der GEF 90×10^{-6}, und bei der Microwell-Methode wird ein GEF von 126×10^{-6} angenommen.

63. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig positiv, wenn bei einer der getesteten Versuchsbedingungen (Nummer 33) die über den gleichzeitigen Hintergrund hinausgehende MF-Zunahme den GEF überschreitet und die Zunahme konzentrationsabhängig ist. (Dies wird beispielsweise mit einem Trendtest festgestellt.) Es wird dann davon ausgegangen, dass die Prüfchemikalie Mutationen in diesem Versuchssystem auslösen kann.

64. Sofern alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, wird eine Prüfchemikalie als eindeutig negativ bewertet, wenn bei allen geprüften Versuchsbedingungen (Nummer 33) keine konzentrationsabhängige Reaktion festgestellt wurde bzw. – wenn eine Zunahme der MF zu verzeichnen ist – wenn die Zunahme der MF den GEF nicht überschreitet. Es wird dann davon ausgegangen, dass die Prüfchemikalie keine Mutationen in diesem Versuchssystem auslösen kann.

TK6

65. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig positiv, wenn bei einer der getesteten Versuchsbedingungen (siehe Nummer 33):

— mindestens eine der Versuchskonzentrationen weist gegenüber der gleichzeitigen Negativkontrolle eine statistisch signifikante Zunahme auf,

— ein geeigneter Trendtest zeigt, dass die Zunahme konzentrationsabhängig ist (Nummer 33),

— Ergebnisse liegen außerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten (z. B. auf einer Poisson-Verteilung beruhende Kontrollgrenze von 95 %, siehe Nummer 48).

Sind all diese Kriterien erfüllt, wird davon ausgegangen, dass die Prüfchemikalie in diesem Versuchssystem Mutationen auslösen kann. Für Empfehlungen zu den am besten geeigneten statistischen Methoden siehe Literaturhinweise (66) (67).

66. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig negativ, wenn in allen getesteten Versuchsbedingungen (siehe Punkt 33):

— keine der Versuchskonzentrationen eine statistisch signifikante Zunahme gegenüber der gleichzeitigen Negativkontrolle aufweist,

— die Bewertung anhand einer geeigneten Trendprüfung keine konzentrationsabhängige Zunahme ergibt,

— alle Ergebnisse innerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten liegen (z. B. auf einer Poisson-Verteilung beruhende Kontrollgrenze von 95 %, siehe Nummer 48).

Es wird dann davon ausgegangen, dass die Prüfchemikalie keine Mutationen in diesem Versuchssystem auslösen kann.

MLA und TK6:

67. Wenn die Höchstkonzentration auf der Zytotoxizität beruht, sollte bei der Höchstkonzentration ein relatives Gesamtwachstum bzw. eine relative Überlebensrate von 10-20 % erreicht werden. Allgemeiner Konsens ist, dass bei der Auswertung positiver Ergebnisse ausschließlich mit RTG- bzw. RS-Werten im Bereich zwischen 10 und 20 % Vorsicht geboten ist und dass Ergebnisse dann nicht als positiv zu bewerten sind, wenn die Zunahme der MF ausschließlich im Umfang von höchstens eines RTG- bzw. RS-Werts von 10 % (wenn ermittelt) erfolgt (2) (59).

68. In einigen Fällen können zusätzliche Informationen bei der Feststellung hilfreich sein, dass eine Prüfchemikalie nicht mutagen wirkt, wenn keine Kultur vorliegt, bei der ein RTG-Wert im Bereich von 10-20 % der RTG-/RS-Werte ermittelt wird. Dies gilt für folgende Fälle: (1) Es gibt bei einer Reihe von Datenpunkten im Bereich von 20-100 % der RTG-/RS-Werte keine Anzeichen für eine Mutagenität (z. B. keine Dosis-Reaktion, keine Mutantenhäufigkeiten über die in der gleichzeitigen Negativkontrolle oder die historisch ermittelten Häufigkeiten hinaus), und mindestens ein Datenpunkt liegt im Bereich von 20-25 % der RTG-/RS-Werte. (2) Es gibt bei einer Reihe von Datenpunkten im Bereich von 25-100 % der RTG-/RS-Werte keine Anzeichen für eine Mutagenität (z. B. keine Dosis-Reaktion, keine Mutantenhäufigkeiten über die in der gleichzeitigen Negativkontrolle festgestellten Häufigkeiten oder über die historisch ermittelten Häufigkeiten hinaus) und einen negativen Datenpunkt geringfügig unter 10 % der RTG-/RS-Werte. In beiden Fällen kann für die Prüfchemikalie ein negativer Befund festgestellt werden.

69. Bei einer eindeutig positiven oder negativen Reaktion ist eine Verifizierung nicht erforderlich.

70. In den Fällen, in denen die Reaktion, wie oben beschrieben, weder eindeutig negativ noch eindeutig positiv ist, und/oder um die biologische Relevanz eines Ergebnisses zu untermauern, sollten die Daten durch eine fachkundige Beurteilung und/oder anhand weiterer Untersuchungen bewertet werden. Die Durchführung eines Wiederholungsversuchs, möglicherweise unter veränderten Versuchsbedingungen [z. B. Abstände der Konzentrationen, um die Wahrscheinlichkeit der Ermittlung von Datenpunkten im RTG-/RS-Bereich von 10-20 % zu erhöhen, sowie die Verwendung anderer Stoffwechselaktivierungsbedingungen (d. h. Konzentration oder Herkunft von S9) und eine Änderung der Behandlungsdauer], könnte hilfreich sein.

71. In seltenen Fällen erlaubt der Datensatz selbst nach weiteren Untersuchungen keine definitive Aussage zu positiven oder negativen Ergebnissen. Daher sollte die Reaktion der Prüfchemikalie als nicht eindeutig eingestuft werden (d. h. für ein positives und für ein negatives Ergebnis besteht die gleiche Wahrscheinlichkeit).

PRÜFBERICHT

72. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalie:

— Herkunft, Partienummer, ggf. begrenztes Verwendungsdatum;

— Stabilität der Prüfchemikalie, falls bekannt;

— Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie im Lösungsmittel, falls bekannt;

— Messung des pH-Werts, der Osmolalität und ggf. des Niederschlags im Kulturmedium, dem die Prüfchemikalie zugegeben wurde.

Einkomponentiger Stoff:

— physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;

— chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:

— So weit wie möglich Charakterisierung durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

Lösungsmittel:

— Begründung der Auswahl des Lösungsmittels;

— Anteil des Lösungsmittels im endgültigen Kulturmedium.

Zellen:

Bei Labor-Masterkulturen:

— Art und Herkunft der Zellen und Historie des Prüflabors;

— Karyotypmerkmale und/oder Modalzahl der Chromosomen;

— zum Erhalt der Zellkultur verwendete Verfahren;

— Nichtvorhandensein von Mycoplasma;

— Verdopplungszeit der Zellen.

Prüfbedingungen:

— Begründung der Wahl der Konzentrationen und der Anzahl der Zellkulturen darunter z. B. Angaben zur Zytotoxizität und Löslichkeitsgrenze;

— Medienzusammensetzung, CO_2-Konzentration, Feuchtigkeit;

— Konzentration der Prüfchemikalie, ausgedrückt als Endkonzentration im Kulturmedium (z. B. µg oder mg/ml oder mM des Kulturmediums);

— Konzentration (und/oder Volumen) des Lösungsmittels und der beigegebenen Prüfchemikalie;

— Inkubationstemperatur;

— Inkubationszeit;

— Behandlungsdauer;

— Zelldichte während der Behandlung;

— Art und Zusammensetzung des Stoffwechselaktivierungssystems (Herkunft von S9, Zubereitungsmethode des S9-Gemisches, Konzentration oder Volumen des S9-Gemisches und S9 im Endmedium, Qualitätskontrollen von S9);

— Positiv- und Negativkontrollstoffe, Endkonzentrationen für die jeweiligen Behandlungsbedingungen;

— Dauer der Expressionszeit (ggf. einschließlich Anzahl der überimpften Zellen, Subkulturen und Medienwechsel);

— Bezeichnung und Konzentration des selektierenden Agens;

— beim MLA verwendete Methode (Agar oder Microwell);

— Akzeptanzkriterien für die Prüfungen;

— Methoden zur Zählung der lebensfähigen und mutierten Zellen;

— Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität;

— evtl. zusätzliche Angaben zur Zytotoxizität und zum verwendeten Verfahren;

— Inkubationszeiten nach dem Plattieren;

— Angaben zur Berücksichtigung der Kolonien nach Größe und Typ (ggf. einschließlich Kriterien für „kleine“ und „große“ Kolonien);

— Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig;

— Methoden zur Bestimmung des pH-Werts, der Osmolalität (wenn durchgeführt) und des Niederschlags (wenn relevant).

Ergebnisse:

— Anzahl der behandelten Zellen und Anzahl der subkultivierten Zellen der einzelnen Kulturen;

— Toxizitätsparameter (RTG beim MLA und RS bei der TK6-Prüfung);

— Anzeichen für Ausfällungen und Bestimmungszeit;

— Anzahl der plattierten Zellen im selektierenden und im nicht selektierenden Medium

— Anzahl der Kolonien im nicht selektierenden Medium und Anzahl der resistenten Kolonien im selektierenden Medium sowie entsprechende Mutantenhäufigkeiten;

— Koloniegröße bei Negativ- und Positivkontrollen und die Angabe, ob die Prüfchemikalie zumindest in einer Konzentration positiv ist, sowie die entsprechenden Mutantenhäufigkeiten;

— nach Möglichkeit Dosis-Reaktions-Verhältnis;

— Daten zu gleichzeitigen Negativkontrollen (Lösungsmittelkontrollen) und Positivkontrollen (Konzentrationen und Lösungsmittel);

— historische Daten zu Negativkontrollen (Lösungsmittelkoontrollen) und Positivkontrollen (Konzentrationen und Lösungsmittel) mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen; Anzahl der Prüfungen, auf denen die historischen Kontrollen beruhen;

— statistische Analysen (für einzelne Kulturen und (ggf.) für gepoolte Replikatkulturen) sowie ggf. p-Werte; beim MLa zusätzlich die GEF-Bewertung.

Erörterung der Ergebnisse.

Schlussfolgerung.

LITERATUR

(1) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J. (Berichterstatter), 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. und 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. und 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. und 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. und 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. und 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. und 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. und 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. und 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. und 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. und Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169-181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. und Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237-242.

(13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. und Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151 (1): 161-174.

(14) Liber, H.L., Call, K.M. und 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. und 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. und 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. und Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203-214.

(18) Amundson, S.A. und 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. und Gollapudi, B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ −3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.

(20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. und 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. und Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439-452.

(22) Brusick, D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): 879-886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. und 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. und 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. und 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. und Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): 61-108.

(28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. und Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243-253.

(29) Sawyer, J.R., Moore, M.M. und Hozier, J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181-193.

(30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. und Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$−3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127-131.

(31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. und Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+}/^{-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): 35-42.

(32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. und DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation. Res., 373 (2): 157-165.

(33) Clark, L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. und 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. und 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. und 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. (Manuskript in Vorbereitung).

(38) Lloyd, M. und Kidd, D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, Hrsg. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.

(39) Mei, N., Guo, X. und Moore, M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. In: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan, Z, und Caldwell (Hrsg.) , 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber, H.L. und 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. und 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. und 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. und 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. und Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173-215.

(45) Natarajan, , A.T., Tates, , A.D, Van Buul, , P.P.W., Meijers, M. und 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. und 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., u. a. (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. und 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. und 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., u. a., Hrsg., Elsevier, North-Holland, S. 85-88.

(50) Galloway, S.M., u. a. (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. und 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). Stockholmer Übereinkommen über persistente organische Schadstoffe, Umweltprogramm der Vereinten Nationen (UNEP).

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

(54) Zamora, , P.O., Benson, , J.M., Li, , A.P. und 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. und 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., u. a. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Hrsg.), Cambridge University Press, S. 66-101.

(57) Morita, T., Honma, M. und 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. und 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. Abrufbar unter:[https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].

(60) Honma, M. und 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. und Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient ($TK^{-/-}$) Mutants from L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363-378.

(62) Liber, H.L., Yandell, D.W. und 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. und 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. und 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

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

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Aneugen: Eine Chemikalie oder ein Prozess, die/der durch Wechselwirkung mit den Komponenten des mitotischen oder meiotischen Zellteilungszyklus zu Aneuploidie in Zellen oder Organismen führt.

Aneuploidie: Eine Abweichung von der normalen diploiden (oder haploiden) Chromosomenzahl durch ein einziges Chromosom oder mehr, nicht aber durch einen ganzen (oder mehrere) Chromosomensatz/-sätze (Polyploidie).

Basenpaaraustauschmutagene: Chemikalien, die den Austausch von Basenpaaren in der DNA verursachen.

Chemikalie: Ein Stoff oder ein Gemisch.

Expressionszeit des Phänotyps: Die Zeit nach der Behandlung, in der sich die genetische Alteration im Genom ausprägt und bereits vorhandene Genprodukte so weit abgebaut werden, dass die phänotypischen Eigenschaften verändert werden.

Genotoxisch: Ein allgemeiner Begriff, der alle Typen von DNA- oder Chromosomenschädigungen umfasst, einschließlich DNA-Brüchen, Addukt-Neubildungen, Mutationen, Chromosomenaberrationen sowie Aneuploidie. Nicht alle genotoxischen Effekte führen zu Mutationen oder stabilen Chromosomenschäden.

Klastogen: Chemikalie oder Prozess, die/der strukturelle Chromosomenaberrationen in Zell- oder Organismenpopulationen verursacht.

Klonierungseffizienz: Der Prozentanteil der mit einer niedrigen Dichte plattierten Zellen, die sich zu einer zählbaren Kolonie entwickeln können.

Lösungsmittelkontrolle: Veränderung der Chromosomenstruktur, nachweisbar durch mikroskopische Untersuchung des Metaphase-Stadiums der Zellteilung, äußert sich in Form von Deletionen und Fragmenten, intrachromosomalen oder reziproken Translokationen.

Mitotische Rekombination: Während der Mitose Rekombination homologer Chromatiden, die zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen oder einem Verlust der Heterozygotie führen kann.

Mutagen: Auslöser einer Erbgutveränderung der DNA-Basenpaarsequenz(en) in Genen oder in der Chromosomenstruktur (Chromosomenaberrationen).

Mutantenhäufigkeit (MF): Verhältnis der Anzahl der mutierten Zellen zur Anzahl der lebensfähigen Zellen.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

Rasterschubmutagene: Chemikalien, die die Addition oder Deletion eines oder mehrerer Basenpaare im DNA-Molekül verursachen.

Relative Überlebensrate (RS): Die relative Überlebensrate wird als Maßstab für die behandlungsbedingte Zytotoxizität bei der TK6 angenommen. Dabei handelt es sich um die relative Klonierungseffizienz (CE) von unmittelbar nach der Behandlung ausplattierten Zellen bereinigt um Zellverluste während der Behandlung bezogen auf die Klonierungseffizienz der Negativkontrolle.

Relatives Gesamtwachstum (RTG): Das relative Gesamtwachstum ist ein Maß der behandlungsbedingten Zytotoxizität beim MLA. Das RTG ist ein Maß für das relative (auf die Vehikelkontrolle bezogene) Wachstum der Prüfkulturen während der Behandlung, der zweitägigen Expression und der Klonierung der selektionierten Mutanten im Laufe der Prüfung. Das RSG der einzelnen Prüfkulturen wird mit der relativen Klonierungseffizienz der Prüfkultur zum Zeitpunkt der Mutantenselektion multipliziert und bezogen auf die Klonierungseffizienz der Negativkontrolle/Lösungsmittelkontrolle ausgedrückt (Clive und Spector, 1975).

Relatives Suspensionswachstum (RSG): Beim MLA das innerhalb von zwei Tagen zu verzeichnende relative Gesamtwachstum der Suspension der Prüfkultur bezogen auf das Gesamtwachstum der Suspension der Negativkontrolle/Lösungsmittelkontrolle in zwei Tagen (Clive und Spector, 1975). Das RSG sollte das relative Wachstum der Prüfkultur bezogen auf die Negativkontrolle/Lösungsmittelkontrolle während der Behandlungszeit beinhalten.

S9-Gemisch: Gemisch aus der S9-Leberfraktion und für die metabolische Enzymaktivität notwendigen Ko-Faktoren.

S9-Leberfraktion: Überstand des Leberhomogenats nach Zentrifugieren mit 9 000 g, d. h. Rohleberextrakt.

Suspensionswachstum (SG): Die n-fache Zunahme der Anzahl der Zellen im Laufe der Behandlung und der Expression während des MLA. Das SG wird durch Multiplikation der n-fachen Zunahme an Tag 1 mit der n-fachen Zunahme an Tag 2 bei der kurzzeitigen (3- bis 4-stündigen) Behandlung berechnet. Bei einer 24-stündigen Behandlung ist das SG die n-fache Zunahme während der 24-stündigen Behandlung multipliziert mit den n-fachen Zunahmen an den Expressionstagen 1 und 2.

Unbehandelte Kontrollen: Kulturen, die nicht behandelt werden (d. h. weder mit der Prüfchemikalie noch mit Lösungsmittel), jedoch in gleicher Weise aufgearbeitet werden wie die Kulturen, die mit der Prüfchemikalie behandelt werden.

Vorwärtsmutation: Genmutation vom Elterntyp zur mutierten Form, die eine Veränderung oder den Ausfall der Enzymaktivität oder der Funktion des kodierten Proteins bewirkt.

Zytotoxizität: Bei den Assays im Rahmen dieser Prüfmethode wird die Zytotoxizität als Reduzierung des relativen Gesamtwachstums (RTG) beim MLA bzw. der relativen Überlebensrate (RS) bei der TK6-Prüfung bezeichnet.

Anlage 2

FORMELN

Relative Populationsverdopplung (RPD)

Für die Durchführung des MLA mit der Agar- und der Microwell-Methode gilt:

Zytotoxizität ist das relative Gesamtwachstum (RTG); dieses beinhaltet das relative Suspensionswachstum (RSG) während der zweitägigen Expressionszeit und die zum Zeitpunkt der Mutantenselektion ermittelte relative Klonierungseffizienz (RCE). RTG, RSG und RCE werden in Prozent ausgedrückt.

Berechnung des RSG: Als Suspensionswachstum 1 (SG_1) wird das Wachstum zwischen Tag 0 und Tag 1 bezeichnet (Zellkonzentration an Tag 1 / Zellkonzentration an Tag 0). Suspensionswachstum 2 (SG_2) ist das Wachstum zwischen Tag 1 und Tag 2 (Zellkonzentration an Tag 2 / Zellkonzentration an Tag 1). Als RSG wird das Gesamtwachstum der Suspension ($SG_1 \times SG_2$) der behandelten Kultur bezogen auf die unbehandelte Kontrolle / Lösungsmittelkontrolle bezeichnet. Dabei gilt: RSG = $[SG_{1(test)} \times SG_{2(test)}] / [SG_{1(control)} \times SG_{2(control)}]$ SG_1 sollte anhand der Ausgangszellkonzentration bei Beginn der Behandlung berechnet werden. Damit werden unterschiedliche Zytotoxizitätswirkungen in der Prüfkultur / den Prüfkulturen während der Behandlung berücksichtigt.

Als RCE wird die relative Klonierungseffizienz der Prüfkultur bezogen auf die relative Klonierungseffizenz der unbehandelten Kontrolle / Lösungsmittelkontrolle zum Zeitpunkt der Mutantenselektion bezeichnet.

Relatives Gesamtwachstum (RTG): RTG = RSG × RCE

TK6

Relative Überlebensrate (RS):

Die Zytotoxizität wird anhand der relativen Überlebensrate ermittelt, d. h. anhand der Klonierungseffizienz (CE) von Zellen, die nach der Behandlung umgehend plattiert werden; dabei ist eine Bereinigung um Zellverluste während der Behandlung im Vergleich zur Klonierungseffizienz bei Negativkontrollen (mit einer Überlebensrate von 100 %) vorzunehmen. Die Bereinigung um Zellverluste bei der Behandlung kann wie folgt vorgenommen werden:

$$\text{Bereinigte CE} = \text{CE} \times \frac{\textit{Anzahl der Zellen am Ende der Behandlung}}{\textit{Anzahl der Zellen bei Beginn der Behandlung}}$$

Die RS einer mit einer Prüfchemikalie behandelten RS wird wie folgt berechnet:

$$RS = \frac{\textit{Bereinigte CE der behandelten Kultur}}{\textit{Bereinigte CE der Lösungsmittelkontrolle}} \times 100$$

Mutantenhäufigkeit bei MLA und TK6

Als Mutantenhäufigkeit (MF) wird die Klonierungseffizienz von Mutantenkolonien im selektierenden Medium (CE_M) bereinigt um die Klonierungseffizienz im nicht selektierenden Medium zum Zeitpunkt der Mutantenselektion (CE_V) bezeichnet (d. h. MF = CE_M/CE_V). Im Folgenden wird die Berechnung der Klonierungseffizienz-Werte beim Klonieren mit der Agar-Methode und der Microwell-Methode beschrieben.

MLA mit der Agar-Methode: Beim MLA mit der Soft-Agar-Methode werden die Anzahl der Kolonien auf der Platte zur Mutantenselektion (C_M) und die Anzahl der Kolonien auf der Platte, die nicht zur Selektion von Mutanten, sondern zur Bestimmung der Klonierungseffizienz (Anzahl der lebensfähigen Klone) (C_V) vorgesehen ist, unmittelbar durch Zählen der Klone ermittelt. Wenn 600 Zellen zur Bestimmung der Klonierungseffizienz (CE) auf der Platte zur Mutantenselektion (CE_M) und auf der Platte, die nicht zur Selektion von Mutanten, sondern zur Bestimmung der Klonierungseffizienz (Anzahl der lebensfähigen Klone) (CE_V) vorgesehen ist, ausplattiert wurden, werden 3×10^6 Zellen zur Mutantenselektion verwendet.

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

MLA und TK6 – Microwell-Methode: Wenn der MLA mit der Microwell-Methode durchgeführt wird, werden C_M und C_V als Produkt der Gesamtzahl der Microwells (TW) und der wahrscheinlichen Anzahl der Kolonien pro Well (P) auf den Microwell-Platten ermittelt.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Beim Null-Term der Poisson-Verteilung (Furth u. a., 1981) wird P wie folgt berechnet:

$$P = - \ln (EW / TW)$$

Wobei gilt: EW = leere Wells und TW = Gesamtzahl der Wells. Daher ist

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

Bei Durchführung des MLA mit der Microwell-Methode wird die Mutantenhäufigkeit (kleine und große Kolonien) für kleine und große Kolonien auf die gleiche Weise jeweils anhand der Anzahl leerer Wells berechnet.

Bei der TK6-Prüfung wird die Mutantenhäufigkeit (kleine und große Kolonien) danach bestimmt, ob die Mutanten früh oder später auftreten.

B.68 IN-VITRO-PRÜFMETHODE MIT KURZZEITEXPOSITION ZUR ERMITTLUNG VON i) CHEMIKALIEN, DIE SCHWERE AUGENSCHÄDEN VERURSACHEN, UND ii) CHEMIKALIEN, DIE KEINE EINSTUFUNG ALS AUGENREIZEND ODER SCHWER AUGENSCHÄDIGEND ERFORDERN

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode (PM) entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 491 (2017). Die Prüfmethode zur Untersuchung unter Kurzzeitexposition ist eine *In-Vitro*-Methode, die unter bestimmten Umständen und mit bestimmten Einschränkungen zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) verwendet werden kann, die schwere Augenschädigungen bzw. Augenreizungen im Sinne des GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung) (UN) (1) und der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (CLP-Verordnung) ([1]) induzieren.

2. Über viele Jahre wurde das augengefährdende Potenzial von Chemikalien in erster Linie mit einem *In-vivo*-Kaninchenaugentest (PM B.5 (8), entsprechend OECD TG 405) geprüft. Es herrscht allgemeiner Konsens darüber, dass der *In-vivo*-Kaninchenaugentest in absehbarer Zukunft nicht in vollem Umfang durch eine einzelne alternative *In-vitro*-Prüfung ersetzt werden kann, die geeignet wäre, das gesamte Spektrum augenreizender bzw. schwer augenschädigender Reaktionen auf unterschiedliche Chemikalienklassen vorherzusagen. Unter Umständen könnte der Kaninchenaugentest jedoch durch strategische Kombinationen mehrerer alternativer Prüfmethoden im Rahmen einer (gestuften) Prüfstrategie vollständig ersetzt werden (2). Der Top-down-Ansatz ist zur Prüfung von Chemikalien ausgelegt, bei denen nach verfügbaren Informationen davon ausgegangen werden kann, dass sie stark reizend wirken oder schwere Augenschäden hervorrufen können. Mit dem Bottom-up-Ansatz werden Chemikalien geprüft, bei denen ausgehend von verfügbaren Informationen angenommen werden kann, dass sie keine Augenreizungen in einem Umfang induzieren, der eine Einstufung erfordern würde. Die Kurzzeit-Prüfmethode wird nicht als geeignet betrachtet, den *In-vivo*-Kaninchenaugentest vollständig zu ersetzen. Sie kann jedoch im Rahmen einer gestuften Prüfstrategie zu gesetzgeberischen Einstufungs- und Kennzeichnungszwecken verwendet werden (beispielsweise mit dem Top-down-/Bottom-up-Ansatz), um (i) Chemikalien, die schwere Augenschädigungen (UN-GHS-/CLP-Kategorie 1) induzieren, und (ii) Chemikalien (außer stark flüchtigen Stoffen und allen festen Chemikalien mit Ausnahme von Tensiden), die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung) erfordern, ohne weitere Prüfungen zu erkennen (1) (2). Bei Chemikalien, für die aufgrund der Kurzzeit-Prüfmethode weder eine schwer augenschädigende Wirkung (UN-GHS-/CLP-Kategorie 1) vorhergesagt noch erwartet wird, dass sie Augenreizungen oder schwere Augenschädigungen induzieren (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung), müssen weitere Prüfungen durchgeführt werden, um eine endgültige Einstufung vornehmen zu können. Außerdem sollten die zuständigen Regulierungsbehörden konsultiert werden, bevor die Kurzzeitprüfung mit einem Bottom-Up-Ansatz unter Berücksichtigung einer anderen Klassifizierungsregelung als der des UN GHS bzw. der CLP-Verordnung durchgeführt wird. Die Auswahl der am besten geeigneten Prüfmethode und die Anwendung dieser Prüfmethode sollten unter Berücksichtigung des OECD-Leitliniendokuments über integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA = Integrated Approaches to Testing and Assessment) zur Untersuchung von schweren Augenschädigungen und von Augenreizungen (14) erfolgen.

3. Diese Prüfmethode beschreibt die Verfahrensschritte zur Beurteilung des augengefährdenden Potenzials einer Prüfchemikalie anhand ihrer Fähigkeit, in der Kurzzeitprüfung eine zytotoxische Wirkung hervorzurufen. Die zytotoxische Wirkung von Chemikalien auf Hornhaut-Epithelzellen ist eine erhebliche Wirkungsweise, die zu Schädigungen des Hornhautepithels und zu Augenreizungen führt. Die Zellviabilität wird bei der Kurzzeit-Prüfmethode durch Enzymkonversion des Vitalfarbstoffs MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, auch als Thiazolyl-Blau-Tetrazoliumbromid bezeichnet) zu einem blauen Formazan-Salz gemessen, das nach seiner Extraktion aus Geweben quantifiziert wird (3). Die ermittelte Zellviabilität wird mit der Lösungsmittelkontrolle verglichen (relative Viabilität) und zur Abschätzung der potenziellen Augengefährdung durch die Prüfchemikalie verwendet. Prüfchemikalien sind dann als UN-GHS-/CLP-Kategorie 1 einzustufen, wenn sowohl die 5- als auch die 0,05 %ige Konzentration zu einer Zellviabilität von kleiner oder gleich (≤) 70 % führt. Die UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung ist für Prüfchemikalien anzunehmen, bei denen sowohl die 5- als auch die 0,05 %ige Konzentration eine Zellviabilität von mehr als (>) 70 % ergibt.

4. Der Begriff „Prüfchemikalie" bezeichnet bei dieser Prüfmethode das, was untersucht wird, und bezieht sich nicht auf die Anwendbarkeit der Kurzzeit-Prüfmethode zur Prüfung von Stoffen und/oder Gemischen. Es gelten die Begriffsbestimmungen der Anlage.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

5. Diese Prüfmethode beruht auf einem von der Kao Corporation entwickelten Protokoll (4), das zwei getrennten Validierungsstudien unterzogen wurde: einer durch den Validierungsausschuss der Japanischen Gesellschaft für Alternativen zu Tierversuchen (JSAAE = Japanese Society for Alternative to Animal Experiments) (5) und einer durch

([1]) Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

das Japanische Zentrum zur Validierung alternativer Methoden (JaCVAM = Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) (6). Das NICEATM und der ICCVAM haben ausgehend von den Berichten über die Validierungsstudien und von Background Review Documents zur Prüfmethode einen Peer-Review durchgeführt (7).

6. Bei der Ermittlung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen), die schwere Augenschädigungen hervorrufen (UN-GHS-/CLP-Kategorie 1) (1), ergaben sich für die mit der Kurzzeit-Prüfmethode an 125 Chemikalien (sowohl Stoffe als auch Gemische) ermittelten Daten eine Gesamtgenauigkeit von 83 % (104/125), eine Falsch-positiv-Rate von 1 % (1/86) und eine Falsch-negativ-Rate von 51 % (20/39) im Vergleich zum *In-vivo*-Kaninchenaugentest (7). Die ermittelte Falsch-negativ-Rate ist in diesem Zusammenhang nicht maßgeblich, da alle Prüfchemikalien, bei denen eine Zellviabilität von ≤ 70 % bei einer Konzentration von 5 % und von > 70 % bei einer Konzentration von 0,05 % gemessen wird, anschließend je nach rechtlichen Anforderungen und gemäß der sequenziellen Prüfstrategie und den gegenwärtig empfohlenen evidenzbasierten Bewertungsansätzen (weight-of-evidence approach) ohnehin mit anderen angemessen validierten *In-vitro*-Prüfmethoden bzw. – als letzte Möglichkeit – mit dem *In-vivo*-Kaninchenaugentest geprüft werden (1) (8). Hauptsächlich wurden einkomponentige Stoffe geprüft; begrenzte Daten liegen jedoch auch über die Prüfung von Gemischen vor. Die Prüfmethode ist dennoch für die Prüfung von mehrkomponentigen Stoffen und Gemischen technisch geeignet. Bevor diese Prüfmethode jedoch für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regelungszweck verwendet wird, sollte geprüft werden, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefert, und wenn dem so ist, warum. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs gesetzlich vorgeschrieben ist. Im Hinblick auf die Eignung der Kurzzeit-Prüfmethode zur Entscheidung über die Einstufung von Prüfchemikalien in die UN-GHS-/CLP-Kategorie 1 wurden keine sonstigen spezifischen Defizite festgestellt. Prüfer können diese Prüfmethode für Prüfchemikalien einsetzen, und eine Zellviabilität von ≤ 70 % bei Konzentrationen von 5 % und von 0,05 % sollte als Indikator für eine schwer augenschädigende Wirkung betrachtet werden, nach der ohne weitere Prüfungen eine Einstufung in die UN-GHS-/CLP-Kategorie 1 vorzunehmen ist.

7. Bei der Ermittlung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen), bei denen eine Einstufung aufgrund von Augenreizungen und schweren Augenschädigungen nicht erforderlich ist (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung), ergaben sich für die mit der Kurzzeit-Prüfmethode an 130 Chemikalien (sowohl Stoffe als auch Gemische) ermittelten Daten eine Gesamtgenauigkeit von 85 % (110/130), eine Falsch-negativ-Rate von 12 % (9/73) und eine Falsch-positiv-Rate von 19 % (11/57) im Vergleich zum *In-vivo*-Kaninchenaugentest (7). Wenn stark flüchtige Stoffe und feste Stoffe (außer Tensiden) aus dem Datensatz ausgeschlossen werden, erhöht sich die Gesamtgenauigkeit auf 90 % (92/102), die Falsch-negativ-Rate sinkt auf 2 % (1/54), und die Falsch-positiv-Rate bleibt bei 19 % (9/48) (7). Insoweit bestehen die potenziellen Defizite der Kurzzeit-Prüfmethode bei der Ermittlung von Prüfchemikalien, bei denen im Hinblick auf die Augenreizungen und schwere Augenschädigungen keine Einstufung vorzunehmen ist (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung) in einer hohen Falsch-negativ-Rate bei i) stark flüchtigen Stoffen mit Dampfdrücken über 6 kPa und ii) festen Chemikalien (Stoffen und Gemischen) mit Ausnahme von Tensiden und Gemischen, die ausschließlich Tenside beinhalten. Bei diesen Chemikalien ist die Kurzzeit-Prüfmethode nicht anzuwenden (7).

8. Zusätzlich zu den in den Nummern 6 und 7 genannten Chemikalien enthält der mit der Kurzzeit-Prüfmethode generierte Datensatz auch interne Daten zu 40 Gemischen, mit denen sich im Vergleich zum *In-vivo*-Draize-Augentest eine Genauigkeit von 88 % (35/40), eine Falsch-positiv-Rate von 50 % (5/10) und eine Falsch-negativ-Rate von 0 % (0/30) bei den Vorhersagen für Gemische ergaben und bei denen eine Einstufung nach dem UN GHS bzw. der CLP-Verordnung nicht erforderlich ist (9). Daher kann die Kurzzeit-Prüfmethode nicht nur bei festen Stoffen, sondern auch bei Gemischen (außer bei festen Gemischen mit Ausnahme von Gemischen, die ausschließlich Tenside enthalten) verwendet werden, um zu ermitteln, ob eine Einstufung nicht erforderlich ist (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung). Auch Gemische mit Stoffen mit Dampfdrücken von über 6 kPa sollten mit besonderer Sorgfalt untersucht werden, damit Gefahren nicht unterschätzt werden. Ob die Verwendung der Kurzzeit-Prüfmethode in Betracht kommt, sollte daher auf Einzelfallbasis entschieden werden.

9. Da die Wirkung einer erheblichen Anzahl von in die UN-GHS-/CLP-Kategorie 1 einzustufenden Chemikalien unterschätzt wurde und die Chemikalien fälschlich in die Kategorien 2, 2A oder 2B eingestuft wurden bzw. da die Wirkung einer erheblichen Anzahl von Chemikalien, für die eine Einstufung nicht erforderlich ist (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung), überschätzt wurde und die Chemikalien fälschlich in die Kategorien 2, 2A oder 2B eingestuft wurden, ist die Kurzzeit-Prüfmethode nicht zur Ermittlung von Prüfchemikalien geeignet, die in die UN-GHS-/CLP-Kategorie 2 oder in die UN-GHS-Kategorien 2A (augenreizend) oder 2B (leicht augenreizend) einzustufen sind (7). Bei diesen Chemikalien können weitere Prüfungen mit einer anderen geeigneten Methode erforderlich sein.

10. Die Kurzzeit-Prüfmethode ist für Prüfchemikalien geeignet, die gelöst oder mindestens 5 Minuten in physiologischer Kochsalzlösung, in 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in Kochsalz oder in Mineralöl gleichmäßig suspendiert wurden. Für nicht lösliche Prüfchemikalien und für Prüfchemikalien, die nicht mindestens 5 Minuten gleichmäßig in physiologischer Kochsalzlösung, 5 % DMSO in Kochsalz oder in Mineralöl suspendiert werden können, ist die Kurzzeit-Prüfmethode nicht geeignet. In Anbetracht der kurzzeitigen Exposition kann bei der Kurzzeit-Prüfung Mineralöl verwendet werden. Daher ist die Kurzzeit-Prüfmethode für die Vorhersage des augengefährdenden Potenzials wasserunlöslicher Prüfchemikalien (z. B. langkettiger Fettalkohole oder Ketone) geeignet, sofern die Chemikalien in mindestens einem der drei oben genannten Lösungsmittel gemischt werden können (4).

11. Der Begriff „Prüfchemikalie" bezeichnet bei dieser Prüfmethode das, was untersucht wird, ([1]) und bezieht sich nicht auf die Anwendbarkeit der Kurzzeit-Prüfmethode zur Prüfung von Stoffen und/oder Gemischen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

12. Die Kurzzeit-Prüfmethode ist ein zytotoxizitätsbasierter *In-vitro*-Assay, der an einem konfluenten Monolayer von SRIC-Zellen (Kaninchen-Corneazellen des Statens Serum Institut) durchgeführt wird, die auf einer Polycarbonat-Mikrotiterplatte mit 96 Wells kultiviert wurden (4). Nach einer fünfminütigen Exposition gegenüber einer Prüfchemikalie wird die relative Viabilität von SIRC-Zellen mit der MTT-Prüfung gemessen (4). Eine reduzierte Zellviabilität ist ein Indikator für potenzielle schädliche Wirkungen, die zu Augenschäden führen können.

13. Es wurde berichtet, dass 80 % einer auf ein Kaninchenauge applizierten Lösung innerhalb von drei bis vier Minuten bzw. beim Menschen sogar mehr als 80 % innerhalb von einer bis zwei Minuten über den Bindehautsack ausgeschieden werden (10). Bei der Kurzzeit-Prüfmethode wird versucht, diese Expositionszeiten in etwa einzuhalten; dabei wird die Zytotoxizität als Endpunkt für die Beurteilung der Schädigung der SIRC-Zellen nach einer fünfminütigen Exposition gegenüber der Prüfchemikalie angenommen.

NACHWEIS DER LEISTUNGSFÄHIGKEIT

14. Vor der routinemäßigen Anwendung der Kurzzeitprüfung nach dieser Prüfmethode sollten Labors die erforderliche technische Befähigung durch eine ordnungsgemäße Einstufung der elf in Tabelle 1 empfohlenen Stoffe nachweisen. Diese Stoffe wurden als repräsentativ für das gesamte Spektrum an Reaktionen mit schweren Augenschädigungen oder Augenreizungen nach den Ergebnissen von *In-vivo*-Kaninchenaugentests (TG 405) und nach der UN-GHS-/CLP-Klassifizierung ausgewählt (1). Weitere Auswahlkriterien waren die Verfügbarkeit der Stoffe im Handel sowie das Vorliegen hochwertiger *In-vivo*-Referenzdaten und hochwertiger *In-vitro*-Daten, die mit der Kurzzeit-Prüfmethode ermittelt wurden (3). Wenn ein dort genannter Stoff nicht verfügbar ist bzw. wenn dies gerechtfertigt ist, kann ein anderer Stoff verwendet werden, für den geeignete *In-vivo*- und *In-vitro*-Referenzdaten verfügbar sind, sofern die hier beschriebenen Auswahlkriterien berücksichtigt werden.

Tabelle 1

Liste der Leistungsstoffe

Stoff	CAS-Nr.	Chemikalienklasse ([1])	Aggregatzustand	*In-vivo*-UN-GHS-/CLP-Kat. ([2])	Lösungsmittel in der Kurzzeitprüfung	UN-GHS-/CLP-Kat. nach Kurzzeitexposition
Benzalkoniumchlorid (10 %, wässrig)	8001-54-5	Oniumverbindung	Flüssigkeit	Kategorie 1	Kochsalzlösung	Kategorie 1

([1]) Im Juni 2013 kam die Gemeinsame Tagung überein, dass der Begriff „Prüfchemikalie" zur Beschreibung des Prüfgegenstandes bei neuen und aktualisierten Prüfmethoden einheitlicher verwendet werden solle.

Stoff	CAS-Nr.	Chemikalienklasse ([1])	Aggregatzustand	*In-vivo*-UN-GHS-/CLP-Kat. ([2])	Lösungsmittel in der Kurzzeitprüfung	UN-GHS-/CLP-Kat. nach Kurzzeitexposition
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Ether	Flüssigkeit	Kategorie 1	Kochsalzlösung	Kategorie 1
Acid Red 92	18472-87-2	Heterocyclische Verbindung, Bromverbindung, Chlorverbindung	Feststoff	Kategorie 1	Kochsalzlösung	Kategorie 1
Natriumhydroxid	1310-73-2	Lauge, anorganische Chemikalie	Feststoff	Kategorie 1 ([3])	Kochsalzlösung	Kategorie 1
Butyrolacton	96-48-0	Lacton, heterocyclische Verbindung	Flüssigkeit	Kategorie 2A (nach CLP Kategorie 2)	Kochsalzlösung	Keine Vorhersage möglich
1-Octanol	111-87-5	Alkohol	Flüssigkeit	Kategorie 2A/B ([4]) (nach CLP Kategorie 2)	Mineralöl	Keine Vorhersage möglich
Cyclopentanol	96-41-3	Alkohol, Kohlenwasserstoff, cyclisch	Flüssigkeit	Kategorie 2A/B ([5]) (nach CLP Kategorie 2)	Kochsalzlösung	Keine Vorhersage möglich
2-Ethoxyethylacetat	111-15-9	Alkohol, Ether	Flüssigkeit	Keine Einstufung	Kochsalzlösung	Keine Einstufung
Dodecan	112-40-3	Kohlenwasserstoff (acyclisch)	Flüssigkeit	Keine Einstufung	Mineralöl	Keine Einstufung
Methylisobutylketon	108-10-1	Keton	Flüssigkeit	Keine Einstufung	Mineralöl	Keine Einstufung

Stoff	CAS-Nr.	Chemikalienklasse ([1])	Aggregatzustand	*In-vivo*-UN-GHS-/CLP-Kat. ([2])	Lösungsmittel in der Kurzzeitprüfung	UN-GHS-/CLP-Kat. nach Kurzzeitexposition
1,1-Dimethylguanidinsulfat	598-65-2	Amidin, Schwefelverbindung	Feststoff	Keine Einstufung	Kochsalzlösung	Keine Einstufung

([1]) Chemikalienklassen wurden anhand von Informationen aus früheren NICEATM-Veröffentlichungen bzw., wenn diese nicht verfügbar waren, nach den Medical Subject Headings (MeSH®) der National Library of Medicine (über ChemIDplus® [National Library of Medicine], siehe http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/) und nach Strukturbestimmungen des NICEATM vorgenommen.

([2]) Gestützt auf Ergebnisse aus dem In-vivo-Kaninchenaugentest (OECD TG 405) unter Berücksichtigung der UN-GHS-Klassifizierung (1).

([3]) Die Einstufung als Kategorie 1 beruht auf dem Hautreizungspotenzial von 100 % Natriumhydroxid (geführt als Leistungschemikalie mit Hautverätzungspotenzial in der OECD TG 435) und dem Kriterium für die Einstufung in die UN-GHS-/CLP-Kategorie 1 (1).

([4]) Die Einstufung in die Kategorien 2A oder 2B ist von der Auswertung der Kriterien des UN-GHS zur Unterscheidung zwischen diesen beiden Kategorien abhängig, d. h. für eine Einstufung in die Kategorie 2A müssen an 2 von 6 gegenüber 4 von 6 Tieren Wirkungen an Tag 7 beobachtet werden. Der *In-vivo*-Datensatz umfasste 2 Untersuchungen mit jeweils 3 Versuchstieren. Bei einem Versuch zeigten sich bei zwei von drei Tieren Wirkungen an Tag 7, die eine Einstufung in Kategorie 2A rechtfertigten (11). Bei der zweiten Untersuchung gingen alle Endpunkte bei allen drei Tieren bis Tag 7 auf einen Wert von null zurück; daher wurde eine Einstufung in Kategorie 2B vorgenommen (12).

([5]) Die Einstufung in die Kategorie 2A oder 2B ist von der Auswertung der Kriterien des UN-GHS zur Unterscheidung zwischen diesen beiden Kategorien abhängig, d. h. für eine Einstufung in die Kategorie 2A müssen an 1 von 3 gegenüber 2 von 3 Tieren Wirkungen an Tag 7 beobachtet werden. Die *In-vivo*-Studie umfasste drei Tiere. Alle Endpunkte mit Ausnahme einer Hornhauttrübung und einer Bindehautrötung bei einem Tier, gingen bis Tag 7 oder früher auf einen Wert von null zurück. Bei dem einen Tier, das sich bis Tag 7 nicht vollständig regeneriert hatte, wurden die Hornhauttrübung und die Bindehautrötung (an Tag 7) jeweils mit 1 bewertet. An Tag 11 waren die Trübung und die Rötung vollständig verschwunden.

Abkürzungen: CAS-Nr. = Registernummer des Chemical Abstracts Service

PRÜFVERFAHREN

Vorbereitung des Zellmonolayers

15. Die Kurzzeitprüfung sollte mit SRIC-Zellen (Kaninchen-Corneazellen des Statens Serum Institut) durchgeführt werden. Die SIRC-Zellen sollten aus einer gut qualifizierten Zellbank bezogen werden (z. B. American Type Culture Collection (ATCC), CCL 60).

16. SIRC-Zellen werden bei 37 °C in 5 % CO_2 in befeuchteter Atmosphäre in einem Kulturkolben mit einem Kulturmedium (d. h. Eagle's MEM) kultiviert, das mit 10 % fetalem Rinderserum (FBS), 2 mM L-Glutamin, 50-100 Einheiten/ml Penicillin und 50-100 µg/ml Streptomycin versetzt wurde. Zellen, die sich im Kulturkolben konfluent entwickelt haben, sollten mit Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (ggf. unter Verwendung eines Zellschabers) abgenommen werden. Bevor sie für Routineprüfungen verwendet werden, sind die Zellen in einem Kulturkolben zu propagieren (z. B. mit 2 bis 3 Passagen); nach dem Auftauen sollten nicht mehr als 25 Passagen erfolgen.

17. Die für die Kurzzeitprüfung zu verwendende Zellen werden dann mit geeigneter Dichte präpariert und in 96-Well-Platten ausgesät. Zum Aussäen in einem Kulturvolumen von 200 µl wird eine Zelldichte von $6{,}0 \times 10^3$ Zellen pro Well empfohlen, wenn die Zellen vier Tage nach dem Aussäen verwendet werden, bzw. $3{,}0 \times 10^3$ Zellen bei Verwendung der Zellen fünf Tage nach dem Aussäen. Zellen, die zur Kurzzeitprüfung mit angemessener Dichte in ein Kulturmedium ausgesät wurden, erreichen zum Zeitpunkt der Prüfung (d. h. vier oder fünf Tage nach dem Aussäen) eine Konfluenz von mehr als 80 %.

Applikation der Prüfchemikalien und Kontrollstoffe

18. Erste Wahl als Lösungsmittel zum Auflösen oder Suspendieren von Prüfchemikalien ist physiologische Kochsalzlösung. Wenn eine Prüfchemikalie nur schwach oder überhaupt nicht löslich ist oder in Kochsalzlösung nicht mindestens fünf Minuten gleichmäßig suspendiert wird, ist als zweite Wahl 5 % DMSO (CAS-Nr. 67-68-5) in Kochsalzlösung als Lösungsmittel zu verwenden. Bei Prüfchemikalien, die in Kochsalzlösung oder in 5 % DMSO in Kochsalzlösung nicht gelöst oder mindestens fünf Minuten gleichmäßig suspendiert werden, wird als dritte Wahl Mineralöl (CAS-Nr. 8042-47-5) als Lösungsmittel verwendet.

19. Die Prüfchemikalien werden im jeweils ausgewählten Lösungsmittel in einer Konzentration von 5 % (w/w) gelöst oder gleichmäßig suspendiert und anschließend in Verdünnungsreihen mit jeweils 10 Verdünnungen auf Konzentrationen von 0,5 % und 0,05 % verdünnt. Jede einzelne Prüfchemikalie ist in beiden Konzentrationen (5 % und 0,05 %) zu untersuchen. In der 96-Well-Platte kultivierte Zellen werden bei Raumtemperatur fünf Minuten pro Well mit 200 µl der Prüfchemikalienlösung (bzw. der Suspension) in Konzentrationen von 5 bzw. 0,05 % behandelt. Prüfchemikalien (einkomponentige oder mehrkomponentige Stoffe oder Gemische) werden je nach Methode unabhängig von ihrer tatsächlichen Reinheit als reine Stoffe betrachtet und verdünnt bzw. suspendiert.

20. Das in Nummer 16 beschriebene Kulturmedium wird bei jeder einzelnen Replikatplatte als Mediumkontrolle verwendet. Außerdem werden die Zellen auf jeder einzelnen Replikatplatte mit Proben der Lösungsmittelkontrolle behandelt. Für die in Nummer 18 genannten Lösungsmittel wurde bestätigt, dass die Viabilität von SRIC-Zellen nicht beeinträchtigt wird.

21. Bei der Kurzzeit-Prüfmethode ist bei allen Replikatplatten 0,01 % Natriumlaurylsulfat (SLS) in Kochsalzlösung als Positivkontrolle zu verwenden. Zur Berechnung der Zellviabilität der Positivkontrolle muss jede Replikatplatte auch eine Kochsalzlösung als Kontrolle beinhalten.

22. Zur Bestimmung des Ausgleichs der optischen Dichte wird eine Blindkontrolle benötigt. Die Blindkontrolle ist in Wells zu prüfen, die ausschließlich calcium- und magnesiumfreien Phosphatpuffer oder Zellen enthalten.

23. Jede Probe (die Prüfchemikalie in Konzentrationen von > 5 % und 0,05 %, die Mediumkontrolle, die Lösungsmittelkontrolle und die Positivkontrolle) sollte bei jeder Wiederholung jeweils dreimal geprüft werden, indem die Zellen fünf Minuten bei Raumtemperatur mit 200 µl der betreffenden Prüf- bzw. Kontrollchemikalie behandelt werden.

24. Referenzstoffe erleichtern die Evaluierung des augenreizenden Potenzials unbekannter Chemikalien einer bestimmten Chemikalien- oder Produktklasse und die Evaluierung des relativen Reizpotenzials eines Augenreizstoffes innerhalb einer spezifischen Spanne von Reizwirkungen.

Messung der Zellviabilität

25. Nach der Behandlung werden die Zellen zweimal mit 200 µl PBS gewaschen; anschließend werden 200 µl MTT-Lösung (0,5 mg MTT/ml Kulturmedium) zugesetzt. Nach einer zweistündigen Reaktionszeit in einem Inkubator (37 °C, 5 % CO_2) wird die MTT-Lösung dekantiert. Danach wird das MTT-Formazan unter Zugabe von 200 µl 0,04 n Salzsäure/Isopropanol 60 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur extrahiert. Darauf wird mit einem Platten-Lesegerät die Absorption der MTT-Formazan-Lösung bei 570 nm gemessen. Bei der MTT-Prüfung treten Interferenzen durch die Prüfchemikalien (aufgrund von Farbstoffen oder durch direkte MTT-Reduktionsmittel) nur dann auf, wenn nach dem Waschen im Anschluss an die Behandlung eine Prüfchemikalie noch in erheblichem Umfang im Prüfsystem enthalten ist. Dies ist etwa bei rekonstruiertem humanem 3D-Hornhaut- oder Epidermisgewebe der Fall. Für die bei der Kurzzeit-Prüfmethode verwendeten 2D-Zellkulturen sind diese Interferenzen jedoch nicht von Bedeutung.

Auswertung der Ergebnisse und Prädiktionsmodell

26. Die für jede Prüfchemikalie ermittelten OD-Werte (OD = optische Dichte) werden anschließend zur Berechnung der prozentualen Viabilität im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle herangezogen, die gleich 100 % gesetzt wird. Die relative Zellviabilität wird als Prozentanteil ausgedrückt. Dieser Prozentanteil wird durch Division der OD der Prüfchemikalie durch die OD der Lösungsmittelkontrolle ermittelt, nachdem von beiden Werten jeweils die OD der Blindkontrolle abgezogen wurde.

$$Zellviabilität(\%) = \frac{(OD_{570}Prüfchemikalie) - (OD_{570}Blindkontrolle)}{(OD_{570}Lösungsmittelkontr.) - (OD_{570}Blindk.)} \times 100$$

Ähnlich wird die relative Zellviabilität der einzelnen Lösungsmittelkontrollen als Prozentanteil ausgedrückt. Dieser Prozentanteil wird durch Division der OD der einzelnen Lösungsmittelkontrollen durch die OD der einzelnen Mediumkontrollen ermittelt, nachdem von beiden Werten jeweils die OD der Blindkontrolle abgezogen wurde.

27. Bei der Prüfung sollten drei unabhängige Wiederholungen jeweils mit drei Replikat-Wells (d. h. n = 9) durchgeführt werden. Das arithmetische Mittel der relativen Zellviabilität wird anhand des arithmetischen Mittels der drei Wells jeder einzelnen Prüfchemikalie und jeder einzelnen Lösungsmittelkontrolle der einzelnen unabhängigen Wiederholungen ermittelt. Das endgültige arithmetische Mittel der Zellviabilität wird anhand der drei unabhängigen Wiederholungen berechnet.

28. Die Schwellenwerte der Zellviabilität zur Identifizierung von schwer augenschädigenden Chemikalien (UN-GHS-/CLP-Kategorie 1) und von Chemikalien, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordern (keine Einstufung nach UN GHS/CLP), sind nachfolgend aufgeführt:

Tabelle 2

Vorhersagemodell der Kurzzeit-Prüfmethode

Zellviabilität		UN-GHS-/CLP-Kategorie	Anwendbarkeit
5 %	0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Keine Einstufung	Stoffe und Gemische außer i) stark flüchtigen Stoffen mit Dampfdrücken über 6 kPa [1] und ii) festen Chemikalien (Stoffen und Gemischen) mit Ausnahme von Tensiden und Gemischen, die ausschließlich Tenside enthalten
> 70 %	> 70 %	Keine Vorhersage möglich	Nicht anwendbar
> 70 %	> 70 %	Kategorie 1	Stoffe und Gemische [2]

[1] Gemische mit Stoffen mit Dampfdrücken von über 6 kPa sollten mit besonderer Sorgfalt untersucht werden, damit Gefahren nicht unterschätzt werden. Ob die Verwendung der Kurzzeit-Prüfmethode in Betracht kommt, sollte daher auf Einzelfallbasis entschieden werden.

[2] Je nach den vorwiegend mit einkomponentigen Stoffen ermittelten Ergebnissen, wenn auch begrenzte Daten zur Prüfung von Gemischen verfügbar sind. Die Prüfmethode ist dennoch für die Prüfung von mehrkomponentigen Stoffen und Gemischen technisch geeignet. Bevor diese Prüfmethode bei einem Gemisch angewendet wird, um zu rechtlichen Zwecken Daten zu gewinnen, sollte geprüft werden, ob, und falls ja, warum sie für diesen Zweck geeignete Ergebnisse liefert. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs von Rechts wegen vorgeschrieben ist.

Akzeptanzkriterien

29. Die Prüfergebnisse sind annehmbar, wenn die folgenden Kriterien vollständig erfüllt sind:

a) Die optische Dichte der (mit dem Kulturmedium behandelten) Mediumkontrolle nach Abzug der optischen Dichte der Blindkontrolle beträgt mindestens 0,3.

b) Die Viabilität der Lösungsmittelkontrolle liegt bei mindestens 80 % der Viabilität der Mediumkontrolle. Wenn bei den Wiederholungen jeweils mehrere Lösungsmittelkontrollen verwendet werden, sind die Prüfchemikalien zur Untersuchung mit den betreffenden Lösungsmitteln nur dann geeignet, wenn die Zellviabilität der Lösungsmittelkontrollen jeweils mehr als 80 % beträgt.

c) Die Zellviabilität der Positivkontrolle (0,01 % SLS) liegt im Bereich von zwei Standardabweichungen vom historischen Mittelwert. Die obere und die untere Akzeptanzgrenze der Positivkontrolle werden häufig aktualisiert (d. h. alle drei Monate bzw. in Labors, in denen die Prüfungen seltener durchgeführt werden (weniger als einmal pro Monat), immer dann, wenn eine akzeptable Prüfung durchgeführt wurde). Wenn Versuche in einem Labor nicht in hinreichender Anzahl durchgeführt werden, um eine statistisch robuste Verteilung der Positivkontrollen zu ermitteln, kann unter Berücksichtigung der vom Entwickler der Prüfmethode festgelegten oberen und unteren Grenzwerte (d. h. 21,1 % und 62,3 %, je nach den historischen Daten des betreffenden Labors) nach den ersten routinemäßigen Prüfungen eine interne Verteilung ermittelt werden.

d) Die Standardabweichung der aus drei unabhängigen Wiederholungen ermittelten endgültigen Zellviabilität beträgt bei beiden Konzentrationen der Prüfchemikalie (5 % und 0,05 %) weniger als 15 %.

Wenn mindestens eines dieser Kriterien nicht erfüllt ist, sollten die Ergebnisse nicht berücksichtigt werden. In diesem Fall sind drei weitere unabhängige Wiederholungen durchzuführen.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

30. Die Daten der einzelnen Wells (z. B. die Werte der Zellviabilität) der jeweiligen Wiederholungen sowie der Gesamtmittelwert, die Standardabweichung und die Einstufung sind anzugeben.

Prüfbericht

31. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalien und Kontrollstoffe

— Einkomponentige Stoffe: Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;

— mehrkomponentige Stoffe, UVCB-Stoffe und Gemische: Charakterisierung, so weit wie möglich, z. B. durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), Reinheit, das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften (siehe oben) der einzelnen Elemente, soweit verfügbar;

— Aggregatzustand, Flüchtigkeit, pH-Wert, log P, Molekulargewicht, Chemikalienklasse und weitere für die Untersuchung relevante physikalische und chemische Eigenschaften, soweit verfügbar;

— Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;

— Behandlung vor der Untersuchung, sofern relevant (z. B. Erwärmen, Mahlen);

— Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar.

Prüfbedingungen und -verfahren

— Name und Anschrift des Auftraggebers, der Prüfanstalt und des Studienleiters;

— Identifikation der verwendeten Prüfmethode;

— verwendete Zelllinie, Herkunft, Passagenzahl und Konfluenz der für die Untersuchung verwendeten Zellen;

— Details des angewandten Prüfverfahrens;

— Anzahl der Wiederholungen und verwendeten Replikate

— Konzentrationen der verwendeten Prüfchemikalie (falls von den Empfehlungen abweichend);

— Begründung der Auswahl des Lösungsmittels für jede Prüfchemikalie;

— Dauer der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie (falls von den Empfehlungen abweichend);

— Beschreibung etwaiger Änderungen am Prüfverfahren;

— Beschreibung der angewandten Bewertungs- und Entscheidungskriterien;

— Angabe des historischen Mittelwerts der Kontrollgruppe und der Standardabweichung (SD);

— Nachweis der Leistungsfähigkeit des Labors hinsichtlich der Durchführung der Prüfmethode (z. B. durch Prüfen von Leistungsstoffen) oder zum Nachweis der reproduzierbaren Durchführung der Prüfmethode im Zeitverlauf.

Ergebnisse

— Für alle Prüfchemikalien und Kontrollstoffe sowie für jede geprüfte Konzentration sind die einzelnen OD-Werte pro Replikat-Well, das arithmetische Mittel der OD-Werte der einzelnen unabhängigen Wiederholungen, die Zellviabilität der einzelnen unabhängigen Wiederholungen in % und das endgültige arithmetische Mittel der Zellviabilität in % sowie die Standardabweichung bei drei Wiederholung in einer Tabelle anzugeben;

— Ergebnisse der Medium-, der Lösungsmiottel- und der Positivkontrolle als Nachweis für die Erfüllung geeigneter Akzeptanzkriterien;

— Beschreibung anderer beobachteter Wirkungen;

— insgesamt abgeleitete Einstufung mit Bezug auf das Vorhersagemodell und/oder angewandte Entscheidungskriterien.

Erörterung der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen

LITERATUR

(1) Vereinte Nationen (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung) (GHS): fünfte überarbeitete Auflage, New York und Genf: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Abrufbar unter:http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Scott, L, u. a. (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

(3) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(4) Takahashi, Y., u. a. (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., u. a. (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., u. a. (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, S. 1 855-1 869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Abrufbar unter:[http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Kapitel B.5 dieses Anhangs, Akute Augenreizung/-verätzung.

(9) Saito, K, u. a. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.

(10) Mikkelson, T.J., Chrai, S.S., und Robinson. J.R. (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)), Brüssel, Belgien.

(12) Gautheron, P., u. a. (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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

Anlage

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Augenreizung: Erzeugen von Veränderungen am Auge nach Applikation einer Prüfchemikalie auf die Oberfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation vollständig reversibel sind. Synonym zu den Einstufungen „reversible Wirkungen am Auge" und „UN-GHS-/CLP-Kategorie 2".

Bottom-up-Ansatz: Schrittweiser Ansatz für eine Prüfchemikalie, von der vermutet wird, dass sie keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordert. Dabei werden zunächst Chemikalien, die keine Einstufung erfordern (negatives Ergebnis), von anderen Chemikalien (positives Ergebnis) unterschieden.

Chemikalie: Ein Stoff oder Gemisch.

Einkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens 80 % w/w vorliegt.

Falsch-Negativ-Rate: Der Anteil aller positiven Chemikalien, die mit einer Prüfmethode fälschlicherweise als negativ identifiziert werden. Die Falsch-Negativ-Rate ist ein Indikator für die Leistungsfähigkeit einer Prüfmethode.

Falsch-Positiv-Rate: Der Anteil aller negativen Chemikalien, die mit einer Prüfmethode fälschlicherweise als positiv identifiziert werden. Die Falsch-Positiv-Rate ist ein Indikator für die Leistungsfähigkeit einer Prüfmethode.

Gefahr: Inhärente Eigenschaft eines Stoffes oder eines Umfelds mit dem Potenzial, einen Organismus, ein System oder eine (Sub)population bei Exposition gegenüber diesem Stoff zu schädigen.

Gemisch: Ein Gemisch oder eine Lösung, die aus zwei oder mehr Stoffen besteht.

Genauigkeit: Der Grad an Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung" verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (13).

Gestufte Prüfstrategie: Eine schrittweise Prüfstrategie, bei der alle vorhandenen Informationen über eine Prüfchemikalie in einer vorgegebenen Reihenfolge überprüft werden, wobei auf jeder Stufe nach dem evidenzbasierten Bewertungsansatz (weight-of-evidence) vorgegangen wird, um feststellen zu können, ob genügend Informationen für eine Gefahreneinstufung vorliegen, bevor zur nächsten Stufe übergegangen wird. Wenn das Reizpotenzial einer Prüfchemikalie auf Basis der vorliegenden Informationen ermittelt werden kann, sind keine weiteren Untersuchungen erforderlich. Ist dies nicht der Fall, müssen schrittweise sequenzielle Tierversuche durchgeführt werden, bis eine eindeutige Einstufung vorgenommen werden kann.

Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle: Eine unbehandelte Probe, die alle Elemente eines Prüfsystems enthält, einschließlich des mit der Prüfchemikalie behandelten Lösungsmittels oder Vehikels und anderer Kontrollproben, und die verwendet wird, um die Referenzreaktion für die mit der Prüfchemikalie behandelten Proben zu bestimmen, die im selben Lösungsmittel oder Vehikel aufgelöst wurden. Bei der Prüfung mit einer gleichzeitigen Negativkontrolle zeigt diese Probe außerdem an, ob das Lösungsmittel oder Vehikel mit dem Prüfsystem interagiert.

Mediumkontrolle: Ein unbehandeltes Replikat, das alle Elemente eines Prüfsystems enthält. Diese Probe wird mit einer Prüfchemikalie behandelten Proben und anderen Kontrollproben mitgeführt, um festzustellen, ob das Lösungsmittel mit dem Prüfsystem interagiert.

Mehrkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens ≥ 10 % w/w und < 80 % w/w vorhanden ist. Ein mehrkomponentiger Stoff ist das Ergebnis eines Herstellungsprozesses. Der Unterschied zwischen einem Gemisch und einem mehrkomponentigen Stoff besteht darin, dass ein Gemisch durch die Mischung von zwei oder mehr Stoffen ohne chemische Reaktion entsteht. Ein mehrkomponentiger Stoff wird durch eine chemische Reaktion gebildet.

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; Thiazolyl-Blau-Tetrazoliumbromid.

OD: Optische Dichte.

Positivkontrolle: Ein Replikat, das alle Elemente eines Prüfsystems enthält und mit einem Stoff behandelt wird, der bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Um sicherzustellen, dass Abweichungen bei Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

Referenzstoff: Ein zum Vergleich mit einer Prüfchemikalie verwendeter Stoff. Referenzstoffe sollten die folgenden Eigenschaften haben: (i) einheitliche und zuverlässige Herkunft; (ii) strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit der Klasse der zu prüfenden Stoffe; (iii) bekannte physikalisch-chemische Eigenschaften; (iv) unterstützende Daten zu bekannten Wirkungen und (v) bekannte Wirksamkeit im Bereich der erwünschten Reaktion.

Relevanz: Dieser Begriff bezieht sich auf das Verhältnis zwischen der Prüfmethode und der betreffenden Wirkung und auf die Frage, ob er aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Er beschreibt das Ausmaß, in dem mit einer Prüfung die untersuchte biologische Wirkung korrekt gemessen oder vorhersagt wird. Die Relevanz schließt eine Beurteilung der Genauigkeit (Übereinstimmung) einer Prüfmethode ein (10).

Schwere Augenschädigung: Erzeugen von Gewebeschäden im Auge oder eine schwerwiegende Verschlechterung des Sehvermögens nach Applikation einer Prüfchemikalie auf die Oberfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation nicht vollständig reversibel sind. Synonym zu den Einstufungen „irreversible Wirkungen am Auge“ und „UN-GHS-/CLP-Kategorie 1“.

Sensitivität: Der Anteil aller positiven/wirkenden Chemikalien, die durch die Prüfung korrekt eingestuft werden. Die Sensitivität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (10).

Spezifität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Chemikalien, die durch die Prüfung korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (13).

Stoff: Ein chemisches Element und seine Verbindungen in natürlicher Form oder gewonnen durch ein Herstellungsverfahren, einschließlich der zur Wahrung seiner Stabilität notwendigen Zusatzstoffe und der durch das angewandte Verfahren bedingten Verunreinigungen, aber mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können.

Tensid: Auch als oberflächenaktiver Stoff bezeichnet; Stoffe, wie waschaktive Stoffe (Detergenzien), die die Oberflächenspannung einer Flüssigkeit herabsetzen und so die Bildung von Schaum oder das Eindringen in feste Stoffe ermöglichen; auch bekannt als Netzmittel.

Top-down-Ansatz: Schrittweiser Ansatz bei einer Chemikalie, von der vermutet wird, dass sie schwere Augenschäden verursacht. Dabei werden zunächst Chemikalien, die schwere Augenschäden verursachen (positives Ergebnis), von anderen Chemikalien (negatives Ergebnis) unterschieden.

UN GHS (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung der Vereinten Nationen): Ein System zur Klassifizierung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) nach standardisierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und ökologischer Gefahren und zur entsprechenden Kennzeichnung durch Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenhinweise, Sicherheitshinweise und Sicherheitsdatenbögen, um zum Schutz des Menschen (einschließlich Arbeitgeber, Arbeiter, Spediteure, Verbraucher und Notfall-Einsatzkräfte) und der Umwelt Informationen über die schädlichen Wirkungen der betreffenden Chemikalien zu verbreiten (1).

UN-GHS/CLP-Kategorie 1: Siehe „Schwere Augenschädigung".

UN-GHS/CLP-Kategorie 2: Siehe „Augenreizung".

UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung: Chemikalien, die nicht in die UN-GHS-/CLP-Kategorien 1 oder 2 (oder die UN-GHS-Kategorien 2A oder 2B) eingestuft wurden.

UVCB: Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Zuverlässigkeit: Maß der Reproduzierbarkeit einer Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien über einen längeren Zeitraum und bei einheitlichem Protokoll. Die Zuverlässigkeit wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit bewertet (13).

B.69 **PRÜFMETHODE UNTER VERWENDUNG VON REKONSTRUIERTEM MENSCHLICHEM HORNHAUTARTIGEM EPITHEL (RhCE) ZUR ERMITTLUNG VON CHEMIKALIEN, BEI DENEN EINE EINSTUFUNG UND KENNZEICHNUNG ALS AUGENREIZEND ODER SCHWER AUGENSCHÄDIGEND NICHT ERFORDERLICH IST**

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode (PM) entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 492 (2017). Als *schwere Augenschädigung* werden nach dem Global harmonisierten System (UN GHS) zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (1) und nach Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (CLP-Verordnung) ([1]) das Erzeugen von Gewebeschäden im Auge oder schwerwiegende Verschlechterungen des Sehvermögens nach Applikation eines Prüfstoffes auf die Oberfläche des Auges bezeichnet, die innerhalb von 21 Tagen nach Applikation nicht vollständig reversibel sind. Ebenfalls nach dem UN GHS und der CLP-Verordnung bezeichnet *Augenreizung* das Erzeugen von Veränderungen am Auge nach Applikation eines Prüfstoffes auf die Oberfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation vollständig reversibel sind. Prüfchemikalien, die schwere Augenschädigungen auslösen, werden als UN-GHS-/CLP-Kategorie 1 eingestuft. Chemikalien die Augenreizungen hervorrufen, werden als UN-GHS-/CLP-Kategorie 2 eingestuft. Prüfchemikalien, die nicht als augenreizende oder schwer augenschädigende Stoffe eingestuft werden, sind als Stoffe definiert, bei denen die Kriterien für eine Einstufung in die UN-GHS-/CLP-Kategorien 1 oder 2 (2A oder 2B) nicht erfüllt sind, d. h. sie werden als Stoffe der UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung bezeichnet.

2. Zur Beurteilung von schweren Augenschädigungen bzw. Augenreizungen wurden bislang in der Regel Labortiere verwendet (PM B.5 (2)). Die Auswahl der am besten geeigneten Prüfmethode und die Anwendung dieser Prüfmethode sollten unter Berücksichtigung des OECD-Leitliniendokuments über integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA = Integrated Approaches to Testing and Assessment) zur Untersuchung von schweren Augenschädigungen und von Augenreizungen (39) erfolgen.

3. Die Prüfmethode beschreibt ein *In-vitro*-Verfahren zur Ermittlung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen), die keine Einstufung und Kennzeichnung als augenreizend oder schwer augenschädigend nach dem UN GHS und der CLP-Verordnung erfordern. Für diese Prüfmethode wird rekonstruiertes menschliches hornhautartiges Epithel (RhCE) verwendet, das die histologischen, morphologischen, biochemischen und physiologischen Eigenschaften des menschlichen Hornhautepithels weitgehend widerspiegelt. Vier weitere *In-vitro*-Prüfmethoden wurden validiert, als wissenschaftlich fundiert bewertet und als PM B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) und B.68 (6) zur Bewertung der Endpunkte für schwere Augenschädigungen bzw. für Augenreizungen beim Menschen angenommen.

4. Bei dieser Prüfmethode kommen zwei validierte im Handel erhältliche RhCE-Modelle zum Einsatz. Zur Beurteilung von Augenreizungen / schweren Augenschädigungen anhand des EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) und des SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT) wurden Validierungsstudien durchgeführt (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13). Bei diesen Prüfungen wurden jeweils im Handel erhältliche RhCE-Gewebemodelle als Prüfsystem verwendet. Diese Prüfungen werden im Folgenden die validierten Referenzmethoden (VRM 1 bzw. VRM 2) genannt. Aufgrund dieser Validierungsstudien und nach dem unabhängigen Peer-Review dieser Studien (9) (12) wurde festgestellt, dass Chemikalien (Stoffe und Gemische), die keine Einstufung und Kennzeichnung als augenreizend bzw. schwer augenschädigend nach dem UN GHS erfordern, mit dem EpiOcular™ EIT und dem SkinEthic™ HCE EIT korrekt ermittelt werden. Daher wurden diese Prüfungen für diesen Zweck als wissenschaftlich fundiert empfohlen (13).

5. Gegenwärtig herrscht allgemeiner Konsens darüber, dass der *In-vivo*-Draize-Augentest in absehbarer Zukunft nicht in vollem Umfang durch eine einzelne *In-vitro*-Prüfmethode ersetzt werden kann (2) (14), die geeignet wäre, das gesamte Spektrum augenreizender bzw. schwer augenschädigender Reaktionen auf unterschiedliche Chemikalienklassen vorherzusagen. Unter Umständen ist es jedoch möglich, den Draize-Augentest durch strategische Kombinationen mehrerer alternativer Prüfmethoden im Rahmen (gestufter) Prüfstrategien (z. B. des Bottom-up- oder des Top-down-Ansatzes) vollständig zu ersetzen (15). Der Bottom-up-Ansatz (15) wird verwendet, wenn auf Basis der vorliegenden Informationen davon auszugehen ist, dass eine Chemikalie Augenreizungen nicht in einem Umfang auslöst, der eine Einstufung erfordern würde. Umgekehrt wird der Top-down-Ansatz (15) verwendet, wenn nach den vorliegenden Informationen davon auszugehen ist, dass eine Chemikalie schwere Augenschädigungen hervorruft. Der EpiOcular™ EIT und der SkinEthic™ HCE EIT werden empfohlen, um im Rahmen einer Prüfstrategie (z. B. des von Scott u. a. empfohlenen Bottom-up- oder Top-down-Ansatzes) etwa in einem ersten Schritt bei einem Bottom-up-Ansatz oder

([1]) Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

in einem der letzten Schritte bei einem Top-down-Ansatz ohne weitere Prüfung Chemikalien zu ermitteln, bei denen eine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend nach dem UN GHS bzw. der CLP-Verordnung nicht erforderlich ist (Keine Einstufung) (15). Zur Unterscheidung zwischen der UN-GHS-/CLP-Kategorie 1 (schwere Augenschädigung) und der UN-GHS-/CLP-Kategorie 2 (Augenreizung) sind der EpiOcular™ EIT und der SkinEthic™ HCE EIT jedoch nicht vorgesehen. Diese Unterscheidung muss in einem weiteren Schritt einer Prüfstrategie vorgenommen werden (15). Eine Prüfchemikalie, bei der die Durchführung des EpiOcular™ EIT oder SkinEthic™ HCE EIT zur Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend als erforderlich betrachtet wird, muss daher einer weiteren Untersuchung (*in vitro* und/oder *in vivo*) unterzogen werden (z. B. durch die PM B.47, B.48, B.61 oder B.68), um zu einem endgültigen Ergebnis (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung, UN-GHS-/CLP-Kategorie 2 oder UN-GHS-/CLP-Kategorie 1) zu gelangen.

6. Diese Prüfmethode beschreibt das Verfahren zur Beurteilung des augengefährdenden Potenzials einer Prüfchemikalie anhand ihrer mit der MTT-Prüfung (16) (Nummer 21) gemessenen Fähigkeit, bei einem RhCE-Gewebemodell eine zytotoxische Wirkung hervorzurufen. Die Viabilität des RhCE-Gewebes nach Behandlung mit einer Prüfchemikalie wird im Vergleich zu Geweben ermittelt, die mit dem Negativkontrollstoff behandelt wurde (Viabilität in %). Nach dieser Viabilität wird das Augengefährdungspotenzial der Prüfchemikalie angegeben.

7. Verfügbare Leistungsstandards (17) erleichtern die Validierung neuer oder modifizierter *In-vitro*-Prüfungen unter Verwendung von RhCE ähnlich dem EpiOcular™ EIT und dem SkinEthic™ HCE EIT nach den Grundsätzen von OECD Guidance Document Nr. 34 (18) und ermöglichen eine frühzeitige Änderung der OECD TG 492 zur entsprechenden Berücksichtigung. Die gegenseitige Anerkennung der Daten gemäß dem OECD-Übereinkommen wird nur für Prüfungen garantiert, die gemäß diesen Leistungsnormen validiert wurden, sofern diese Prüfungen von der OECD überprüft und in die entsprechende Prüfrichtlinie aufgenommen wurden.

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

8. Es gelten die Begriffsbestimmungen in Anlage 1.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

9. Diese Prüfmethode beruht auf im Handel erhältlichen dreidimensionalen RhCE-Gewebemodellen, die entweder mit primären humanen epidermalen Keratinozyten (d. h. EpiOcular™ OCL-200) oder mit humanen immortalisierten Hornhaut-Epithelzellen (d. h. SkinEthic™ HCE/S) hergestellt wurden. Die RhCE-Gewebemodelle EpiOcular™ OCL-200 und SkinEthic™ HCE/S spiegeln das dreidimensionale *In-vivo*-Hornhaut-Epithelgewebe wider und werden aus Zellen der zu untersuchenden Spezies hergestellt (19) (20). Mit den Prüfungen werden die Zytotoxizität infolge der Durchdringung der Hornhaut durch die Chemikalien und die Induzierung von Zell- und Gewebeschäden direkt gemessen. Die gemessene zytotoxische Reaktion gibt dann Aufschluss über den Gesamtumfang der *in vivo* auftretenden Augenreizungen bzw. schweren Augenschädigungen. Zellschädigungen können aufgrund unterschiedlicher Wirkungsweisen auftreten (Nummer 20). Der Zytotoxizität kommt jedoch eine wichtige, wenn nicht gar die entscheidende, grundlegende Bedeutung bei der Ermittlung des Gesamtumfangs der schweren Augenschädigungen bzw. der Augenreizungen aufgrund der Wirkung einer Chemikalie zu, die sich unabhängig von den den Gewebeschädigungen zugrunde liegenden physikalisch-chemischen Prozessen *in vivo* in einer Hornhauttrübung, einer Iritis, einer Bindehautrötung und/oder einem Bindehautödem (Chemose) äußert.

10. In der dieser Prüfmethode zugrunde liegenden Validierungsstudie wurden vielfältige Chemikalien sowie zahlreiche unterschiedliche Chemikalientypen, Chemikalienklassen, Molekulargewichte, log-P-Werte, chemische Strukturen usw. berücksichtigt. Die Validierungsdatenbank für den EpiOcular™ EIT enthielt insgesamt 113 Chemikalien, darunter 95 verschiedene organische Funktionsgruppen entsprechend einer Analyse mit der QSAR-Toolbox der OECD (8). Bei diesen Chemikalien handelte es sich meist um einkomponentige Stoffe; in der Studie wurden aber auch mehrere mehrkomponentige Stoffe berücksichtigt (darunter 3 Homopolymere, 5 Copolymere und 10 Quasipolymere). Hinsichtlich des Aggregatzustands und der UN-GHS-/CLP-Kategorien verteilten sich die 113 Prüfchemikalien wie folgt: 13 Flüssigkeiten der Kategorie 1, 15 Feststoffe der Kategorie 1, 6 Flüssigkeiten der Kategorie 2A, 10 Feststoffe der Kategorie 2A, 7 Flüssigkeiten der Kategorie 2B, 7 Feststoffe der Kategorie 2B, 27 Flüssigkeiten der Kategorie Keine Einstufung und 28 Feststoffe der Kategorie Keine Einstufung (8). Die Validierungsdatenbank für den SkinEthic™ HCE EIT enthielt insgesamt 200 Chemikalien, darunter 165 verschiedene organische Funktionsgruppen (8) (10) (11). Bei diesen Chemikalien handelte es sich meist um einkomponentige Stoffe; in der Studie wurden aber auch mehrere mehrkomponentige Stoffe berücksichtigt (darunter 10 Polymere). Hinsichtlich des Aggregatzustands und der UN-GHS-/CLP-Kategorien verteilten sich die 200 Prüfchemikalien wie folgt: 27 Flüssigkeiten der Kategorie 1, 24 Feststoffe der Kategorie 1, 19 Flüssigkeiten der Kategorie 2A, 10 Feststoffe der Kategorie 2A, 9 Flüssigkeiten der 2B, 8 Feststoffe der Kategorie 2B, 50 Flüssigkeiten der Kategorie Keine Einstufung und 53 Feststoffe der Kategorie Keine Einstufung (10) (11).

11. Diese Prüfmethode ist bei Stoffen und Gemischen sowie bei Feststoffen, Flüssigkeiten, halbfesten Stoffen und Wachsen anwendbar. Flüssigkeiten können wässrig oder nicht wässrig sein, Feststoffe in Wasser löslich oder unlöslich. Sofern möglich, sollten Feststoffe vor der Applikation zu Feinpulver gemahlen werden; eine weitere Behandlung der Probe ist nicht nötig. In den Validierungsstudien wurden keine Gase und Aerosole bewertet. Obwohl deren Prüfung mit der RhCE-Technologie prinzipiell vorstellbar ist, erlaubt die vorliegende Prüfmethode das Untersuchen von Gasen und Aerosolen nicht.

12. Prüfchemikalien, die Licht im selben Spektrum absorbieren können wie MTT-Formazan (natürlich oder nach einer Behandlung), und Prüfchemikalien, die in der Lage sind, den lebenswichtigen Farbstoff MTT zu reduzieren (zu MTT-Formazan), können die Messungen der Gewebeviabilität stören und erfordern die Verwendung geeigneter Kontrollen zur Korrektur. Die Art der möglicherweise erforderlichen geeigneten Kontrollen hängt von der Art der durch die Prüfchemikalie ausgelösten Interferenzen und vom Verfahren zur Quantifizierung von MTT-Formazan ab (Nummern 36-42).

13. Die Ergebnisse von Vorvalidierungsstudien (21) (22) und von umfassenden Validierungsstudien (8) (10) (11) haben gezeigt, dass sowohl der EpiOcular™ EIT als auch der SkinEthic™ HCE EIT auch in Labors durchgeführt werden können, die noch nicht über Erfahrungen mit der Durchführung dieser Assays verfügen, und dass die Ergebnisse sowohl innerhalb der Labors als auch zwischen den Labors reproduzierbar sind. Diesen Studien zufolge liegt die zu erwartende Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Übereinstimmung der Vorhersagen beim EpiOcular™ EIT mit Daten zu 113 Chemikalien bei 95 % (innerhalb von Labors) bzw. 93 % (zwischen Labors). Die zu erwartende Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Übereinstimmung der Vorhersagen beim SkinEthic™ HCE EIT mit Daten zu 120 Chemikalien beträgt 92 % (innerhalb von Labors) bzw. 95 % (zwischen Labors).

14. Der EpiOcular™ EIT kann auch zur Identifizierung von Chemikalien angewendet werden, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend gemäß dem UN GHS und der CLP-Verordnung erfordern. Aufgrund der in der Validierungsstudie ermittelten Daten (8) ergeben sich für den EpiOcular™ EIT eine Gesamtgenauigkeit von 80 % (bei 112 Chemikalien), eine Sensitivität von 96 % (bei 57 Chemikalien), eine Falsch-negativ-Rate von 4 % (bei 57 Chemikalien), eine Spezifität von 63 % (bei 55 Chemikalien) und eine Falsch-negativ-Rate von 37 % (bei 55 Chemikalien) im Vergleich zu den Daten des *In-vivo*-Kaninchenaugentests (PM B.5) (2) (14) bei Einstufung nach dem UN GHS und der CLP-Verordnung. In einer Studie, in der 97 flüssige agrochemische Zubereitungen mit dem EpiOcular™ EIT geprüft wurden, wurde für diese Art von Gemischen eine ähnliche Leistungsfähigkeit der Prüfmethode festgestellt wie in der Validierungsstudie (23). Die 97 Zubereitungen verteilten sich wie folgt: 21 Kategorie 1, 19 Kategorie 2A, 14 Kategorie 2B und 43 Keine Einstufung bei Einstufung nach dem UN GHS bezogen auf Referenzdaten des *In-vivo*-Kaninchenaugentests (PM B.5) (2) (14). Folgende Werte wurden ermittelt: Gesamtgenauigkeit 82 % (97 Zubereitungen), Sensitivität 91 % (54 Zubereitungen), Falsch-negativ-Rate 9 % (54 Zubereitungen), Spezifität 72 % (43 Zubereitungen) und Falsch-positiv-Rate 28 % (43 Zubereitungen) (23).

15. Der SkinEthic™ HCE EIT kann auch zur Identifizierung von Chemikalien angewendet werden, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend gemäß dem UN GHS und der CLP-Verordnung erfordern. Aufgrund der in der Validierungsstudie ermittelten Daten (10) (11) ergeben sich für den SkinEthic™ HCE EIT eine Gesamtgenauigkeit von 84 % (bei 200 Chemikalien), eine Sensitivität von 95 % (bei 97 Chemikalien), eine Falsch-negativ-Rate von 5 % (bei 97 Chemikalien), eine Spezifität von 72 % (bei 103 Chemikalien) und eine Falsch-negativ-Rate von 28 % (bei 103 Chemikalien) im Vergleich zu den Daten des *In-vivo*-Kaninchenaugentests (PM B.5) (2) (14) bei Einstufung nach dem UN GHS und der CLP-Verordnung.

16. Die mit beiden RhCE-Prüfungen mit Stoffen oder Gemischen ermittelten Falsch-negativ-Raten liegen bei 12 % der Gesamtwahrscheinlichkeit, dass Chemikalien im *In-vivo*-Draize-Augentest bei wiederholten Prüfungen entweder als UN-GHS-/CLP-Kategorie 2 oder als UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung ermittelt werden; dies ist auf die prüfungsimmanente Variabilität der Methode zurückzuführen (24). Die mit beiden RhCE-Prüfmethoden sowohl bei Stoffen als auch bei Gemischen ermittelten Falsch-positiv-Raten sind bei dieser Prüfmethode nicht kritisch, da alle Prüfchemikalien, für die sich eine Gewebeviabilität von kleiner oder gleich den festgelegten Grenzwerten ergibt (Nummer 44), je nach den rechtlichen Anforderungen im Rahmen einer sequenziellen Prüfstrategie nach einem

evicdenzbasierten Ansatz weiteren *In-vitro*-Prüfmethoden bzw. als letzte Möglichkeit Kaninchentests unterzogen werden müssen. Diese Prüfmethoden können für alle Arten von Chemikalien eingesetzt werden, wobei ein Negativergebnis als Indikator dafür akzeptiert werden sollte, dass die betreffenden Chemikalien nicht als augenreizend oder schwer augenschädigend einzustufen sind (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung). Außerdem sollten die zuständigen Regulierungsbehörden konsultiert werden, bevor die Kurzzeitprüfung mit dem EpiOcular™ EIT und dem SkinEthic™ HCE EIT unter Berücksichtigung einer anderen Klassifizierungsregelung als der des UN GHS bzw. der CLP-Verordnung durchgeführt wird.

17. Eine Einschränkung besteht bei dieser Prüfmethode darin, dass nicht zwischen Augenreizungen / reversiblen Wirkungen am Auge (Kategorie 2) und schweren Augenschädigungen / irreversiblen Wirkungen am Auge (Kategorie 1) im Sinne des UN GHS und der CLP-Verordnung und nicht zwischen einer augenreizenden Wirkung (optionale Kategorie 2A) und einer schwach augenreizenden Wirkung (optionale Kategorie 2B) im Sinne des UN GHS unterschieden werden kann (1). Um diese Unterscheidungen vornehmen zu können, müssen weitere Untersuchungen mit anderen *In-vitro*-Prüfmethoden vorgenommen werden.

18. Der Begriff „Prüfchemikalie" bezeichnet bei dieser Prüfmethode das, was geprüft wird, [2] und bezieht sich nicht auf die Anwendbarkeit der RhCE-Prüfmethode zur Prüfung von Stoffen und/oder Gemischen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

19. Die Prüfchemikalie wird oberflächlich auf zwei dreidimensionale RhE-Modelle appliziert. Nach der Exposition und der Inkubation im Anschluss an die Behandlung wird die Gewebeviabilität gemessen. Die RhCE-Gewebe werden aus primären humanen epidermalen Keratinozyten oder humanen immortalisierten Hornhaut-Epithelzellen rekonstruiert, die mehrere Tage bis zur Bildung eines geschichteten Plattenepithels mit ausgeprägter Differenzierung kultiviert wurden, das das menschliche Hornhaut-Epithel widerspiegelt. Das RhCE-Gewebemodell des EpiOcular™ EIT besteht aus mindestens drei lebensfähigen Zellschichten mit nicht verhornter Oberfläche mit hornhautartiger Struktur entsprechend der *In-vivo*-Struktur. Das RhCE-Gewebemodell des SkinEthic™ HCE EIT umfasst mindestens vier lebensfähige Zellschichten mit säulenartigen Basalzellen, Flügelzellen (Übergangszellen) und oberflächlichen Plattenepithelzellen ähnlich dem normalen menschlichen Hornhaut-Epithel (20) (26).

20. Chemisch induzierte Augenreizungen bzw. schwere Augenschädigungen, die sich *in vivo* vorwiegend in einer Hornhauttrübung, Iritis, Bindehautrötung und/oder einem Bindehautödem (Chemose) äußern, sind auf eine Kaskade von Ereignissen zurückzuführen, an deren Beginn das Eindringen der Chemikalien in die Hornhaut und/oder die Bindehaut und die Schädigung von Zellen stehen. Zellschädigungen können aufgrund unterschiedlicher Wirkungsweisen entstehen, darunter eine Lyse der Zellmembran (z. B. durch Tenside oder organische Lösungsmittel), die Koagulation von Makromolekülen (insbesondere Proteinen) (z. B. durch Tenside, organische Lösungsmittel, Laugen und Säuren), die Verseifung von Lipiden (z. B. durch Laugen) und Alkylierungen oder sonstige kovalente Wechselwirkungen mit Makromolekülen (z. B. durch Bleichmittel, Peroxide und Alkylierungsmittel) (15) (27) (28). Allerdings wurde nicht nachgewiesen, dass die Zytotoxizität unabhängig von den der Gewebeschädigung zugrunde liegenden physikalisch-chemischen Prozessen eine wichtige, wenn nicht die primäre, ursächliche Rolle bei der Ermittlung der Gesamtreaktion im Hinblick auf Augenreizungen bzw. schwere Augenschädigungen durch eine Chemikalie spielt (29) (30). Das Potenzial einer Chemikalie, eine Augenreizung oder eine schwere Augenschädigung zu verursachen, hängt vom Umfang der Ausgangsverletzung (31) ab, der mit dem Umfang, in dem Zellen absterben, (29) und mit dem Umfang der anschließenden Reaktionen und der endgültigen Ergebnisse (32) korreliert. Leichte Reizungen betreffen daher gewöhnlich nur das oberflächliche Hornhaut-Epithel, geringe und mäßige Reizungen schädigen hauptsächlich das Epithel und das oberflächliche Stroma, und schwere Reizungen führen zu Schädigungen des Epithels, des tiefen Stromas und gelegentlich des Hornhaut-Endothels (30) (33). Die Messung der Viabilität des RhCE-Gewebemodells nach der oberflächlichen Applikation einer Prüfchemikalie zur Ermittlung von Chemikalien, bei denen eine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend nicht erforderlich ist (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung), beruht auf der Annahme, dass alle Chemikalien, die Augenreizungen oder schwere Augenschädigungen verursachen, im Hornhaut-Epithel und/oder in der Bindehaut eine zytotixische Wirkung induzieren.

[2] Im Juni 2013 kam die Gemeinsame Tagung der OECD überein, dass der Begriff „Prüfchemikalie" zur Beschreibung des Prüfgegenstandes bei neuen und aktualisierten OCED-Prüfrichtlinien einheitlicher verwendet werden solle.

21. Die Viabilität des RhCE-Gewebes wird gewöhnlich anhand der durch die lebensfähigen Zellen des Gewebes bewirkten Enzymkonversion des Vitalfarbstoffs MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, Thiazolyl-Blau-Tetrazoliumbromid; CAS-Nummer 298-93-1] zu einem blauen MTT-Formazan-Salz gemessen, das nach seiner Extraktion aus Geweben quantifiziert wird (16). Chemikalien, bei denen eine Einstufung und Kennzeichnung nach dem UN GHS bzw. der CLP-Verordnung nicht erforderlich ist (Kategorie Keine Einstufung), sind die Chemikalien, bei denen die Viabilität des Gewebes eine festgelegte Grenze nicht unterschreitet (d. h. Gewebeviabilität > 60 % beim EpiOcular™ EIT und beim SkinEthic™ HCE EITL ([3]) und > 50 % beim SkinEthic™ HCE EITS ([4])) (Nummer 44).

NACHWEIS DER LEISTUNGSFÄHIGKEIT

22. Vor der routinemäßigen Durchführung von RhCE-Prüfungen für rechtliche Zwecke sollten Labors die erforderliche technische Befähigung durch eine ordnungsgemäße Einstufung der 15 in Tabelle 1 genannten Chemikalien nachweisen. Diese Chemikalien wurden unter den in den Validierungsstudien der VRM verwendeten Chemikalien ausgewählt (8) (10) (11). Die Auswahl beinhaltet nach Möglichkeit Chemikalien, die (i) verschiedene Aggregatzustände abdecken, (ii) das gesamte Spektrum an *in vivo* auftretenden Augenreizungen bzw. schweren Augenschädigungen nach hochwertigen Ergebnissen des *In-vivo*-Kaninchenaugen-Referenztests (PM B.5) (2) (14) sowie nach dem UN GHS (d. h. Kategorien 1, 2A, 2B und Keine Einstufung) (1) und nach der CLP-Verordnung (d. h. Kategorien 1 oder 2 bzw. Keine Einstufung) abdecken, (iii) die verschiedenen *In-vivo*-Einstufungsparameter abdecken (24) (25), (iv) repräsentativ für die in der Validierungsstudie verwendeten Chemikalienklassen sind (8) (10) (11), (v) organische Funktionsgruppen gut und umfassend repräsentieren (8) (10) (11), (vi) gut definierte chemische Strukturen aufweisen (8) (10) (11), (vii) farbig und/oder direkte MTT-Reduktionsmittel sind, (viii) bei der Validierung zu reproduzierbaren Ergebnissen geführt haben, (ix) mit RhCE-Prüfmethoden in den jeweiligen Validierungsstudien korrekt vorhergesagt wurden, (x) das gesamte Spektrum an *In-vitro*-Reaktionen abdecken, das mit hochwertigen RhCE-Prüfmethoden ermittelt wurde (Viabilität 0-100 %), (xi) im Handel erhältlich sind und (xii) nicht mit untragbar hohen Beschaffungs- und/oder Entsorgungskosten verbunden sind. Wenn eine genannte Chemikalie nicht erhältlich ist oder aus sonstigen berechtigten Gründen nicht verwendet werden kann, kann eine andere Chemikalie eingesetzt werden, die die oben beschriebenen Anforderungen erfüllt (z. B. eine bei der Validierung der VRM verwendete Chemikalie). Solche Abweichungen sollten nur in gerechtfertigten Fällen vorkommen.

Tabelle 1

Liste der Leistungschemikalien

Chemische Bezeichnung	CAS-Nr.	Organische Funktionsgruppe ([1])	Aggregatzustand	Viabilität VRM 1 (%) ([2])	Viabilität VRM 2 (%) ([3])	Vorhersage VRM	MTT-Reduktionsmittel	Farbinterf.
***In-vivo*-Kategorie 1** ([4])								
Methylmercaptoacetat (Methylthioglykolat)	2365-48-2	Carbonsäureester, Thioalkohol	L	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	Keine Vorhersage möglich	J (stark)	N
Hydroxyethylacrylat	818-61-1	Acrylat,Alkohol	L	7,5 ± 4,7 ([5])	1,6 ± 1,0	Keine Vorhersage möglich	N	N
2,5-Dimethyl-2,5-hexanediol	110-03-2	Alkohol	S	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	Keine Vorhersage möglich	N	N
Natriumoxalat	62-76-0	Oxocarbonsäure	S	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	Keine Vorhersage möglich	N	N
In-vivo-Kategorie 2A ([4])								
2,4,11,13-Tetraazatetradecan-diimidamid, N,N″-Bis(4-Chlorphenyl)-3,12-diimino-, di-D-gluconat (20 %, wässrig) ([6])	18472-51-0	Aromatisches heterozyklisches Halogenid, Aryl-Halogenid, Dihydroxyl-Gruppe, Guanidin	L	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	Keine Vorhersage möglich	N	J (schwach)

([3]) EITL: SkinEthic™ HCE EIT bei Flüssigkeiten.
([4]) EITS: SkinEthic™ HCE EIT bei Feststoffen.

Chemische Bezeichnung	CAS-Nr.	Organische Funktionsgruppe ([1])	Aggregatzustand	Viabilität VRM 1 (%) ([2])	Viabilität VRM 2 (%) ([3])	Vorhersage VRM	MTT-Reduktionsmittel	Farbinterf.
Natriumbenzoat	532-32-1	Aryl, Carboxylsäure	S	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	Keine Vorhersage möglich	N	N

***In-vivo-Kategorie* 2B** ([4])

Diethyltoluamid	134-62-3	Benzamid	L	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	Keine Vorhersage möglich	N	N
2,2-Dimethyl-3-methylenbicyclo[2.2.1]-heptan;	79-92-5	Alkan, verzweigt mit tertiärem Kohlenstoff; Alken; Bicycloheptan; Kohlenstoffzyklen mit Brückenbindung; Cycloalkan	S	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	Keine Vorhersage möglich	N	N

***In Vivo Keine* Einstufung** ([4])

1-Ethyl-3-methylimidazoliumethylsulfat	342573-75-5	Alkoxy, Ammoniumsalz, Aryl; Imidazol, Sulfat	L	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Keine Einst.	N	N
Dicaprylylether	629-82-3	Alkoxy, Ether	L	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Keine Einst.	N	N
Piperonylbutoxid	51-03-6	Alkoxy, Benzodioxol, Benzyl, Ether	L	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Keine Einst.	N	N
Polyethylenglycol (PEG-40) hydriertes Rizinusöl	61788-85-0	Acylal, Alkohol, Allyl, Ether	Viskose Flüssigkeit	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Keine Einst.	N	N
1-(4-Chlorphenyl)-3-(3,4-dichlorphenyl)-harnstoff	101-20-2	Aromatisches heterozyklisches Halogenid, Aryl-Halogenid, Harnstoffderivate	S	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	Keine Einst.	N	N
2,2′-Methylen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol)	103597-45-1	Alkan verzweigt mit quartärem Kohlenstoff, kondensierte carbocyclische aromatische Verbindungen, kondensierte gesättigte Heterocyclen, Vorläuferchemikalien quinoider Verbindungen, tert-Butyl	S	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	Keine Einst.	N	N

Chemische Bezeichnung	CAS-Nr.	Organische Funktionsgruppe ([1])	Aggregatzustand	Viabilität VRM 1 (%) ([2])	Viabilität VRM 2 (%) ([3])	Vorhersage VRM	MTT-Reduktionsmittel	Farbinterf.
Kaliumtetrafluoroborat	14075-53-7	Anorganische Salze	S	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Keine Einst.	N	N

Abkürzungen:

CASRN = Registernummern des Chemical Abstracts Service.; UN GHS = United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (1); VRM 1 = validierte Referenzmethode, EpiOcular™ EIT; VRM 2 = validierte Referenzmethode, SkinEthic™ HCE EIT; Farbinterf. = Farbinterferenz mit der Standardabsorption (optische Dichte (OD)) Messung von MTT-Formazan.

([1]) Organische Funktionsgruppe, zugewiesen aufgrund einer Nested Analysis der OECD Toolbox 3.1 (8).

([2]) Nach den Ergebnissen eines EpiOcular™ EIT in der EURL ECVAM/Cosmetics Europe Eye Irritation Validation Study (EIVS) (8).

([3]) Nach den Ergebnissen des SkinEthic™ HCE EIT in der Validierungsstudie (10) (11).

([4]) Nach den Ergebnissen des *In-vivo*-Kaninchenaugentests (PM B.5/OECD TG 405) (2) (14) unter Berücksichtigung des UN GHS.

([5]) Nach den Ergebnissen der Studie des CEFIC CONsortium for *in vitro* Eye Irritation testing strategy (CON4EI).

([6]) Die Einstufung in die Kategorie 2A oder 2B ist von der Auswertung der Kriterien des UN-GHS zur Unterscheidung zwischen diesen beiden Kategorien abhängig, d. h. für eine Einstufung in die Kategorie 2A müssen an 1 von 3 gegenüber 2 von 3 Tieren Wirkungen an Tag 7 beobachtet werden. Die *In-vivo*-Studie umfasste drei Tiere. Alle Endpunkte mit Ausnahme einer Hornhauttrübung bei einem Tier, gingen bis Tag 7 oder früher auf einen Wert von null zurück. Das eine Tier, das sich bis Tag 7 nicht vollständig regeneriert hatte, wies (an Tag 7) einen Hornhauttrübungswert von 1 auf, der an Tag 9 ganz zurückgegangen war.

PRÜFVERFAHREN

23. Im Rahmen des Nachweises der Leistungsfähigkeit sollten die Benutzer die vom Hersteller des RhCE-Gewebemodells spezifizierten Barriereeigenschaften der Gewebe nach Erhalt überprüfen (Nummern 25, 27 und 30). Dies ist besonders dann wichtig, wenn die Gewebe über große Entfernungen/Zeiträume transportiert werden. Sobald eine Prüfung erfolgreich etabliert und ihre Leistungsfähigkeit festgestellt und nachgewiesen wurde, ist diese Überprüfung nicht mehr routinemäßig erforderlich. Allerdings empfiehlt es sich auch bei routinemäßig durchgeführten Prüfungen, die Barriereeigenschaften in regelmäßigen Abständen zu kontrollieren.

24. Gegenwärtig entsprechen der EpiOcular™ EIT und der SkinEthic™ HCE EIT als wissenschaftlich fundierte Prüfungen dieser Prüfmethode (9) (12) (13); diese Prüfungen werden auch als validierte Referenzmethoden (VRM 1 bzw. VRM 2) bezeichnet. Für die RhCE-Prüfmethoden liegen Standardarbeitsanweisungen vor, die bei der Umsetzung und Verwendung dieser Prüfmethoden im Labor angewendet werden sollten (34) (35). In den folgenden Abschnitten sowie in Anlage 2 werden die wesentlichen Elemente und Verfahren der RhCE-Prüfungen beschrieben.

ELEMENTE DER RHCE-PRÜFMETHODE

Allgemeine Bedingungen

25. Zur Rekonstruktion des aus progressiv geschichteten, aber nicht verhornten Zellen bestehenden dreidimensionalen hornhautartigen Epithelgewebes sind die betreffenden menschlichen Zellen zu verwenden. Das RhCE-Gewebemodell wird in Einsätzen mit einer porösen synthetischen Membran konstruiert, durch die Nährstoffe in die Zellen gelangen können. Das rekonstruierte hornhautartige Epithel sollte mehrere Schichten lebensfähiger nicht verhornter Epithelzellen enthalten. Beim RhCE-Gewebemodell sollte die Epitheloberfläche unmittelbar mit der Luft in Berührung kommen, damit eine oberflächliche Exposition gegenüber den Prüfchemikalien ähnlich wie *in vivo* beim natürlichen Hornhaut-Epithel erfolgen kann. Das RhCE-Gewebemodell sollte eine funktionsfähige Barriere bilden, die so robust ist, dass sie eine rasche Durchdringung zytotoxischer Referenzstoffe (z. B. Triton X-100 oder Natriumdodecylsulfat (SDS)) verhindert. Die Barrierefunktion sollte nachgewiesen werden. Zur Beurteilung der Barrierewirkung kann entweder die Expositionszeit, bei der nach Applikation eines Referenzstoffs in einer bestimmten festgelegten Konzentration (z. B. 100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100) die Viabilität eines Gewebes um 50 % reduziert wird (ET_{50}), oder die Konzentration bestimmt werden, bei der ein Referenzstoff nach einer bestimmten Expositionszeit (z. B. nach 30-minütiger Behandlung mit 50 µl SDS) die Viabilität der Gewebe um 50 % reduziert (IC_{50}) (Nummer 30). Die Rückhalteeigenschaften des RhCE-Gewebemodells müssen ausschließen, dass die Prüfchemikalie rund um die Hornschicht in lebensfähiges Gewebe eindringt und die Modellierung der Hornhautexposition beeinträchtigt. Die zur Herstellung des RhCE-Gewebemodells verwendeten menschlichen Zellen müssen frei von Verunreinigungen durch Bakterien, Viren, Mycoplasma und Pilze sein. Der Hersteller prüft die Sterilität des Gewebemodells und stellt sicher, dass das Modell nicht durch Pilze oder Bakterien verunreinigt ist.

Funktionale Bedingungen

Viabilität

26. Die Größenordnung der Viabilität der Gewebe wird mit der MTT-Prüfung bestimmt (16). Die lebensfähigen Zellen des RhCE-Gewebemodells reduzieren den lebenswichtigen Farbstoff MTT zu einem blauen MTT-Formazan-Niederschlag, der dann mit Isopropanol (oder einem ähnlichen Lösungsmittel) aus dem Gewebe extrahiert wird. Das extrahierte MTT-Formazan kann durch eine Standard-(OD)-Absorptionsmessung oder mit einem HPLC/UPLC-Spektrometrieverfahren (OD = optische Dichte) (36) quantifiziert werden. Die optische Dichte (OD) des reinen Extraktionslösungsmittels sollte ausreichend gering sein, d. h. OD < 0,1. Das RhCE-Gewebemodell sollte sicherstellen, dass

jede Charge des verwendeten RhCE-Gewebemodells die vorgegebenen Kriterien für die Negativkontrolle erfüllt. Die Akzeptanzspannen der OD-Werte der Negativkontrolle für die VRM sind Tabelle 2 zu entnehmen. Bei Durchführung einer HPLC/UPLC-Spektrophotometrie sollten die in Tabelle 2 genannten OD-Spannen der Negativkontrolle als Akzeptanzkriterium für die Negativkontrolle angenommen werden. Im Prüfbericht sollte dokumentiert werden, dass die mit dem Negativkontrollstoff behandelten Gewebe über den gesamten Expositionszeitraum stabil bleiben (bzw. dass eine vergleichbare Gewebeviabilität gemessen wird). Entsprechend verfährt der Hersteller des Gewebes im Rahmen der Qualitätskontrolle zur Freigabe der Gewebecharge. Dabei können allerdings andere als die in Tabelle 2 genannten Akzeptanzkriterien maßgeblich sein. Der Entwickler/Hersteller des RhCE-Gewebemodells sollte eine Akzeptanzspanne (oberer und unterer Grenzwert) für die OD-Werte der Negativkontrolle (unter den Bedingungen bei der Qualitätskontrolle der Prüfmethode) festlegen.

Tabelle 2

Akzeptanzspannen für OD-Werte der Negativkontrolle zur Kontrolle der Chargenqualität (für die Anwender der Prüfung)

Prüfung	Untere Akzeptanzgrenze	Obere Akzeptanzgrenze
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM 1 (Protokolle für Flüssigkeiten und für Feststoffe)	> 0,8 ([1])	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM 2 (Protokolle für Flüssigkeiten und für Feststoffe)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Diese Akzeptanzgrenze trägt der Möglichkeit längerer Versand- oder Lagerzeiten (z. B. > 4 Tage) Rechnung, die nachweislich keine Auswirkungen auf die Leistungsfähigkeit der Prüfmethode haben (37).

Barrierefunktion

27. Das RhCE-Gewebemodell sollte so dick und robust sein, dass es ein rasches Eindringen der zytotoxischen Referenzstoffe verhindert; als Maßstab sind die Werte z. B. für ET_{50} (Triton X-100) oder IC_{50} (SDS) (Tabelle 3) anzunehmen. Die Barrierefunktion der einzelnen Chargen des verwendeten RhCE-Gewebemodells sollte nach der Lieferung der Gewebe an den Endverwender vom Entwickler/Hersteller des RhCE-Gewebemodells nachgewiesen werden (Nummer 30).

Morphologie

28. Anhand einer histologischen Untersuchung des RhCE-Gewebemodells sollte die Ähnlichkeit des Epithelgewebes mit der menschlichen Hornhaut (bei mindestens 3 Schichten lebensfähiger Epithelzellen und nicht verhornter Oberfläche) nachgewiesen werden. Für die VRM hat der Entwickler/Hersteller eine geeignete Morphologie nachgewiesen. Daher brauchen die Anwender der Prüfmethode diesen Nachweis nicht für jede einzelne verwendete Gewebecharge neu zu führen.

Reproduzierbarkeit

29. Die Ergebnisse der Positivkontrolle und der Negativkontrollen der Prüfmethode sollen die Reproduzierbarkeit über längere Zeit belegen.

Qualitätskontrolle (QK)

30. Das RhCE-Gewebemodell sollte nur dann verwendet werden, wenn der Entwickler/Hersteller nachweist, dass jede Charge des verwendeten RhCE-Gewebemodells bestimmten Freigabekriterien genügt, von denen die Kriterien der Viabilität (Nummer 26) und der Barrierefunktion (Nummer 27) die wichtigsten sind. Der Entwickler/Hersteller des RhCE-Gewebemodells legt eine Akzeptanzspanne (oberer und unterer Grenzwert) für die Barrierefunktionen anhand der Werte für ET_{50} oder IC_{50} (Nummern 25 und 26) fest. Die vom Entwickler/Hersteller der RhCE-Gewebemodelle bei der Qualitätskontrolle für die Freigabe einer Charge angenommenen (und für die VRM verwendeten) Akzeptanzspannen für ET_{50} und IC_{50} sind Tabelle 3 zu entnehmen. Der Entwickler/Hersteller des RhCE-Gewebemodells stellt den Anwendern der Prüfmethode Daten zur Verfügung, die die Erfüllung sämtlicher Freigabekriterien belegen, damit die Anwender die betreffenden Informationen im Prüfbericht berücksichtigen können. Für die zuverlässige Vorhersage, dass Chemikalien eine Einstufung und Kennzeichnung im Hinblick auf eine augenreizende oder schwer augenschädigende Wirkung nach dem UN GHS bzw. der CLP-Verordnung nicht erfordern, können ausschließlich Ergebnisse akzeptiert werden, die mit Geweben ermittelt wurden, die diese Freigabekriterien vollständig erfüllen.

Tabelle 3

Chargenfreigabekriterien im Rahmen der Qualitätskontrolle

Prüfung	Untere Akzeptanzgrenze	Obere Akzeptanzgrenze
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM 1 (100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100)	ET_{50} = 12,2 min	ET_{50} = 37,5 min
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM 2 (30-minütige Behandlung mit 50 µl SDS)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Applikation der Prüfchemikalie und der Kontrollstoffe

31. Für jede Prüfchemikalie und für jeden Prüfstoff sollten bei jedem Prüflauf mindestens zwei Gewebereplikate verwendet werden. Zwei unterschiedliche Behandlungsprotokolle werden verwendet (jeweils eines für flüssige und eines für feste Prüfchemikalien) (34) (35). Bei beiden Methoden und Protokollen ist die Oberfläche des Gewebemodells vor der Applikation von Prüfchemikalien mit calcium- und magnesiumfreiem Dulbecco-Phosphatpuffer (Ca^{2+}/Mg^{2+}-freiem DPBS) zu befeuchten, um eine Feuchtigkeit ähnlich wie am menschlichen Auge herzustellen. Die Behandlung der Gewebe beginnt mit der Exposition gegenüber den Prüfchemikalien und den Kontrollstoffen. Nach den beiden Behandlungsprotokollen der beiden VRM sind die Prüfchemikalien und Kontrollstoffe so ausreichend aufzutragen, dass die gesamte Epitheloberfläche gleichmäßig bedeckt, eine unklare Dosierung jedoch vermieden wird (Nummern 32 und 33) (Anlage 2).

32. Prüfchemikalien, die bei höchstens 37 °C pipettiert werden können (erforderlichenfalls mit einer Direktverdränger-Pipette), werden in den VRM als Flüssigkeiten behandelt; ansonsten sind die Prüfchemikalien als Feststoffe zu betrachten (Nummer 33). Bei den VRM wird die flüssige Prüfchemikalie gleichmäßig auf die Gewebeoberfläche aufgetragen (mindestens 60 µl/cm^2) (siehe Anlage 2, (33) (34)). Kapillareffekte (Wirkungen der Oberflächenspannung), die aufgrund der geringen Volumina der in den Einsatz (auf die Gewebeoberfläche) aufgetragenen Chemikalien auftreten könnten, sollten möglichst vermieden werden, um eine korrekte Dosierung bei der Behandlung des Gewebes sicherzustellen. Mit flüssigen Prüfchemikalien behandelte Gewebe werden 30 Minuten bei Standard-Kulturbedingungen (37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relative Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Am Ende des Expositionszeitraums werden die flüssige Prüfchemikalie und die Kontrollstoffe unter gründlichem Waschen mit Ca^{2+}/Mg^{2+}-freiem DPBS bei Raumtemperatur vorsichtig von der Gewebeoberfläche entfernt. Nach der Behandlung und nach dem Waschen erfolgt eine Immersion des Gewebes bei Raumtemperatur für einen bestimmten, je nach VRM unterschiedlichen Zeitraum in ein frisches Medium, um im Gewebe absorbierte Rückstände der Prüfchemikalien zu entfernen. Nur bei VRM 1 werden die Zellen nach der Exposition und vor der Durchführung der MTT-Prüfung in einem frischen Medium bei Standard-Kulturbedingungen inkubiert (siehe Anlage 2, (34) (35)).

33. Prüfchemikalien, die bei Temperaturen bis zu 37 °C nicht pipettiert werden können, werden in den VRM als Feststoffe behandelt. Die Prüfchemikalie sollte in ausreichender Menge aufgetragen werden, um die gesamte Oberfläche des Gewebes zu bedecken (d. h. mindestens 60 mg/cm^2 (Anlage 2)). Feststoffe sollten nach Möglichkeit als Feinpulver geprüft werden. Mit festen Prüfchemikalien behandelte Gewebe werden über einen festgelegten Zeitraum (je nach VRM) bei Standard-Kulturbedingungen inkubiert (siehe Anlage 2, (34) (35)). Am Ende des Expositionszeitraums werden die feste Prüfchemikalie und die Kontrollstoffe unter gründlichem Waschen mit Ca^{2+}/Mg^{2+}-freiem DPBS bei Raumtemperatur vorsichtig von der Gewebeoberfläche entfernt. Nach der Behandlung und nach dem Waschen erfolgt eine Immersion des Gewebes bei Raumtemperatur für einen bestimmten, je nach VRM unterschiedlichen, Zeitraum in ein frisches Medium, um im Gewebe absorbierte Rückstände der Prüfchemikalien zu entfernen. Nach der Exposition und vor der Durchführung der MTT-Prüfung werden die Zellen in frischem Medium bei Standard-Kulturbedingungen inkubiert (siehe Anlage 2, (34) (35)).

34. Bei jedem Prüflauf sind gleichzeitige Negativ- und Positivkontrollen zu berücksichtigen, um nachzuweisen, dass die Werte für die Viabilität (mit der Negativkontrolle ermittelt) und die Sensitivität (mit der Positivkontrolle ermittelt) der Gewebe innerhalb der anhand historischer Daten festgelegten Akzeptanzspannen liegen. Die gleichzeitige Negativkontrolle dient auch als Referenzwert (Gewebeviabilität 100 %) zur Berechnung der relativen Viabilität der mit der Prüfchemikalie behandelten Gewebe (% $Viabilität_{Prüfung}$). Der für die VRM empfohlene Positivkontrollstoff ist reines Methylacetat (CAS-Nr. 79-20-9, im Handel erhältlich beispielsweise von Sigma-Aldrich, Bestellnr. 45997, flüssig). Als Negativkontrollstoffe für VRM 1 und VRM 2 werden ultrareines H_2O bzw. Ca^{2+}/Mg^{2+}-freier DPBS empfohlen. Diese Kontrollstoffe wurden in den Studien zur Validierung der VRM verwendet und für diese Kontrollstoffe liegen die umfangreichsten historischen Daten vor. Die Verwendung geeigneter alternativer Positiv- oder Negativkontrollstoffe sollte wissenschaftlich begründet und angemessen gerechtfertigt sein. Negativ- und Positivkontrollen sollten mit denselben Protokollen wie die im jeweiligen Prüflauf (d. h. für Flüssigkeiten und/oder Feststoffe) verwendeten Prüfchemikalien geprüft werden. Vor der Durchführung der MTT-Prüfung (Nummer 35) ist hinsichtlich der Exposition und ggf. der Immersion nach der Behandlung das Protokoll so einzuhalten, wie für die gleichzeitig durchgeführten Kontrollen bei flüssigen Prüfchemikalien (Nummer 32) bzw. bei festen Prüfchemikalien (Nummer 33) beschrieben (34) (35). Eine einzelne Gruppe von Negativ- und Positivkontrollen ist für alle in einem Prüflauf berücksichtigten Prüfchemikalien jeweils eines Aggregatzustands (flüssig oder fest) ausreichend.

Messungen der Gewebeviabilität

35. Die MTT-Prüfung ist eine standardisierte quantitative Methode (16), die zur Messung der Gewebeviabilität nach dieser Prüfmethode angewandt werden sollte. Sie ist zur Anwendung in einem dreidimensionalen Gewebemodell geeignet. Die MTT-Prüfung wird unmittelbar im Anschluss an die Inkubation nach der Behandlung durchgeführt. Bei den VRM wird die Probe des RhCE-Gewebemodells 180 ± 15 Minuten bei Standard-Kulturbedingungen in 0,3 ml MTT-Lösung (1 mg/ml) gegeben. Der Vitalfarbstoff MTT wird durch die lebensfähigen Zellen des RhCE-Gewebemodells zu einem blauen MTT-Formazan-Niederschlag reduziert. Der blaue MTT-Formazan-Niederschlag wird dann mit einer geeigneten Menge Isopropanol (oder einem ähnlichen Lösungsmittel) aus dem Gewebe extrahiert (34) (35). Mit flüssigen Prüfchemikalien geprüfte Gewebe sind sowohl oben als auch unten aus dem Gewebe zu extrahieren. Mit festen Prüfchemikalien und mit gefärbten Flüssigkeiten geprüfte Gewebe dagegen sind ausschließlich aus dem unteren Bereich zu extrahieren (um die Gefahr einer Verunreinigung der Isoropanol-Extraktionslösung durch möglicherweise im Gewebe verbliebene Prüfchemikalien zu minimieren). Bei Geweben, die mit flüssigen Prüfchemikalien geprüft wurden, die nicht ohne Weiteres auswaschbar sind, muss die Extraktion unter Umständen ebenfalls ausschließlich aus dem unteren Bereich des Gewebes erfolgen. Die gleichzeitig geprüften Negativ- und Positivkontrollstoffe sind wie die geprüfte Chemikalie zu behandeln. Das extrahierte MTT-Formazan kann entweder durch eine Standardabsorptions-(OD-)Messung bei 570 nm innerhalb einer Filter-Bandbreite von maximal ± 30 nm oder mit einem HPLC/UPLC-Spektrophotometrieverfahren gemessen werden (Nummer 42) (11) (36).

36. Die optischen Eigenschaften der Prüfchemikalie bzw. ihre chemische Wirkung auf das MTT können die MTT-Formazan-Messung beeinträchtigen und dazu führen, dass die Gewebeviabilität falsch eingeschätzt wird. Prüfchemikalien können die MTT-Formazan-Messung durch direkte Reduzierung des MTT zu blauem MTT-Formazan und/oder durch Farbinterferenzen stören, wenn die Prüfchemikalie an sich oder infolge von Behandlungsverfahren in demselben OD-Bereich wie das MTT-Formazan (570 nm) absorbiert. Vor der eigentlichen Prüfung sind Vorprüfungen durchzuführen, um direkt wirkende potenzielle MTT-Reduziermittel und/oder Chemikalien zu ermitteln, die Farbinterferenzen verursachen können. Außerdem sollten weitere Kontrollen verwendet werden, um potenzielle Interferenzen aufgrund dieser Prüfchemikalien erkennen und korrigieren zu können (Nummern 37-41). Dies ist besonders dann wichtig, wenn eine bestimmte Prüfchemikalie nicht vollständig aus dem RhCE-Gewebemodell ausgewaschen wurde oder das hornhautartige Epithel durchdringt und daher bei Durchführung der MTT-Prüfung auch in den RhCE-Gewebemodellen enthalten ist. Bei Prüfchemikalien, die (an sich oder nach einer Behandlung) Licht im selben Bereich wie MTT-Formazan absorbieren und wegen übermäßiger Interferenzen (d. h. einer Absorption bei 570 ± 30 nm) nicht mit der Standardabsorptions-(OD-)Messung bei MTT-Formazan im Einklang stehen, kann eine MTT-Formazan-Messung mit einem HPLC/UPLC-Spektrophotometrieverfahren vorgenommen werden (Nummern 41 und 42) (11) (36). Eine genaue Beschreibung der Vorgehensweise zur Erkennung und Korrektur einer direkten MTT-Reduktion sowie von Interferenzen durch Färbemittel ist den Standardarbeitsanweisungen für die VRM zu entnehmen (34) (35). Die Flussdiagramme in den Anhängen III und IV veranschaulichen die Vorgehensweise zur Erkennung und Behandlung von direkt wirkenden MTT-Reduktionsmitteln und von Farbinterferenzen verursachenden Chemikalien für die VRM 1 und 2.

37. Um potenzielle Interferenzen durch Prüfchemikalien zu ermitteln, die (an sich oder nach einer Behandlung) Licht im selben Spektrum wie MTT-Formazan absorbieren, und um entscheiden zu können, ob weitere Kontrollen erforderlich sind, wird die Prüfchemikalie zu Wasser und/oder Isopropanol hinzugegeben und über einen angemessenen Zeitraum bei Raumtemperatur inkubiert (siehe Anlage 2, (34) (35)). Wenn die Prüfchemikalie bei VRM 1 in Wasser und/oder Isopropanol ausreichend Licht im Bereich von 570 ± 20 nm absorbiert (siehe Anlage 3), oder wenn bei VRM 2 eine farbige Lösung entsteht, wenn die Prüfchemikalie mit Wasser gemischt wird (siehe Anlage 4), ist anzunehmen, dass die Prüfchemikalie bei der Standardabsorptions-(OD-)Messung von MTT-Formazan Interferenzen verursacht; in diesem Fall sind weitere Farbkontrollen oder eine HPLC/UPLC-Spektrophotometrie vorzunehmen. Die betreffenden Kontrollen werden dann nicht benötigt (Nummern 41 und 42 sowie Anhänge III und IV) (34) (35). Bei Durchführung der Standardabsorptions-(OD-)Messung wird jede interferierende Prüfchemikalie auf mindestens zwei lebensfähige Gewebereplikate aufgetragen; diese Replikate werden dem vollständigen Prüfverfahren unterzogen, aber während der MTT-Inkubation nicht mit der MTT-Lösung, sondern mit einem Medium inkubiert, um in lebendem Gewebe eine nicht spezifische Farbe (NSC_{lebend}) zu erzeugen (34) (35). Die NSC_{lebend}-Kontrolle muss gleichzeitig mit der Untersuchung des Prüffarbstoffs durchgeführt werden, und bei mehreren Prüfungen ist wegen der inhärenten biologischen Variabilität lebender Gewebe für jede durchgeführte Prüfung (bei jedem Prüflauf) eine unabhängige NSC_{lebend}-Kontrolle zu prüfen. Die tatsächliche Viabilität des Gewebes wird als Prozentanteil der ermittelten Viabilität bei lebendem Gewebe nach der Exposition gegenüber der interferierenden Prüfchemikalie und nach Inkubation mit der MTT-Lösung (% $Viabilität_{Prüfung}$) abzüglich des Prozentanteils der nicht spezifischen Farbe berechnet, die bei gleichzeitig mit der zu korrigierenden Prüfung untersuchten lebenden Geweben nach Exposition gegenüber der interferierenden Prüfchemikalie und nach Inkubation mit einem Medium ohne MTT entstanden ist (% NSC_{lebend}), d. h. tatsächliche Gewebeviabilität = [% $Viabilität_{Prüfung}$] - [% NSC_{lebend}].

38. Um direkte MTT-Reduktionsmittel zu identifizieren, sollten die Prüfchemikalien jeweils zu frisch hergestellter MTT-Lösung hinzugegeben werden. Eine geeignete Menge einer Prüfchemikalie wird zu einer MTT-Lösung hinzugegeben und etwa 3 Stunden unter Standard-Kulturbedingungen inkubiert (siehe Anhänge III und IV) (34) (35). Wenn sich das MTT-Gemisch mit der Prüfchemikalie (bzw. die Suspension bei nicht lösliche Prüfchemikalien) blau/violett färbt, ist davon auszugehen, dass die Prüfchemikalie das MTT direkt reduziert; anschließend sollte unabhängig von der Durchführung der Standardabsorptions-(OD-)Messung oder einer HPLC/UPLC-Spektrophotometrie eine weitere Funktionsprüfung der nicht lebensfähigen RhCE-Gewebemodelle vorgenommen werden. Bei dieser zusätzlichen Funktionsprüfung werden abgetötete Gewebe mit nur noch residualer metabolischer Aktivität eingesetzt, die die Prüfchemikalie in ähnlicher Weise wie lebensfähige Gewebe absorbieren und binden. Bei der VRM 1 werden Gewebe abgetötet, indem sie einer niedrigen Temperatur ausgesetzt werden („durch Gefrieren abgetötet"). Bei der VRM 2 werden Gewebe abgetötet, indem sie über einen längeren Zeitraum (z. B. mindestens 24 ± 1 Std.) in Wasser inkubiert und anschließend bei einer niedrigen Temperatur aufbewahrt werden („in Wasser abgetötet"). Jede MTT reduzierende Prüfchemikalie wird auf mindestens zwei abgetötete Gewebereplikate aufgetragen, die dem gesamten Prüfverfahren unterzogen werden, um eine nicht spezifische MTT-Reduktionskontrolle (NSMTT-Reduktion) herzustellen (34) (35). Pro Prüfchemikalie ist unabhängig von der Anzahl der durchgeführten unabhängigen Prüfungen/Prüfläufe eine einzelne NSMTT-Kontrolle ausreichend. Anschließend wird die tatsächliche Viabilität des Gewebes als Prozentanteil der bei lebenden Geweben nach Exposition gegenüber dem MTT-Reduktionsmittel gemessenen Viabilität (% $Viabilität_{Prüfung}$) abzüglich des Prozentanteils der nicht spezifischen MTT-Reduktion durch dasselbe MTT-Reduktionsmittel bei abgetöteten Geweben bezogen auf die gleichzeitig mit der zu korrigierenden Prüfung untersuchte Negativkontrolle (% NSMTT), d. h. tatsächliche Gewebeviabilität = [% $Viabilität_{Prüfung}$] - [% NSMTT], berechnet.

39. Bei Prüfchemikalien, die sowohl Farbinterferenzen (Nummer 37) als auch eine direkte MTT-Reduktion (Nummer 38) verursachen, wird für die Standardabsorptions-(OD-)Messung außer der NSMTT-Kontrolle und der NSC_{lebend}-Kontrolle (siehe vorstehende Abschnitte) eine dritte Gruppe von Kontrollen benötigt. Dies ist gewöhnlich bei dunklen Prüfchemikalien der Fall, die beim MTT-Versuch Licht im Bereich von 570 ± 30 nm (z. B. blau, violett oder schwarz) absorbieren, weil deren Fähigkeit zur direkten MTT-Reduktion durch die inhärente Farbqualität dieser Chemikalien beeinträchtigt wird (Nummer 38). In diesen Fällen sind zusammen mit den NSC_{lebend}-Kontrollen regelmäßig NSMTT-Kontrollen zu verwenden. Prüfchemikalien, bei denen sowohl NSMTT-Kontrollen als auch NSC_{lebend}-Kontrollen untersucht wurden, können von lebenden und von abgetöteten Geweben absorbiert und gebunden werden. Daher kann in diesen Fällen bei der NSMTT-Kontrolle eine Korrektur nicht nur der potentiellen direkten MTT-Reduktion durch die Prüfchemikalie, sondern auch der Farbinterferenz infolge der Absorption und der Bindung der Prüfchemikalie an

abgetötete Gewebe erfolgen. Dies kann eine doppelte Korrektur der Farbinterferenz zur Folge haben, da mit der NSC_{lebend}-Kontrolle bereits eine Korrektur der Farbinterferenz aufgrund der Absorption und der Bindung der Prüfchemikalie durch lebende Gewebe erfolgt. Um eine mögliche doppelte Korrektur von Farbinterferenzen zu vermeiden, muss eine dritte Kontrolle mit nicht spezifischen Farben mit abgetöteten Geweben ($NSC_{abgetötet}$) untersucht werden (siehe Anhänge III und IV) (34) (35). Bei dieser zusätzlichen Kontrolle wird die Prüfchemikalie auf mindestens zwei abgetötete Gewebereplikate aufgetragen, die dem vollständigen Prüfverfahren zu unterziehen sind, wobei die Gewebe jedoch während der MTT-Inkubation nicht mit der MTT-Lösung, sondern mit einem Medium inkubiert werden. Unabhängig von der Anzahl der durchgeführten unabhängigen Prüfungen/Prüfläufe ist pro Prüfchemikalie eine einzige $NSC_{abgetötet}$-Kontrolle hinreichend. Diese Kontrolle sollte jedoch gleichzeitig mit der NSMTT-Kontrolle sowie mit derselben Gewebecharge untersucht werden. Die tatsächliche Viabilität des Gewebes wird dann als Prozentanteil der ermittelten Viabilität bei lebendem Gewebe nach der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie (% $Viabilität_{Prüfung}$) abzüglich % NSMTT und abzüglich % NSC_{lebend} zuzüglich des Prozentanteils der nicht spezifischen Farbe berechnet, die nach Exposition der abgetöteten Gewebe gegenüber der interferierenden Prüfchemikalie und nach Inkubation mit einem Medium ohne MTT entstanden ist; dieser Prozentanteil wird bezogen auf die gleichzeitig mit der zu korrigierenden Prüfung untersuchte Negativkontrolle (% $NSC_{abgetötet}$), d. h. tatsächliche Gewebeviabilität = [% $Viabilität_{Prüfung}$] - [% NSMTT] - [% NSC_{lebend}] + [% $NSC_{abgetötet}$], ermittelt.

40. Wichtig ist, dass eine nicht spezifische MTT-Reduktion und nicht spezifische Farbinterferenzen die optische Dichte (bei Standard-Absorptionsmessungen) und die Peak-Flächen für MTT-Formazan (bei HPLC/UPLC-Spektrophotometriemessungen) der Gewebeextrate über die Linearitätsspanne des Spektrophotometers hinaus verstärken bzw. vergrößern können. Daher muss jedes Labor vor der Untersuchung von Prüfchemikalien für rechtliche Zwecke die Linearitätsspanne der OD/Peak-Fläche seines Spektrophotometers mit im Handel (z. B. bei Sigma-Aldrich (Bestellnr. M2003) erhältlichem MTT-Formazan (CAS-Nr. 57360-69-7) ermitteln.

41. Die Standardabsorptions-(OD-)Messung mit einem Spektrophotometer ist zur Beurteilung von Prüfchemikalien geeignet, die als direkte MTT-Reduktionsmittel wirken bzw. Farbinterferenzen verursachen, sofern die bei der MTT-Formazan-Messung beobachtete Interferenz nicht zu stark ausgeprägt ist (d. h. wenn die OD-Werte der Gewebeextrakte mit der Prüfchemikalie ohne Korrektur für eine direkte MTT-Reduktion und/oder Farbinterferenzen innerhalb der Linearitätsspanne des Spektrophotometers liegen). Ergebnisse bei Prüfchemikalien mit % NSMTT und/oder % NSC_{lebend} ≥ 60 % (VRM 1 sowie VRM 2 beim Protokoll für Flüssigkeiten) bzw. 50 % (VRM 2 beim Protokoll für Feststoffe) der Negativkontrolle sind jedoch mit Sorgfalt zu bewerten, da dies die festgelegten und in den VRM verwendeten Schwellenwerte sind, nach denen darüber entschieden wird, ob bei Chemikalien eine Einstufung erforderlich ist (Nummer 44). Die Standardabsorption (OD) kann bei übermäßiger Interferenz mit der MTT-Formazan-Messung (d. h. wenn die Interferenz dazu führt, dass nicht korrigierte OD-Werte der Prüfgewebeextrakte außerhalb der Linearitätsspanne des Spektrophotometers liegen) jedoch nicht gemessen werden. Prüffarbstoffe, die sich bei Kontakt mit Wasser oder Isopropanol färben und die Standardabsorptions-(OD-)Messung von MTT-Formazan übermäßig beeinträchtigen, können durch HPLC/UPLC-Spektrophotometrie gemessen werden (siehe Anhänge III und IV). Eine Messung durch HPLC/UPLC-Spektrophotometrie ist deshalb möglich, weil bei der HPLC/UPLC-Spektrophotometrie das MTT-Formazan vor der Quantifizierung von der Prüfchemikalie getrennt werden kann (36). Daher werden unabhängig von der zu prüfenden Chemikalie keine NSC_{lebend}- oder $NSC_{abgetötet}$-Kontrollen benötigt, wenn eine HPLC/UPLC-Spektrophotometrie vorgenommen wird. Allerdings sollten NSMTT-Kontrollen verwendet werden, wenn vermutet wird, dass eine Prüfchemikalie MTT direkt reduziert (Verfahren wie in Nummer 38 beschrieben). NSMTT-Kontrollen sollten jedoch auch bei Prüfchemikalien mit Färbungen (an sich oder in Wasser auftretend) verwendet werden, wenn vermutet wird, dass eine Prüfchemikalie MTT direkt reduziert oder wenn die Farbe einer Prüfchemikalie die Beurteilung ihrer Fähigkeit zur direkten MTT-Reduktion beeinträchtigt (Nummer 38). Wenn MTT-Formazan durch HPLC/UPLC-Spektrophotometrie gemessen wird, ist der Prozentanteil der Viabilität des Gewebes als Prozentanteil der MTT-Formazan-Peak-Fläche, die mit lebenden Geweben nach Exposition gegenüber der Prüfchemikalie ermittelt wurde, bezogen auf die MTT-Formazan-Peak-Fläche der gleichzeitigen Negativkontrolle zu berechnen. Bei Prüfchemikalien, die MTT direkt reduzieren können, wird die tatsächliche Gewebeviabilität wie folgt berechnet: % $Viabilität_{Prüfung}$abzüglich % NSMTT, wie in Nummer 38 im letzten Satz beschrieben. Und schließlich ist festzustellen, dass direkte MTT-Reduktionsmittel sowie auch Farbinterferenzen verursachende direkte MTT-Reduktionsmittel, die nach der Behandlung in den Geweben gebunden sein und MTT so stark reduzieren können, dass es (bei Standard-OD-Messungen) zu OD-Werten oder (bei der Untersuchung der Gewebeextrakte durch UPLC-/HPLC-Spektrophotometrie) zu Peak-Flächen außerhalb der Linearitätsspanne des Spektrophotometers und zu Farbinterferenzen kommen kann, mit Prüfmethoden unter Verwendung von RhCE nicht bewertet werden können. Solche Fälle sind allerdings sehr selten.

42. MTT-Formazan-Messungen können bei allen Arten von Prüfchemikalien (gefärbt, nicht gefärbt, MTT-Reduktionsmittel und Mittel, die keine MTT-Reduktion bewirken) durch HPLC/UPLC-Spektrophotometrie vorgenommen werden (11) (36). Aufgrund der Vielfalt der HPLC/UPLC-Spektrophotometriesysteme können nicht für alle Systeme exakt identische Bedingungen festgelegt werden. Daher sollte die Eignung des jeweiligen HPLC/UPLC-Spektrophotometriesystems vor der Verwendung zur Quantifizierung von MTT-Formazan in Gewebextrakten durch Erfüllung der Akzeptanzkriterien für eine Reihe von Standard-Qualifikationsparametern auf der Grundlage der Branchenleitlinien der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) für die Validierung bioanalytischer Methoden nachgewiesen werden (36) (38). Diese Schlüsselparameter sowie die jeweiligen Akzeptanzkriterien sind Anlage 5 zu entnehmen. Wenn die in Anlage 5 beschriebenen Akzeptanzkriterien erfüllt sind, wird das betreffende HPLC/UPLC-Spektrophotometriesystem als geeignet für die Messung von MTT-Formazan unter den in dieser Prüfmethode beschriebenen Versuchsbedingungen betrachtet.

Akzeptanzkriterien

43. Bei allen Prüfläufen mit RhCE-Gewebechargen, die die Anforderungen der Qualitätskontrolle erfüllen, (Nummer 30) müssen alle mit dem Negativkontrollstoff behandelten Gewebe OD-Werte aufweisen, die der Qualität der Gewebe nach der Lieferung sowie nach Durchführung aller Schritte und aller im Protokoll vorgesehenen Prozesse entsprechen und nicht außerhalb der in Tabelle 2 genannten historisch ermittelten Grenzen liegen (Nummer 26). Die mittlere Gewebeviabilität von mit dem Positivkontrollstoff (d. h. mit Methylacetat) behandelten Geweben muss bei Anwendung der Protokolle für Flüssigkeiten oder für Feststoffe < 50 % der Negativkontrolle bei der VRM 1 und ≤ 30 % (beim Protokoll für Flüssigkeiten) bzw. ≤ 20 % (beim Protokoll für Feststoffe) der Negativkontrolle bei der VRM 2 sein und damit belegen, dass die Gewebe unter den Bedingungen der Prüfmethode auf eine reizende Prüfchemikalie reagieren können (34) (35). Die Variabilität zwischen Gewebereplikaten bei Prüfchemikalien und Kontrollstoffen muss innerhalb der akzeptierten Grenzen liegen (d. h. die Viabilität von zwei Gewebereplikaten muss unter 20 % liegen, bzw. bei drei Gewebereplikaten darf die Standardabweichung (SD) höchstens 18 % betragen). Wenn die Negativ- oder die Positivkontrolle bei einem Prüflauf Werte außerhalb der akzeptierten Spannen ergibt, ist der Prüflauf als nicht geeignet zu betrachten und sollte wiederholt werden. Liegt die Variabilität zwischen Gewebereplikaten bei einer Prüfchemikalie außerhalb der akzeptierten Spanne, ist die Prüfung als nicht geeignet zu betrachten und die Prüfchemikalie erneut zu prüfen.

Auswertung der Ergebnisse und Prädiktionsmodell

44. Die OD-Werte/Peak-Flächen der Replikatgewebe-Extrakte für die einzelnen Prüfchemikalien werden zur Berechnung der mittleren Gewebeviabilität in Prozent (Mittelwert der Gewebereplikate) bezogen auf die mit 100 % angesetzte Negativkontrolle verwendet. Der prozentuale Grenzwert der Gewebeviabilität bei der Ermittlung von Prüfchemikalien, bei denen eine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung) nicht erforderlich ist, sind Tabelle 4 zu entnehmen. Die Ergebnisse sind wie folgt zu bewerten:

— Bei einer Prüfchemikalie sind eine Einstufung und Kennzeichnung nach dem UN GHS bzw. der CLP-Verordnung nicht erforderlich (Keine Einstufung), wenn die mittlere prozentuale Gewebeviabilität nach der Exposition und nach der Inkubation im Anschluss an die Exposition den in Tabelle 4 genannten Grenzwert der Gewebeviabilität in Prozent überschreitet (>). In diesem Fall sind weitere Untersuchungen mit anderen Prüfmethoden nicht erforderlich.

— Ist die mittlere prozentuale Gewebeviabilität nach der Exposition und nach der Inkubation im Anschluss an die Exposition kleiner oder gleich (≤) dem in Tabelle 4 genannten Grenzwert der Gewebeviabilität in Prozent, kann keine Vorhersage getroffen werden. In diesem Fall sind weitere Untersuchungen mit anderen Prüfmethoden vorzunehmen, weil bei den Prüfmethoden unter Verwendung von RhCE ein bestimmter Anteil falsch positiver Ergebnisse ermittelt wird (Nummern 14 und 15) und nicht zwischen den UN-GHS-/CLP-Kategorien 1 und 2 unterschieden werden kann (Nummer 17).

Tabelle 4

Vorhersagemodelle nach dem UN-GHS und der CLP-Verordnung

VRM	Keine Einstufung	Keine Vorhersage möglich
VRM 1 – EpiOcular™ EIT (beide Protokolle)	Mittlere Gewebeviabilität > 60 %	Mittlere Gewebeviabilität ≤ 60 %
VRM 2 – SkinEthic™ HCE EIT (Protokoll für Flüssigkeiten)	Mittlere Gewebeviabilität > 60 %	Mittlere Gewebeviabilität ≤ 60 %
VRM 2 – SkinEthic™ HCE EIT (Protokoll für Feststoffe)	Mittlere Gewebeviabilität > 50 %	Mittlere Gewebeviabilität ≤ 50 %

45. Kann eine eindeutige Klassifizierung vorgenommen werden, so ist eine einzige, Prüfung mit mindestens zwei Geweben ausreichend. Bei Grenzergebnissen, wie z. B. nicht übereinstimmenden Replikatmessungen und/oder einer mittleren prozentualen Gewebeviabilität von 60 ± 5 % (VRM 1 sowie VRM 2 beim Protokoll für Flüssigkeiten) bzw. 50 ± 5 % (VRM 2 beim Protokoll für Feststoffe), sollte eine zweite bzw. bei abweichenden Ergebnissen der ersten beiden Prüfungen eine dritte Prüfung in Betracht gezogen werden.

46. Wenn angemessen und begründet, können bei bestimmten Arten von Gemischen für Prüfchemikalien, bei denen eine Einstufung vorgenommen wurde, und für Prüfchemikalien, bei denen eine Einstufung nicht erforderlich ist, unterschiedliche prozentuale Grenzwerte für die Gewebeviabilität angenommen werden, um die Leistungsfähigkeit der Prüfmethode für die betreffende Art von Gemischen insgesamt zu erhöhen (Nummer 14). Referenzchemikalien können die Beurteilung des augenreizenden bzw. schwer augenschädigenden Potenzials unbekannter Prüfchemikalien oder Produktklassen und die Bewertung des relativen augentoxischen Potenzials einer klassifizierten Chemikalie innerhalb einer bestimmten Spanne positiver Reaktionen erleichtern.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

47. Die Daten einzelner Replikatgewebe eines Prüflaufs (z. B. OD-Werte/MTT-Formazan-Peak-Flächen und berechnete prozentuale Daten der Gewebeviabilität für die Prüfchemikalie und für Kontrollen sowie die endgültige Vorhersage mit der RhCE-Prüfmethode) sind für jede Prüfchemikalie (ggf. einschließlich der Daten von Wiederholungsprüfungen) tabellarisch darzustellen. Außerdem sind für jede einzelne Prüfchemikalie und für alle Kontrollen die mittlere prozentuale Gewebeviabilität und der Unterschied der Viabilität zwischen zwei Gewebereplikaten (bei n = 2 Replikatgewebe) bzw. die Standardabweichung (SD) (bei n ≥ 3 Replikatgeweben) anzugeben. Wenn bei einer Prüfchemikalie bei der Messung von MTT-Formazan anhand der direkten MTT-Reduktion eine Interferenz festgestellt wird und/oder eine farbliche Interferenz auftritt, ist dies für jede einzelne geprüfte Chemikalie anzugeben.

Prüfbericht

48. Der Prüfbericht enthält die folgenden Angaben:

Prüfstoff

Einkomponentiger Stoff:

— Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung(en), CAS-Registriernummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;

— Aggregatzustand, Flüchtigkeit, pH-Wert, log P, Molekulargewicht, Chemikalienklasse und weitere für die Untersuchung relevante physikalische und chemische Eigenschaften, soweit verfügbar;

— Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;

— Behandlung vor der Untersuchung, sofern relevant (z. B. Erwärmen, Mahlen);

— Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;

mehrkomponentige Stoffe, UVCB-Stoffe und Gemische:

— Charakterisierung, so weit wie möglich, z. B. durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), Reinheit, das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften (siehe oben) der einzelnen Elemente, soweit verfügbar;

— Aggregatzustand sowie weitere für die Untersuchung relevante physikalische und chemische Eigenschaften, soweit verfügbar;

— Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;

— Behandlung vor der Untersuchung, sofern relevant (z. B. Erwärmen, Mahlen);

— Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar.

Positiv- und Negativkontrollstoffe

— Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung(en), CAS-Registriernummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;

— Aggregatzustand, Flüchtigkeit, Molekulargewicht, Chemikalienklasse und weitere für die Untersuchung relevante physikalische und chemische Eigenschaften, soweit verfügbar;

— Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;

— Behandlung vor der Prüfung, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);

— Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;

— ggf. Begründung für die Verwendung einer anderen Negativkontrolle als ultrareines H_2O oder Ca^{2+}/Mg^{2+}-freier DPBS;

— ggf. Begründung der Verwendung einer anderen Positivkontrolle als reines Methylacetat;

— Verweis auf historische Ergebnisse von Positiv- und Negativkontrollen, die geeignete Akzeptanzkriterien für einen Prüfdurchlauf dokumentieren.

Informationen zu Auftraggeber und Prüfanstalt

— Name und Anschrift des Auftraggebers, der Prüfanstalt und des Studienleiters.

— *RhCE-Gewebemodell und verwendetes Protokoll (ggf. mit Begründung für die getroffene Auswahl)*

Bedingungen der Prüfmethode

— Verwendetes RhCE-Gewebemodell einschließlich Chargennummer;

— Wellenlänge und Bandbreite (wenn relevant) für die Quantifizierung von MTT-Formazan und die Linearitätsspanne des Messgeräts (z. B. eines Spektrophotometers);

— Beschreibung der verwendeten Methode zur Quantifizierung von MTT-Formazan;

— Beschreibung des HPLC/UPLC-Spektrophotometriesystems (wenn relevant);

— umfassende Begleitdokumentation für das betreffende RhCE-Gewebemodell, einschließlich seiner Leistung. Diese sollte unter anderem die folgenden Elemente und Angaben beinhalten:

i) Qualitätskontrolle der Viabilität (Hersteller)

ii) Viabilität unter den Bedingungen der Prüfmethode (Anwender);

iii) Qualitätskontrolle der Barrierefunktion;

iv) ggf. Morphologie;

v) Reproduzierbarkeit und Vorhersagefähigkeit;

vi) ggf. sonstige Qualitätskontrollen des RhCE-Gewebemodells;

— Verweis auf historische Daten zum RhCE-Gewebemodell. Unter anderem sollte die Akzeptierbarkeit der QK-Daten auf der Grundlage historischer Chargendaten spezifiziert werden;

— Erklärung, dass die Prüfeinrichtung ihre Befähigung zur Durchführung der Prüfmethode vor der regelmäßigen Untersuchung der Leistungschemikalien nachgewiesen hat.

Akzeptanzkriterien für Prüfläufe und Prüfungen

— Mittelwerte und Akzeptanzspannen der Positiv- und der Negativkontrollen auf der Grundlage historischer Daten;

— akzeptable Variabilität zwischen Gewebereplikaten für Positiv- und Negativkontrollen;

— akzeptable Variabilität zwischen Gewebereplikaten für die Prüfchemikalie.

Prüfverfahren

— Einzelheiten der angewandten Methode;

— Dosierungen der verwendeten Prüfchemikalien und Kontrollstoffe;

— Expositionszeitraum und -temperatur, Dauer der Immersion nach der Exposition und Inkubationszeit nach der Exposition (wenn relevant);

— Beschreibung etwaiger Änderungen am Prüfverfahren;

— Angabe verwendeter Kontrollen für direkte MTT-Reduktionsmittel und/oder Prüffarbstoffe (wenn relevant);

— Anzahl der pro Prüfchemikalie und pro Kontrolle (PK, Negativkontrolle und NSMTT, NSC_{lebend} und $NSC_{abgetötet}$, wenn relevant) verwendeten Gewebereplikate.

Ergebnisse

— Tabellarische Darstellung der Daten für die einzelnen Prüfchemikalien und Kontrollstoffe für die einzelnen Prüfläufe (ggf. einschließlich Wiederholungsprüfungen) und Replikatmessungen einschließlich der OD-Werte bzw. der MTT-Formazan-Peak-Flächen, der prozentualen Gewebeviabilität, der mittleren prozentualen Gewebeviabilität, Unterschieden zwischen Gewebereplikaten bzw. der Standardabweichung und der endgültigen Vorhersagen;

— gegebenenfalls Ergebnisse verwendeter Kontrollen für direkte MTT-Reduktionsmittel und/oder Prüffarbstoffe einschließlich OD-Werten oder MTT-Formazan-Peak-Flächen, % NSMTT, % NSC_{lebend}, % $NSC_{abgetötet}$, Unterschieden zwischen Gewebereplikaten bzw. der Standardabweichung, der endgültigen korrekten prozentualen Gewebeviabilität und der endgültigen Vorhersagen;

— mit der Prüfchemikalie (den Prüfchemikalien) und den Kontrollstoffen ermittelte Ergebnisse bezogen auf die definierten Akzeptanzkriterien für Prüfläufe und Prüfungen;

— Beschreibung weiterer festgestellter Wirkungen (z. B. Verfärbung der Gewebe durch Prüffarbstoffe).

Erörterung der Ergebnisse.

Schlussfolgerung.

LITERATUR

(1) UN (2015). GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung) der Vereinten Nationen, ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sechste überarbeitete Auflage, New York und Genf: Vereinte Nationen. Abrufbar unter:http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Kapitel B.5 dieses Anhangs, Akute Augenreizung/-verätzung.

(3) Kapitel B.47 dieses Anhangs, Trübungs- und Durchlässigkeitstest an der Rinderhornhaut zwecks Identifizierung von i) Chemikalien, die schwere Augenschäden verursachen, und ii) Chemikalien, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordern.

(4) Kapitel B.48 dieses Anhangs, Test am isolierten Hühnerauge zur Identifizierung von i) Chemikalien, die schwere Augenschäden verursachen, und ii) Chemikalien, die keine Einstufung erfordern.

(5) Kapitel B.61 dieses Anhangs Fluorescein-Leckage-Prüfmethode zur Identifizierung von Stoffen mit augenverätzender und stark augenreizender Wirkung

(6) Kapitel B.68 dieses Anhangs, *In-vitro*-Prüfmethode mit Kurzzeitexposition zur Ermittlung von i) Chemikalien, die schwere Augenschäden verursachen, und ii) Chemikalien, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordern.

(7) Freeman, S.J., Alépée, N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2 010,261-266.

(8) EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM – Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28 125 EN; doi:10.2787/41680. Abrufbar unter: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, 17. November 2014; EUR 28 173 EN; doi: 10.2787/043697. Abrufbar unter:http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702.

(10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.

(11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.

(12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02, 24. Juni 2016; EUR 28 175 EN; doi: 10.2787/390390. Abrufbar unter: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. (Manuskript in Vorbereitung).

(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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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. In: Salem, H., Katz, S.A. (Hrsg.), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, S. 147-159.

(21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619-626.

(22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1 476-1 488.

(23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.

(24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

(25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.

(26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.

(27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli, F.N., und Maibach, H.I. (Hrsg.), 4. Auflage, S. 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. Auflage, S. 665–697. Withby, O.N., Kanada: 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. Toxicol.* 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 (5. März 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Abrufbar unter:[https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

(35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (20. Juli 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Abrufbar unter: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. Mai 2001. Abrufbar unter: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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Augenreizung: Erzeugen von Veränderungen am Auge nach Applikation einer Prüfchemikalie auf die Oberfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation vollständig reversibel sind. Synonym zu den Einstufungen „reversible Wirkungen am Auge" und „UN-GHS-/CLP-Kategorie 2".

Bottom-up-Ansatz: Schrittweiser Ansatz für eine Prüfchemikalie, von der vermutet wird, dass sie keine Einstufung und Kennzeichnung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordert. Dabei werden zunächst Chemikalien, die keine Einstufung und Kennzeichnung erfordern (negatives Ergebnis), von anderen Chemikalien (positives Ergebnis) unterschieden.

Chemikalie: Ein Stoff oder Gemisch.

Dev: Abweichung

Einkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens 80 % w/w vorliegt.

EIT: Eye Irritation Test (Prüfung auf Augenreizung).

Ersatzprüfung: Eine Prüfung, die eine routinemäßig angewandte Prüfung zur Identifikation von Gefahren und/oder zur Risikobewertung ersetzen soll, und die im Vergleich zur akzeptierten Prüfung nachweislich in allen möglichen Prüfsituationen und mit allen Stoffen einen gleichwertigen oder besseren Schutz der Gesundheit von Mensch oder Tier bzw. der Umwelt gewährleistet (18).

ET_{50}: Expositionszeit, die erforderlich ist, um die Gewebeviabilität bei Anwendung einer Referenzchemikalie in einer vorgegebenen festen Konzentration um 50 % zu reduzieren.

EURL ECVAM: Referenzlabor der Europäischen Union für alternative Methoden zu Tierversuchen.

Evidenzbasierte Bewertung: Prüfung der Stärken und Schwächen verschiedener Informationen, um über das Gefahrenpotenzial einer Prüfchemikalie entscheiden zu können und diese Entscheidung zu untermauern.

Falsch-Negativ-Rate: Der Anteil aller Positivstoffe, die mit einer Prüfmethode fälschlicherweise als Negativstoffe identifiziert werden. Die Falsch-Negativ-Rate ist ein Indikator für die Leistungsfähigkeit einer Prüfmethode.

Falsch-Positiv-Rate: Der Anteil aller Negativstoffe, die mit einer Prüfmethode fälschlicherweise als Positivstoffe identifiziert werden. Die Falsch-Positiv-Rate ist ein Indikator für die Leistungsfähigkeit einer Prüfmethode.

Gefahr: Inhärente Eigenschaft eines Stoffes oder eines Umfelds mit dem Potenzial, einen Organismus, ein System oder eine (Sub)population bei Exposition gegenüber diesem Stoff zu schädigen.

Gemisch: Ein Gemisch oder eine Lösung, die aus zwei oder mehr Stoffen besteht.

Genauigkeit: Der Grad an Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung" verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (18).

Gestufte Prüfstrategie: Eine schrittweise Prüfstrategie, bei der alle vorhandenen Informationen über eine Prüfchemikalie in einer vorgegebenen Reihenfolge überprüft werden, wobei auf jeder Stufe nach dem evidenzbasierten Bewertungsansatz (weight-of-evidence) vorgegangen wird, um feststellen zu können, ob genügend Informationen für eine Gefahreneinstufung vorliegen, bevor zur nächsten Stufe der Strategie übergegangen wird. Wenn das Gefahrenpotenzial/die gefahrenrelevante Wirksamkeit einer Prüfchemikalie auf Basis der vorliegenden Informationen ermittelt werden kann, sind keine weiteren Untersuchungen erforderlich (18).

Gewebeviabilität: Parameter zur Messung der Gesamtaktivität einer Zellenpopulation (bei einem rekonstruierten Gewebe die Fähigkeit, den Vitalfarbstoff zu reduzieren), der je nach gemessenem Endpunkt und verwendetem Testaufbau mit der Gesamtzahl und/oder Vitalität lebender Zellen korreliert.

Gültige Prüfmethode: Eine Prüfmethode, die eine ausreichende Relevanz und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck aufweist und auf wissenschaftlich fundierten Grundsätzen beruht. Eine Prüfmethode ist nie im absoluten Sinn, sondern nur in Bezug auf einen definierten Zweck gültig (18).

HCE: Menschliches Hornhautepithel SkinEthic™.

Hornhaut: Der Iris und Pupille überdeckende transparente vordere Teil des Augapfels, über den Licht ins Augeninnere übertragen wird.

HPLC: Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie.

IC_{50}: Konzentration, bei der eine Referenzchemikalie die Viabilität der Gewebe nach einer vorgegebenen Expositionsdauer um 50 % verringert (z. B. nach einer 30-minütigen Behandlung mit SDS).

Irreversible Wirkungen am Auge: Siehe „Schwere Augenschädigung".

Keine Einstufung: Chemikalien, die nicht als augenreizend (UN-GHS-/CLP-Kategorie 2, UN-GHS-/Kategorien 2A oder 2B) oder schwer augenschädigend (UN-GHS-/CLP-Kategorie 1) eingestuft werden. Synonym zu „UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung".

Leistungsstandards: Auf einer validierten und als wissenschaftlich fundiert betrachteten Prüfmethode beruhende Normen, auf deren Grundlage die Vergleichbarkeit einer vorgeschlagenen, mechanistisch und funktionell ähnlichen Prüfmethode bewertet werden kann. Sie umfassen (i) wesentliche Elemente der Prüfmethode; (ii) ein Mindestverzeichnis von Referenzchemikalien, ausgewählt aus den Chemikalien, die zum Nachweis der akzeptablen Leistung der validierten Referenzmethode verwendet werden; und (iii) je nach den für die validierte Referenzmethode erzielten Ergebnissen die vergleichbaren Genauigkeits- und Zuverlässigkeitswerte, die die vorgeschlagene Prüfmethode bei der Bewertung anhand des Mindestverzeichnisses von Referenzchemikalien erreichen sollte (18).

LLOQ: Untere Quantifizierungsgrenze.

log P: Logarithmus des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten.

Mehrkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens ≥ 10 % w/w und < 80 % w/w vorhanden ist. Ein mehrkomponentiger Stoff ist das Ergebnis eines Herstellungsprozesses. Der Unterschied zwischen einem Gemisch und einem mehrkomponentigen Stoff besteht darin, dass ein Gemisch durch die Mischung von zwei oder mehr Stoffen ohne chemische Reaktion entsteht. Ein mehrkomponentiger Stoff wird durch eine chemische Reaktion gebildet.

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; Thiazolyl-Blau-Tetrazoliumbromid.

Negativkontrolle: Eine Probe, die alle Elemente eines Prüfsystems enthält und mit einem Stoff behandelt wird, der bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Diese Probe wird mit Proben, die mit einer Prüfchemikalie behandelt wurden, und mit anderen Kontrollproben mitgeführt, um eine Gewebeviabilität von 100 % zu ermitteln.

$NSC_{abgetötet}$: Nicht spezifische Farbe bei abgetöteten Geweben.

NSC_{lebend}: Nicht spezifische Farbe bei lebenden Geweben.

NSMTT: Nicht spezifische MTT-Reduktion.

OD: Optische Dichte.

Positivkontrolle: Eine Probe, die alle Elemente eines Prüfsystems enthält und mit einem Stoff behandelt wird, der im Prüfsystem bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Diese Probe wird mit Proben, die mit einer Prüfchemikalie behandelt wurden, und mit anderen Kontrollproben mitgeführt. Um sicherzustellen, dass Abweichungen der Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

Prüflauf: Ein Prüflauf besteht aus einer oder mehreren Prüfchemikalien, die gleichzeitig mit einer Negativ- und einer Positivkontrolle geprüft werden.

Prüfung: Eine einzelne Prüfchemikalie, die gleichzeitig an mindestens zwei Gewebereplikaten im Sinne der jeweiligen Standardarbeitsanweisungen geprüft wird.

Referenzchemikalie: Eine zum Vergleich mit einer Prüfchemikalie verwendete Chemikalie. Eine Referenzchemikalie sollte die folgenden Eigenschaften aufweisen: (i) einheitliche und zuverlässige Herkunft; (ii) strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit der Klasse der zu prüfenden Stoffe; (iii) bekannte physikalisch-chemische Eigenschaften; (iv) unterstützende Daten zu bekannten Wirkungen und (v) bekannte Wirksamkeit im Bereich der erwünschten Reaktion.

Relevanz: Dieser Begriff bezieht sich auf das Verhältnis zwischen der Prüfmethode und der betreffenden Wirkung und auf die Frage, ob dieses Verhältnis aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Er beschreibt das Ausmaß, in dem mit einer Prüfung die untersuchte biologische Wirkung korrekt gemessen oder vorhersagt wird. Die Relevanz schließt eine Beurteilung der Genauigkeit (Übereinstimmung) einer Prüfmethode ein (18).

Reproduzierbarkeit: Die Übereinstimmung von Ergebnissen, die mit wiederholten Prüfungen derselben Prüfchemikalie nach demselben Prüfprotokoll ermittelt wurde (siehe „Zuverlässigkeit“) (18).

Reversible Wirkungen am Auge: Siehe „Augenreizung“.

RhCE: Rekonstruiertes menschliches hornhautartiges Epithel.

Schwere Augenschädigung: Erzeugen von Gewebeschäden im Auge oder eine schwerwiegende Verschlechterung des Sehvermögens nach Applikation eines Prüfstoffs auf die Oberfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation nicht vollständig reversibel sind. Synonym zu den Einstufungen „irreversible Wirkungen am Auge“ und „UN-GHS-/CLP-Kategorie 1“.

SD: Standardabweichung

Sensitivität: Der Anteil aller positiven/wirkenden Prüfchemikalien, die durch die Prüfung korrekt eingestuft werden. Die Sensitivität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (18).

Spezifität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Prüfchemikalien, die durch die Prüfung korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (18).

Standardarbeitsanweisungen: Förmliche, schriftliche Verfahrensbeschreibungen, in denen detailliert erläutert wird, wie bestimmte regelmäßige und prüfungsspezifische Tätigkeiten im Labor durchgeführt werden sollten. Standardarbeitsanweisungen sind nach guter Laborpraxis (GLP) vorgeschrieben.

Stoff: Ein chemisches Element und seine Verbindungen in natürlicher Form oder gewonnen durch ein Herstellungsverfahren, einschließlich der zur Wahrung seiner Stabilität notwendigen Zusatzstoffe und der durch das angewandte Verfahren bedingten Verunreinigungen, aber mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können.

Top-down-Ansatz: Schrittweiser Ansatz bei einer Chemikalie, von der vermutet wird, dass sie schwere Augenschäden verursacht. Dabei werden zunächst Chemikalien, die schwere Augenschäden verursachen (positives Ergebnis), von anderen Chemikalien (negatives Ergebnis) unterschieden.

Übereinstimmung: Siehe „Genauigkeit".

Überschüssige Dosis: Die Menge der auf das RhCE-Gewebemodell aufgetragenen Prüfchemikalie, die über die zur vollständigen und gleichmäßigen Bedeckung der Hautoberfläche erforderliche Menge hinausgeht.

ULOQ: Obere Quantifizierungsgrenze.

UN GHS (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung der Vereinten Nationen): Ein System zur Klassifizierung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) nach standardisierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und ökologischer Gefahren und zur entsprechenden Kennzeichnung durch Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenhinweise, Sicherheitshinweise und Sicherheitsdatenbögen, um zum Schutz des Menschen (einschließlich Arbeitgeber, Arbeiter, Spediteure, Verbraucher und Notfall-Einsatzkräfte) und der Umwelt Informationen über die schädlichen Wirkungen der betreffenden Chemikalien zu verbreiten (1).

UN-GHS/CLP-Kategorie 1: Siehe „Schwere Augenschädigung".

UN-GHS/CLP-Kategorie 2: Siehe „Augenreizung".

UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung: Chemikalien, die die Anforderungen für eine Einstufung in die UN-GHS-/CLP-Kategorien 1 oder 2 (oder die UN-GHS-Kategorien 2A oder 2B) nicht erfüllen. Entspricht der Kategorie „Keine Einstufung".

UPLC: Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie.

UVCB: Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Validierte Prüfmethode: Eine Prüfmethode, für die zwecks Bestimmung ihrer Relevanz (einschließlich Genauigkeit) und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck Validierungsstudien abgeschlossen wurden. Es wird darauf hingewiesen, dass eine validierte Prüfmethode möglicherweise nicht genau und zuverlässig genug ist, um für den vorgeschlagenen Zweck akzeptiert zu werden (18).

VK: Variationskoeffizient.

VRM 1: Der EpiOcular™ EIT wird als validierte Referenzmethode 1 bezeichnet.

VRM 2: Der SkinEthic™ HCE EIT wird als validierte Referenzmethode 2 bezeichnet.

VRM: Validierte Referenzmethode.

Zuverlässigkeit: Maß der Reproduzierbarkeit einer Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien über einen längeren Zeitraum und bei einheitlichem Protokoll. Die Zuverlässigkeit wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit bewertet (18).

Anlage 2

WESENTLICHE ELEMENTE DER PRÜFMETHODE UNTER VERWENDUNG VON REKONSTRUIERTEM MENSCHLICHEM HORNHAUTARTIGEM EPITHEL (RHCE) ZUR ERMITTLUNG VON CHEMIKALIEN, BEI DENEN EINE EINSTUFUNG UND KENNZEICHNUNG ALS AUGENREIZEND ODER SCHWER AUGENSCHÄDIGEND NICHT ERFORDERLICH IST

Elemente des Prüfmodells	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Protokolle	Flüssigkeiten (15 Minuten bei Temperaturen von höchstens 37 ± 1 °C pipettierbar)	Feststoffe (nicht pipettierbar)	Flüssigkeiten und viskose Flüssigkeiten: (pipettierbar)	Feststoffe (nicht pipettierbar)
Modelloberfläche	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Anzahl der Gewebereplikate	Mindestens 2	Mindestens 2	Mindestens 2	Mindestens 2
Vorabprüfung auf Farbinterferenzen	50 µl + 1 ml H_2O 60 min bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit (nicht farbige Prüfchemikalien) bzw. 50 µl + 2 ml Isopropanol 2-3 h bei Raumtemperatur gemischt (Prüffarbstoffe) →Wenn die OD der Prüfchemikalie bei 570 ± 20 nM nach Subtraktion der OD von Isopropanol oder Wasser > 0,08 ist (was etwa 5 % der mittleren OD der Negativkontrolle entspricht), sollten Prüfungen an geeigneten lebenden Kontrollen durchgeführt werden.	50 mg + 1 ml H_2O 60 min bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit (nicht farbige Prüfchemikalien) und/oder 50 mg + 2 ml Isopropanol 2-3 h bei Raumtemperatur gemischt (Prüffarbstoffe und nicht farbige Prüfchemikalien) →Wenn die OD der Prüfchemikalie bei 570 ± 20 nM nach Subtraktion der OD von Isopropanol oder Wasser > 0,08 ist (was etwa 5 % der mittleren OD der Negativkontrolle entspricht), sollten Prüfungen an geeigneten lebenden Kontrollen durchgeführt werden.	10 µl + 90 µl H_2O 30 ± 2 min bei Raumtemperatur (RT) gemischt (RT = 18-28 °C) →Wenn sich die Prüfchemikalie färbt, sollten Prüfungen an geeigneten lebenden Kontrollen durchgeführt werden.	10 mg + 90 µl H_2O 30 ± 2 min gemischt bei Raumtemperatur →Wenn sich die Prüfchemikalie färbt, sollten Prüfungen an geeigneten lebenden Kontrollen durchgeführt werden.

Elemente des Prüfmodells	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Vorabprüfung auf direkte MTT-Reduktion	50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml Lösung, 180 ± 15 min bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relative Luftfeuchtigkeit →wenn sich die Lösung blau/violett färbt, sollten geeignete durch Gefrieren abgetötete Kontrollen geprüft werden 50 µl steriles entionisiertes Wasser in MTT-Lösung).	50 mg + 1 ml MTT 1 mg/ml Lösung, 180 ± 15 min bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relative Luftfeuchtigkeit →Wenn die Lösung sich blau/violett färbt, sollten durch Gefrieren abgetötete Kontrollen untersucht werden (Negativkontrolle = 50 µl steriles entionisiertes Wasser in MTT-Lösung).	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml Lösung, 180 ± 15 min bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit →Wenn die Lösung sich blau/violett färbt, sollten geeignete in Wasser abgetötete Kontrollen untersucht werden (Negativkontrolle = 30 µl steriles entionisiertes Wasser in MTT-Lösung).	30 mg + 300 µl MTT 1 mg/ml Lösung, 180 ± 15 min bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit →Wenn die Lösung sich blau/violett färbt, sollten geeignete in Wasser abgetötete Kontrollen untersucht werden (Negativkontrolle = 30 µl steriles entionisiertes Wasser in MTT-Lösung).
Vorbehandlung	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-freier DPBS 30 ± 2 min bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit, lichtgeschützt.	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+} -freier DPBS 30 ± 2 min bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit, lichtgeschützt.	–	–
Behandlungsdosierungen und Auftragung	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) mit einem geeichten Werkzeug (z. B. einem gestrichenen Löffel, der 50 mg Natriumchlorid fasst).	10 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-freier DPBS Bei viskosen Flüssigkeiten ist ein Nylon-Maschenfilter zu verwenden.	30 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-freier DPBS
Expositionszeitraum und temperatur	30 min (± 2 min) im Kulturmedium bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relative Luftfeuchtigkeit	6 h (± 0,25 h) im Kulturmedium bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relative Luftfeuchtigkeit	30 min (± 2 min) im Kulturmedium bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relative Luftfeuchtigkeit	4 h (± 0,1 h) im Kulturmedium bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relative Luftfeuchtigkeit

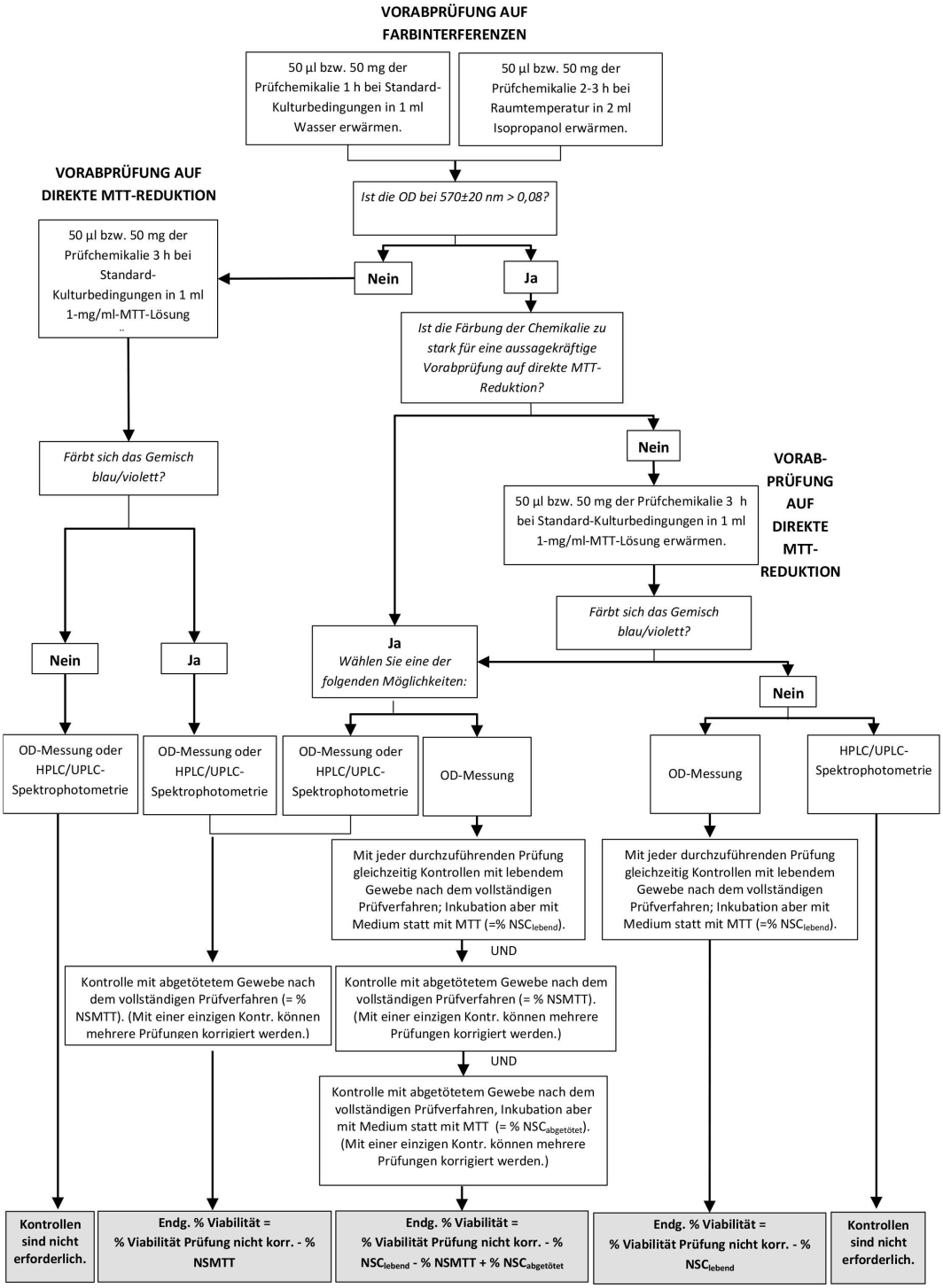
Elemente des Prüfmodells	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Waschen bei Raumtemperatur	Dreimal in 100 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-freiem DPBS	Dreimal in 100 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-freiem DPBS	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-freiem DPBS	25 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-freiem DPBS
Immersion nach der Exposition	12 min (± 2 min) bei Raumtemperatur im Kulturmedium	25 min (± 2 min) bei Raumtemperatur im Kulturmedium	30 min (± 2 min) bei 37 °C, 5 % CO_2, 95 % relative Luftfeuchtigkeit im Kulturmedium	30 min (± 2 min) bei Raumtemperatur im Kulturmedium
Inkubation nach der Exposition	120 min (± 15 min) im Kulturmedium bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit	18 h (± 0,25 h) im Kulturmedium bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit	–	18 h (± 0,5 h) im Kulturmedium bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit
Negativkontrolle	50 µl H_2O Gleichzeitig geprüft	50 µl H_2O Gleichzeitig geprüft	30 ± 2 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-freier DPBS Gleichzeitig geprüft	30 ± 2 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-freier DPBS Gleichzeitig geprüft
Positivkontrolle	50 µl Methylacetat Gleichzeitig geprüft	50 µl Methylacetat Gleichzeitig geprüft	30 ± 2 µl Methylacetat Gleichzeitig geprüft	30 ± 2 µl Methylacetat Gleichzeitig geprüft

Elemente des Prüfmodells	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
MTT-Lösung	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT Inkubationszeit and temperature	180 min (± 15 min) im Kulturmedium bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit	180 min (± 15 min) im Kulturmedium bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit	180 min (± 15 min) im Kulturmedium bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit	180 min (± 15 min) im Kulturmedium bei 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥95 % relative Luftfeuchtigkeit
Extraktionslösung	2 ml Isopropanol (Extraktion oben und unten aus dem Einsatz unter Durchstechen des Gewebes)	2 ml Isopropanol (Extraktion unten aus dem Einsatz unter Durchstechen des Gewebes)	1,5 ml Isopropanol (Extraktion oben und unten aus dem Einsatz)	1,5 ml Isopropanol (Extraktion unten aus dem Einsatz)
Expositionszeitraum and temperature	2-3 h unter Schütteln (~120 rpm) bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4-10 °C	2-3 h unter Schütteln (~120 rpm) bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4-10 °C	4 h unter Schütteln (~120 rpm) bei Raumtemperatur oder über mindestens Nacht ohne Schütteln bei 4-10 °C	Mindestens 2 h unter Schütteln (~120 rpm) bei Raumtemperatur
OD-Anzeige	570 nM (550 - 590 nM) ohne Referenzfilter	570 nM (550-590 nM) ohne Referenzfilter	570 nM (540 - 600 nM) ohne Referenzfilter	570 nM (540 - 600 nM) ohne Referenzfilter
Kontrolle der Gewebequalität	Behandlung mit 100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Behandlung mit 100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	30-minütige Behandlung mit SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	30-minütige Behandlung mit SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

Elemente des Prüfmodells	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Akzeptanzkriterien	1. Die mittlere OD der mit der Negativkontrolle behandelten Gewebereplikate sollte ≥ 0,8 und ≤ 2,5 sein. 2. Die mittlere Viabilität der Gewebereplikate nach 30-minütiger Exposition gegenüber der Positivkontrolle, ausgedrückt in % der Negativkontrolle, sollte < 50 % sein. 3. Die Viabilität zweier Gewebereplikate sollte sich um weniger als 20 % unterscheiden.	1. Die mittlere OD der mit der Negativkontrolle behandelten Gewebereplikate sollte ≥ 0,8 und ≤ 2,5 sein. 2. Die mittlere Viabilität der Gewebereplikate nach 6-stündiger Exposition gegenüber der Positivkontrolle, ausgedrückt in % der Negativkontrolle, sollte < 50 % sein. 3. Die Viabilität zweier Gewebereplikate sollte sich um weniger als 20 % unterscheiden.	1. Die mittlere OD der mit der Negativkontrolle behandelten Gewebereplikate sollte > 1,0 und ≤ 2,5 sein. 2. Die mittlere Viabilität der Gewebereplikate nach 30-minütiger Exposition gegenüber der Positivkontrolle, ausgedrückt in % der Negativkontrolle, sollte < 30 % sein. 3. Die Viabilität zweier Gewebereplikate sollte sich um weniger als 20 % unterscheiden.	1. Die mittlere OD der mit der Negativkontrolle behandelten Gewebereplikate sollte > 1,0 und ≤ 2,5 sein. 2. Die mittlere Viabilität der Gewebereplikate nach 4-stündiger Exposition gegenüber der Positivkontrolle, ausgedrückt in % der Negativkontrolle, sollte ≤ 20 % sein. 3. Die Viabilität zweier Gewebereplikate sollte sich um weniger als 20 % unterscheiden.

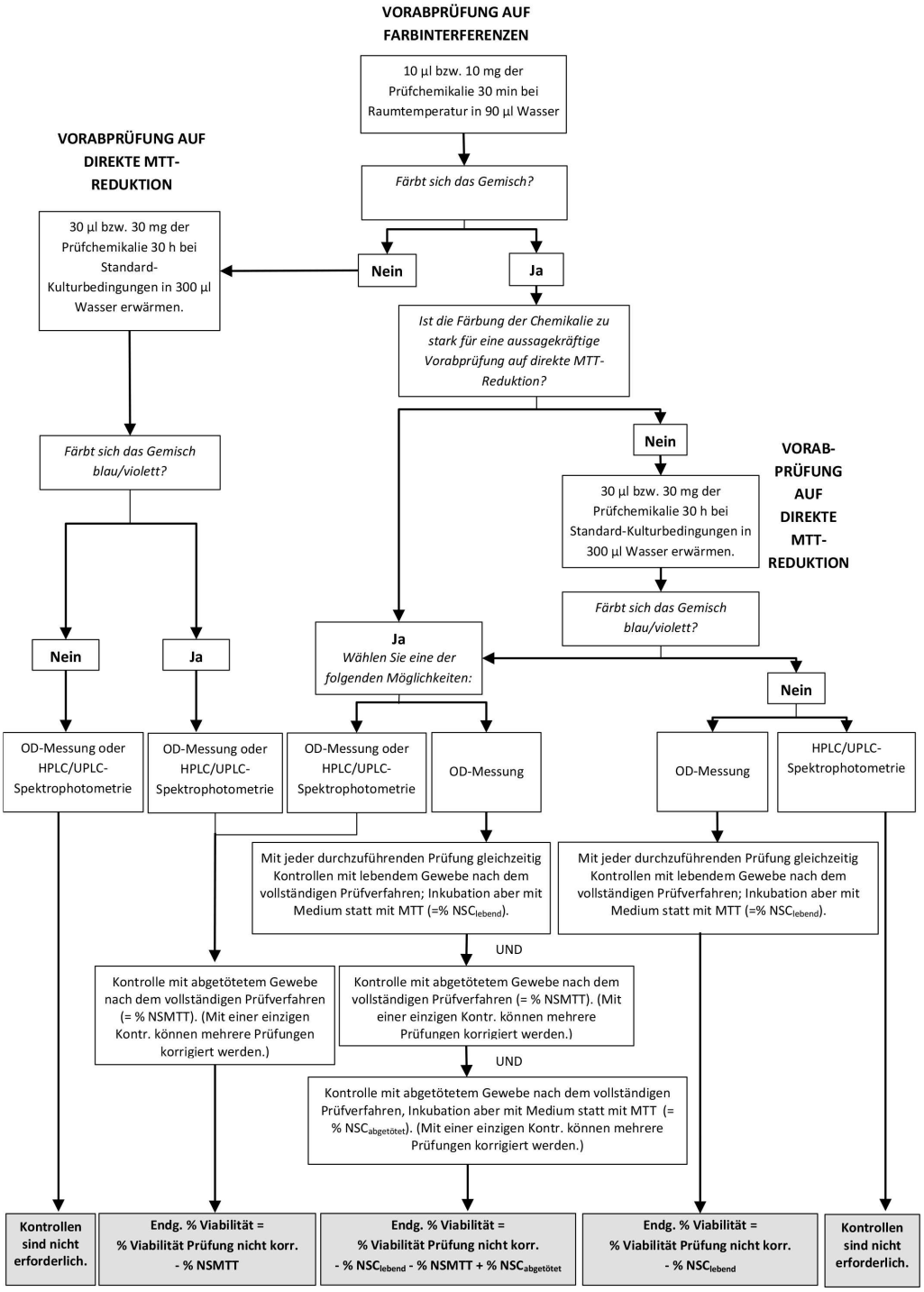
Anlage 3

FLUSSDIAGRAMM ZUR VERANSCHAULICHUNG DER ERMITTLUNG UND BEHANDLUNG VON DIREKTEN MTT-REDUKTIONSMITTELN UND/ODER VON CHEMIKALIEN, DIE FARBINTERFERENZEN VERURSACHEN, NACH DEN STANDARDARBEITSANWEISUNGEN DER VRM 1



Anlage 4

FLUSSDIAGRAMM ZUR VERANSCHAULICHUNG DER ERMITTLUNG UND BEHANDLUNG VON DIREKTEN MTT-REDUKTIONSMITTELN UND/ODER VON CHEMIKALIEN, DIE FARBINTERFERENZEN VERURSACHEN, NACH DEN STANDARDARBEITSANWEISUNGEN DER VRM 2



Anlage 5

SCHLÜSSELPARAMETER UND AKZEPTANZKRITERIEN FÜR DIE QUALIFIZIERUNG EINES HPLC/UPLC-SPEKTROPHOTOMETRIESYSTEMS ZUR MESSUNG VON AUS RhCE-GEWEBEMODELLEN EXTRAHIERTEM MTT-FORMAZAN

Parameter	Protokoll abgeleitet aus FDA-Leitlinie (36) (38)	Akzeptanzkriterien
Selektivität	Analyse von Isopropanol, Blindkontrolle lebend (Isopropanol-Extrakt aus lebenden RhCE-Gewebemodellen ohne Behandlung), Blindkontrolle abgetötet (Isopropanol-Extrakt aus abgetöteten RhCE-Gewebemodellen ohne Behandlung) und einem Farbstoff (z. B. Methylenblau)	$Fläche_{Interferenz}$ ≤ 20 % $Fläche_{LLOQ}$ [1]
Präzision	Qualitätskontrollen (d. h. MTT-Formazan bei 1,6 µg/ml, 16 µg/ml und 160 µg/ml) in Isopropanol (n=5)	VK ≤ 15 % bzw. ≤ 20 % für LLOQ
Genauigkeit	Qualitätskontrollen mit Isopropanol (n=5)	% Abw. ≤ 15 % bzw. ≤ 20 % für LLOQ
Matrixeffekt	Qualitätskontrollen mit Blindkontrolle lebend (n=5)	85 % ≤ Matrixeffekt % ≤ 115 %
Übertragung	Analyse Isopropanol nach einem ULOQ [2] -Standard	$Fläche_{Interferenz}$ ≤ 20 % $Fläche_{LLOQ}$
Reproduzierbarkeit (innerhalb eines Tages)	3 unabhängige Eichkurven (aufgrund von 6 aufeinander folgenden Verdünnungen von MTT-Formazan in Isopropanol im Verhältnis 1:3 beginnend mit der ULOQ, d. h. 200 µg/ml); Qualitätskontrollen mit Isopropanol (n=5)	Eichkurven: % Abw. ≤ 15 % bzw. ≤ 20 % für LLOQ Qualitätskontrollen: % Abw. ≤ 15 % und VK ≤ 15 %
Reproduzierbarkeit (innerhalb eines Tages)	Tag 1: 1 Eichkurve und Qualitätskontrollen in Isopropanol (n=3) Tag 2: 1 Eichkurve und Qualitätskontrollen in Isopropanol (n=3) Tag 3: 1 Eichkurve und Qualitätskontrollen in Isopropanol (n=3)	
Kurzzeitstabilität von MTT-Formazan in RhCE-Gewebeextrakt	Qualitätskontrollen in Blindkontrollen lebend (n=3), die am Tag der Vorbereitung sowie nach 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur analysiert wurden.	% Abw. ≤ 15 %
Langzeitstabilität von MTT-Formazan in RhCE-Gewebeextrakt (erforderlichenfalls)	Qualitätskontrollen in Blindkontrollen lebend (n=3), die am Tag der Vorbereitung sowie nach mehrtägiger Lagerung bei -20 °C analysiert wurden.	% Abw. ≤ 15 %

[1] LLOQ: Untere Quantifizierungsgrenze, definiert als Gewebeviabilität von 1-2 %, d. h. 0,8 µg/ml.
[2] ULOQ: Obere Quantifizierungsgrenze, definiert als mindestens zweimal so hoch wie die erwartete MTT-Formazan-Konzentration in Isopropanol-Extrakten aus Negativkontrollen (~70 µg/ml bei der VRM), d. h. 200 µg/ml.

B.70 ***IN-VITRO*-ASSAYS MIT EINEM HUMANEN REKOMBINANTEN ÖSTROGENREZEPTOR (hrER) ZUR ERMITTLUNG VON CHEMIKALIEN MIT ER-BINDUNGSAFFINITÄT**

ALLGEMEINE EINLEITUNG

Leistungsbezogene OECD-Prüfrichtlinie

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 493 (2015). TG 493 ist eine leistungsbezogene Prüfrichtlinie (PBTG), die die Methode für *In-vitro*-Assays unter Verwendung eines humanen rekombinanten Östrogenrezeptors zur Ermittlung von Stoffen mit Bindungsaffinität für Östrogenrezeptoren (hrER-Bindungsassays) beschreibt. Sie umfasst zwei mechanistisch und funktionell ähnliche Assays zum Nachweis von Östrogenrezeptor-Bindern (d. h. ERα-Bindern) und sollte die Entwicklung neuer ähnlicher oder modifizierter Prüfmethoden nach den Validierungsgrundsätzen im OECD Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment erleichtern (1). Die folgenden vollständig validierten Referenzprüfmethoden (Anlagen 2 und 3) sind Grundlage dieser PBTG:

— der Freyberger-Wilson-(FW-)*In-vitro*-Östrogenrezeptor-(ER-)Bindungsassay mit dem in voller Länge rekombinanten humanen ERα (2) und

— der vom Chemical Evaluation and Research Institute (CERI) beschriebene *In-vitro*-Östrogenrezeptor-Bindungsassay mit einem Ligandenbindungs-Domänen-Protein des humanen rekombinanten ERα (2).

Leistungsstandards (PS) (3) sollen die Entwicklung und die Validierung ähnlicher Prüfmethoden für denselben Gefahren-Endpunkt erleichtern und eine rechtzeitige Änderung der PBTG 493 ermöglichen, damit ähnliche Assays in einer aktualisierten PBTG berücksichtigt werden können. Ähnliche Assays werden jedoch erst dann berücksichtigt, wenn die OECD die Assays geprüft und die Erfüllung der Leistungsstandards bestätigt hat. Die in TG 493 aufgenommenen Assays erfüllen die Anforderungen der OECD-Mitgliedstaaten an Prüfergebnisse bei Östrogenrezeptor-Bindungen alle gleichermaßen und ermöglichen die gegenseitige Anerkennung der Daten gemäß dem OECD-Übereinkommen.

Hintergrund und Grundsätze der in diese Prüfmethode aufgenommenen Assays

2. Die OECD leitete 1998 mit hoher Priorität die Überarbeitung bestehender Prüfrichtlinien für Screening-Prüfungen und Untersuchungen potenziell endokriner Disruptoren und die Entwicklung neuer Prüfrichtlinien ein. Der „OECD Conceptual Framework (CF) for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals" wurde 2012 überarbeitet. Die ursprünglichen und überarbeiteten CFs wurden dem Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (4) als Anhänge beigefügt. Der CF umfasst fünf Ebenen mit jeweils eigener biologischer Komplexität. Die in dieser Prüfmethode beschriebenen ER-Bindungsassays sind Ebene 2 (*In-vitro-Assays zur Ermittlung von Daten über ausgewählte endokrine Mechanismen/Wirkungspfade*) zuzuordnen. Diese Prüfmethode betrifft *In-vitro*-Rezeptor-Bindungsassays zur Ermittlung von Liganden für den humanen Östrogenrezeptor alpha (ERα).

3. Die Relevanz des *In-vitro*-ER-Bindungsassays für biologische Funktionen wurde eindeutig nachgewiesen. ER-Bindungsassays sind zur Ermittlung von Chemikalien vorgesehen, die den Östrogen-Hormonweg unterbrechen können. Sie wurden in den letzten beiden Jahrzehnten in großem Umfang zur Charakterisierung der Verteilung von ER in Geweben und zur Identifizierung von ER-Agonisten/-Antagonisten durchgeführt. Diese Assays spiegeln das Zusammenwirken zwischen Liganden und Rezeptoren als ersten Schritt des Östrogen-Signalwegs wider und sind bei allen Wirbeltieren wesentlich für die Reproduktionsfunktion.

4. Das Zusammenwirken von Östrogenen mit ER kann die Transkription von Genen beeinträchtigen, die durch Östrogene gesteuert werden, und nicht genomische Wirkungen induzieren. Dadurch können Zellprozesse ausgelöst oder gehemmt werden (u. a. für die Zellproliferation, für die normale fetale Entwicklung und für die Reproduktion erforderliche Prozesse) (5) (6) (7). Störungen normaler östrogener Systeme können Beeinträchtigungen der normalen Entwicklung (Ontogenese), der reproduktiven Gesundheit und des Reproduktionssystems auslösen. Eine unangemessene Übertragung von ER-Signalen kann beispielsweise das Risiko einer hormonbedingten Krebserkrankung erhöhen, die Fruchtbarkeit beeinträchtigen und das Wachstum und die Entwicklung von Föten beeinflussen (8).

5. *In-vitro*-Bindungsassays beruhen auf einer unmittelbaren Wechselwirkung eines Stoffs mit einer spezifischen Rezeptorliganden-Bindungsstelle, die die Transkription eines Reporter-Genprodukts steuert. Wesentliches Element des hrERα-Bindungsassays (hrERα = humaner rekombinanter Östrogenrezeptor alpha) ist die Fähigkeit eines radioaktiv markierten Liganden ([^{3}H]-17β-Estradiol), bei zunehmenden Konzentrationen einer Prüfchemikalie (z. B. eines Bindungskonkurrenten) eine Bindung mit dem ER einzugehen. Prüfchemikalien mit einer starken ER-Affinität konkurrieren mit dem radioaktiv markierten Liganden bei einer niedrigeren Konzentration als Chemikalien mit einer geringeren Affinität für diesen Rezeptor. Dieser Assay beinhaltet zwei wesentliche Elemente: einen Versuch zur Ermittlung von Sättigungsbindungen zur Charakterisierung der Parameter der Wechselwirkung zwischen Rezeptoren und Liganden und zur Dokumentation der ER-Spezifität und einen anschließenden Versuch zur Ermittlung konkurrierender Bindungen, mit dem die Konkurrenz zwischen einer Prüfchemikalie und einem radioaktiv markierten Liganden im Hinblick auf die Bindung an den ER beschrieben wird.

6. In Studien zur Validierung der CERI- und der FW-Bindungsassays wurden die Relevanz und die Zuverlässigkeit im Hinblick auf die vorgesehene Verwendung nachgewiesen (2).

7. Die in der vorliegenden Prüfmethode verwendeten Begriffe und Abkürzungen werden in Anlage 1 erläutert.

Anwendungsbereich und Einschränkungen der Rezeptor-Bindungsassays

8. Diese Assays werden für Screening- und Priorisierungszwecke vorgeschlagen, können aber auch Aufschluss über molekulare Auslösungsereignisse (MIE = Molecular Initiation Events) geben. Die betreffenden Informationen können im Rahmen von Beweiskraftermittlungen verwendet werden. Die Assays beruhen auf der chemischen Bindung an die Ligandenbindungs-Domäne des ERα in einem *In-vitro*-System. Daher sollten Ergebnisse nicht unmittelbar für die komplexen Signal- und Steuerungswirkungen des intakten endokrinen *In-vivo*-Systems extrapoliert werden.

9. Die Bindung des natürlichen Liganden 17β-Estradiol ist das erste einer Reihe molekularer Ereignisse, die die Transkription von Zielgenen aktivieren und schließlich zu einer physiologischen Veränderung führen (9). Die Bindung an die Ligandenbindungs-Domäne des ERα ist also als einer der Schlüsselmechanismen einer durch ER vermittelten endokrinen Störung (ED = Endocrine Disruption) zu betrachten; allerdings können ED auch infolge anderer Mechanismen auftreten, darunter (i) Wechselwirkungen mit anderen ER-Bindungsstellenα als die Liganden-Bindungstasche, (ii) Wechselwirkungen mit anderen für die Übertragung von Östrogensignalen relevanten Rezeptoren, ER-β und G-Protein-gekoppelten Östrogenrezeptoren, sonstigen Rezeptoren und Enzymsystem innerhalb des Hormonsystems, (iii) die Hormonsynthese, (iv) die metabolische Aktivierung/Deaktivierung von Hormonen, (v) die Verteilung von Hormonen an Zielgewebe und (vi) die Beseitigung von Hormonen im Körper. Keiner der Assays im Rahmen dieser Prüfmethode hat diese Wirkungsweisen zum Gegenstand.

10. Gegenstand dieser Prüfmethode ist die Fähigkeit von Stoffen, Bindungen mit dem humanen ERα einzugehen. Dabei wird nicht zwischen ERα-Agonisten und ERα-Antagonisten unterschieden. Nachgelagerte Ereignisse wie Gentranskriptionen oder physiologische Veränderungen werden bei diesen Assays nicht berücksichtigt. Da bei der Validierung nur einzelne einkomponentige Stoffe verwendet wurden, wurde die Eignung für Prüfgemische nicht untersucht. Dennoch sind die Assays theoretisch auch für die Prüfung von mehrkomponentigen Stoffen und Gemischen geeignet. Bevor die Prüfmethode für die Generierung von Daten für einen bestimmten rechtlichen Zweck verwendet wird, ist zu prüfen, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefern kann und, wenn dem so ist, warum. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs von Rechts wegen vorgeschrieben ist.

11. Die zellfreien Rezeptorsysteme können an sich keine Stoffwechselaktivität entwickeln und wurden in Verbindung mit metabolischen Enzymsystemen nicht validiert. Eine Stoffwechselaktivität könnte bei der Auslegung einer Studie berücksichtigt werden. Dazu wären jedoch weitere Validierungsarbeiten erforderlich.

12. Chemikalien, die in der Lage sind, das Protein (d. h. das Rezeptor-Protein) zu denaturieren (beispielsweise ein Tensid oder Chemikalien, die den pH-Wert des Assay-Puffers verändern können), können nicht bzw. nur in Konzentrationen geprüft werden, bei denen diese Wechselwirkungen nicht auftreten. Ansonsten beschränkt sich der Konzentrationsbereich, der mit diesen Assays geprüft werden kann, auf die Löslichkeit der betreffenden Prüfchemikalie im Assay-Puffer.

13. Tabelle 1 enthält eine Übersicht über die Ergebnisse der 24 Stoffe, die mit den beiden in dieser Prüfmethode beschriebenen vollständig validierten Assays untersucht wurden. Von diesen Stoffen wurden nach veröffentlichten Berichten (u. a. aufgrund von *In-vitro*-Assays zur Prüfung auf transkriptionelle ER-Aktivierung und/oder aufgrund des Uterotrophen Bioassays) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) 17 Stoffe als ER-Binder eingestuft; 6 Stoffe wurden als Nicht-Binder eingestuft. Nach den in Tabelle 1 zusammengefassten Daten ergab sich hinsichtlich der Einstufungen aller Stoffe bis zu 10^{-4} M beim Antagonisten-Assay eine nahezu 100 %ige Übereinstimmung zwischen den beiden Assays, und alle Stoffe wurden zutreffend als ER-Binder bzw. als Nicht-Binder eingestuft. Ergänzende Informationen über diese Gruppe von Stoffen sowie über weitere Stoffe, die im Rahmen der Validierungsstudien mit den ER-Bindungsassays untersucht wurden, sind den Leistungsstandards für den hrER-Bindungsassay (3), Anlage 2 (Tabellen 1, 2 und 3), zu entnehmen.

Tabelle 1

Einstufung von Stoffen als ER-Binder oder -Nicht-Binder nach der erwarteten Reaktion bei Prüfung mit dem FW- und dem CERI-hrER-Bindungsassay

	Bezeichnung des Stoffs	CAS-Nr.	Erwartete Reaktion	FW-Assay		CERI-Assay		MeSH-Chemikalie Klasse	Produktklasse
				Konzentrations- bereich (M)	Einstufung	Konzentrations- bereich (M)	Einstufung		
1	17β-Estradiol	50-28-2	*Binder*	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Binder	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Binder	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmediznisches Agens
2	Norethynodrel	68-23-5	*Binder*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Binder	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Binder	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmediznisches Agens
3	Norethindron	68-22-4	*Binder*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Binder	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Binder	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmediznisches Agens
4	Di-*n*-butylphthalat	84-74-2	*Nicht-Binder* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Nicht-Binder (**) (†)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Nicht-Binder (**) (†)	Kohlenwasserstoff (cyclisch), Ester	Weichmacher, chemisches Zwischenprodukt
5	DES	56-53-1	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Kohlenwasserstoff (cyclisch), Phenol	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmediznisches Agens
6	17α-Ethinylestradiol	57-63-6	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmediznisches Agens
7	meso-Hexestrol	84-16-2	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Kohlenwasserstoff (cyclisch), Phenol	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmediznisches Agens
8	Genistein	446-72-0	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Kohlenwasserstoff (heterocyclisch), Flavonoid	Naturprodukt
9	Equol	531-95-3	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Phytoestrogen-Metabolit	Naturprodukt
10	Butylparaben (*n*-Butyl-4-hydroxybenzoat)	94-26-8	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Paraben	Konservierungsmittel

	Bezeichnung des Stoffs	CAS-Nr.	Erwartete Reaktion	FW-Assay		CERI-Assay		MeSH-Chemikalie Klasse	Produktklasse
				Konzentrations- bereich (M)	Einstufung	Konzentrations- bereich (M)	Einstufung		
11	Nonylphenol (Gemisch)	84852-15-3	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Alkylphenol	Zwischenproduktverbindung
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	chlororganisches	Insektizid
13	Corticosteron	50-22-6	*Nicht-Binder* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Nicht-Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Nicht-Binder	Steroid	Naturprodukt
14	Zearalenon	17924-92-4	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Kohlenwasserstoff (heterocyclisch), Lacton	Naturprodukt
15	Tamoxifen	10540-29-1	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmediznisches Agens
16	5α-Dihydrotestosteron	521-18-6	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Steroid, nicht phenolisch	Naturprodukt
17	Bisphenol A	80-05-7	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Phenol	Chemisches Zwischenprodukt
18	4-*n*-Heptylphenol	1987-50-4	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Nicht eindeutig [a]	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Alkylphenol	Zwischendrehzahl
19	Kepon (Chlordecon)	143-50-0	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Kohlenwasserstoff (halogeniert)	Pestizid
20	Benz(a)anthracen	56-55-3	*Nicht-Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Nicht-Binder [b]	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Nicht-Binder [b]	Aromatischer Kohlenwasserstoff	Zwischenprodukt
21	Enterolacton	78473-71-9	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Phytoestrogen	Naturprodukt
22	Progesteron	57-83-0	*Nicht-Binder* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Nicht-Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Nicht-Binder	Steroid	Naturprodukt

	Bezeichnung des Stoffs	CAS-Nr.	Erwartete Reaktion	FW-Assay		CERI-Assay		MeSH-Chemikalie Klasse	Produktklasse
				Konzentrations- bereich (M)	Einstufung	Konzentrations- bereich (M)	Einstufung		
23	Octyltriethoxysilan	2943-75-1	*Nicht-Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Nicht-Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Nicht-Binder	Silan	Oberflächen-Modifiziermittel
24	Atrazin	1912-24-9	*Nicht-Binder* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Nicht-Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Nicht-Binder	Heterocyclische Verbindung	Herbizid

(*) Löslichkeitsgrenze < 1×10^{-4} M.

(**) Die Verwendung und die Einstufung von Di-n-butylphthalat (DBP) als Nicht-Binder beruht auf der Prüfung von bis zu 10^{-4} M, da einige Labors bei den Prävalidierungsstudien bei 10^{-3} M keine Löslichkeit von DBP (z. B. eine Trübung) festgestellt hatten.

(†) In der Validierungsstudie wurde Di-*n*-butylphthalat (DBP) als kodierter Prüfstoff bei Konzentrationen von bis zu 10^{-3} M untersucht. Unter diesen Bedingungen stellten einige Labors einen Rückgang der Radioliganden-Bindung bei der höchsten Konzentration (10^{-3} M) und/oder eine nicht eindeutige Kurvenanpassung fest. Bei diesen Prüfläufen wurde DBP in drei von fünf Labors mit dem CERI-Assay und von fünf von sechs Labors mit dem FW-Assay (siehe (2)), Abschnitte IV.B.3a,b und VI.A) als „nicht eindeutig" oder als „Binder" eingestuft.

(a) Die Einstufung deckte sich nicht mit der erwarteten Einstufung. Die Einstufung von 4-*n*-Heptylphenol als „nicht eindeutig" oder als „Nicht-Binder" durch drei von fünf Labors führte zu einer durchschnittlichen Einstufung als nicht eindeutig. Eine nähere Untersuchung ergab, dass dies auf eine begrenzte chemische Löslichkeit zurückzuführen war, die die Ausprägung einer vollständigen Bindungskurve verhinderte.

(b) In der Validierungsstudie wurde Benz(a)anthracen aufgrund der veröffentlichten Literatur, nach der die für diesen Stoff berichtete *In-vitro*-Östrogenaktivität(16) primär von seiner metabolischen Aktivierung abhängt, neu eingestuft (17) (18). Die enzymatische metabolische Aktivierung des Stoffs wurde mit den in dieser vergleichenden Validierungsstudie durchgeführten zellfreien hrER-Bindungsassays nicht vorhergesagt. Unter den Versuchsbedingungen des FW- und des CERI-Assays ist der Stoff also tatsächlich als Nicht-Binder einzustufen.

ELEMENTE DES hrER-BINDUNGSASSAYS

Wesentliche Elemente des Assays

14. Diese Prüfmethode gilt für Assays mit einem ER-Rezeptor und einem ausreichend starken Liganden für diesen Rezeptor, der als Marker/Tracer für den Assay verwendet und durch zunehmende Konzentrationen einer Prüfchemikalie verdrängt werden kann. Die Bindungsassays beinhalten die beiden folgenden wesentlichen Elemente: 1) einen Versuch zur Ermittlung von Sättigungsbindungen und 2) einen Versuch zur Ermittlung konkurrierender Bindungen. Mit dem Assay zur Ermittlung von Sättigungsbindungen werden die Spezifität und die Aktivität der Rezeptor-Zubereitungen bestätigt. Mit der Untersuchung zur Ermittlung konkurrierender Bindungen wird die Fähigkeit einer Prüfchemikalie zur Bindung an den hrER beurteilt.

Kontrollen

15. Die Grundlage der vorgeschlagenen gleichzeitig geprüften Referenzöstrogens und der Kontrollen sollte erläutert werden. Gegebenenfalls dienen gleichzeitige Kontrollen (Lösungsmittel- (Vehikel-), Positiv- (ER-Binder; starke und geringe Affinität) und Negativkontrollen (Nicht-Binder)) als Nachweis dafür, dass der Assay unter den Prüfbedingungen funktioniert; außerdem bilden sie eine Grundlage für versuchsübergreifende Vergleiche. In der Regel sind sie Bestandteil der Akzeptanzkriterien für die Versuche (1). Bei jedem Prüflauf sollten auf jeweils einer Platte vollständige Konzentrationskurven des Referenzöstrogens und der Kontrollen (d. h. schwache Binder und Nicht-Binder) verwendet werden. Alle anderen Platten sollten Folgendes enthalten: 1) eine hohe (etwa vollständige Verdrängung des radioaktiv markierten Liganden) und eine mittlere Konzentration (etwa IC_{50}) sowohl von E2 als auch des schwachen Binders, jeweils dreifach, und 2) eine Lösungsmittelkontrolle und einen nicht spezifischen Binder, ebenfalls jeweils dreifach.

Standard-Qualitätskontrollverfahren

16. Standard-Qualitätskontrollverfahren sollten wie für den jeweiligen Assay beschrieben durchgeführt werden, um gewährleisten zu können, dass aktive Rezeptoren, die korrekten Chemikalienkonzentrationen und auch über mehrere Wiederholungen stabile Toleranzgrenzen verwendet werden und sichergestellt ist, dass die erwarteten ER-Bindungsreaktionen im Zeitverlauf festgestellt werden können.

Nachweis der Eignung des Labors

17. Vor der Prüfung unbekannter Chemikalien mit einem der Assays dieser Prüfmethode sollte jedes Labor nachweisen, dass es in der Lage ist, den betreffenden Assay durchzuführen. Dazu sind Sättigungsprüfungen zur Bestätigung der Spezifität und der Aktivität der ER-Zubereitung sowie Assays zur Ermittlung konkurrierender Bindungen mit dem Referenzöstrogen und den Kontrollen (schwacher Binder und Nicht-Binder) durchzuführen. Das Labor sollte eine historische Datenbank mit Ergebnissen des Referenzöstrogens und der Kontrollen aufgrund von 3-5 unabhängigen Versuchen an unterschiedlichen Tagen erstellen. Die betreffenden Versuche bilden die Grundlage für das Referenzöstrogen und die historischen Kontrollen des Labors und werden zur partiellen Beurteilung der Akzeptierbarkeit des Assays bei künftigen Prüfläufen berücksichtigt.

18. Die Reaktionsfähigkeit des Prüfsystems wird auch durch eine Prüfung der in Tabelle 2 genannten Leistungsstoffe bestätigt. Die Liste der Leistungsstoffe ist eine Untergruppe der Referenzstoffe der Leistungsstandards für die ER-Bindungsassays (3). Diese Stoffe sind im Handel erhältlich und entsprechen den Chemikalienklassen, bei denen gewöhnlich eine ER-Bindungsaktivität zu verzeichnen ist. Außerdem zeigen sie ein geeignetes Wirkungsspektrum (d. h. stark bis schwach) für ER-Binder und für Nicht-Binder (d. h. Negativstoffe). Bei allen Leistungsstoffen sollten die zu geprüften Konzentrationen den gesamten in Tabelle 2 genannten Bereich abdecken. Für jeden Stoff sollten mindestens drei Versuche durchgeführt werden, und die Ergebnisse sollten mit der erwarteten chemischen Aktivität in Einklang stehen. Jeder Versuch sollte unabhängig (d. h. mit frischen Verdünnungen des Rezeptors, der Chemikalien und des Reagens) und mit drei Wiederholungen pro Konzentration durchgeführt werden. Die Leistungsfähigkeit wird durch die ordnungsgemäße Einstufung (positiv/negativ) der einzelnen Leistungsstoffe nachgewiesen. Beim Erlernen der Assays sollte die Eignungsprüfung von jedem einzelnen Labortechniker durchgeführt werden.

Tabelle 2

Liste der Kontroll- und der Leistungsstoffe für die Assays zur Prüfung auf konkurrierende hrER-Bindungen ([1])

Nr.	Bezeichnung des Stoffs	CAS-Nr. ([2])	Erwartete Reaktion ([3]) ([4])	Prüfkonzentrationsbereich (M)	MeSH-Chemikalienklasse ([5])	Produktklasse ([6])
			Kontrollen (Referenzöstrogen, schwacher Binder, Nicht-Binder)			
1	17−Εστραδιολ	50-28-2	Binder	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmediznisches Agens
2	Norethynodrel (oder) Norethindron	68-23-5 (oder) 68-22-4	Binder	3×10^{-9} – 30×10^{-6}	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmediznisches Agens
3	Octyltriethoxysilan	2943-75-1	Nicht-Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Silan	Oberflächen-Modifiziermittel
			Leistungsstoffe ([6])			
4	Diethylstilbestrol	56-53-1	Binder	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Kohlenwasserstoff (cyclisch), Phenol	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmediznisches Agens
5	17α-Ethinylestradiol	57-63-6	Binder	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmediznisches Agens
6	meso-Hexestrol	84-16-2	Binder	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Kohlenwasserstoff (cyclisch), Phenol	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmediznisches Agens
7	Tamoxifen	10540-29-1	Binder	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Kohlenwasser-stoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmediznisches Agens
8	Genistein	446-72-0	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Heterocyclische Verbindung, Flavonoid	Naturprodukt

Nr.	Bezeichnung des Stoffs	CAS-Nr. (2)	Erwartete Reaktion (3) (4)	Prüfkonzentrationsbereich (M)	MeSH-Chemikalienklasse (5)	Produktklasse (6)
9	Bisphenol A	80-05-7	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Phenol	Chemisches Zwischenprodukt
10	Zearalenon	17924-92-4	Binder	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Heterocyclische Verbindung, Lacton	Naturprodukt
11	Butylparaben	94-26-8	Binder	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Carboxylsäure, Phenol	Konservierungsmittel
12	Atrazin	1912-24-9	Nicht-Binder	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Heterocyclische Verbindung	Herbizid
13	Di-n-butylphthalat (DBP) (7)	84-74-2	Nicht-Binder (8)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Kohlenwasserstoff (cyclisch), Ester	Weichmacher, chemisches Zwischenprodukt
14	Corticosteron	50-22-6	Nicht-Binder	1×10^{-11} – 1×10^{-4}	Steroid	Naturprodukt

(1) Wenn ein Leistungsstoff nicht mehr im Handel erhältlich ist, kann ein Stoff derselben ER-Bindungsklassifikation und mit vergleichbarer Wirksamkeit und Klassifizierung verwendet werden.
(2) Abkürzungen: CAS-Nr. = Registernummer des Chemical Abstracts Service.
(3) Einstufung als ERα-Binder bzw. -Nicht-Binder in der Validierungsstudie des CERI- und des FW-hrER-Bindungsassays (2).
(4) Die Einstufung der ER-Bindungsaktivität beruhte auf den ICCVAM Background Review Documents (BRD) zu Assays zur Prüfung der ER-Bindung und zu TA-Assays (9) sowie auf empirischen Daten und anderen Informationen aus veröffentlichten und geprüften Untersuchungen (10) (11) (12) (13) (14) (15).
(5) Die Stoffe wurden nach den Medical Subject Headings (MeSH) der U.S. National Library of Medicine, einem international anerkannten standardisierten Klassifizierungssystem, (siehe http://www.nlm.nih.gov/mesh) einer oder mehreren Chemikalienklassen zugeordnet.
(6) Die Stoffe wurden nach der Gefahrstoff-Datenbank der U.S. National Library of Medicine (siehe http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB) einer oder mehreren Chemikalienklassen zugeordnet.
(7) DBP kann als alternative Nicht-Binder-Kontrolle mit einer Konzentration von maximal 10^{-4} M geprüft werden.
(8) Die Löslichkeitsgrenze liegt bei diesem Stoff bei 10^{-4} M. Die Verwendung und die Einstufung von Di-n-butylphthalat (DBP) als Nicht-Binder beruht auf der Prüfung von bis zu 10^{-4} M, da einige Labors bei den Prävalidierungsstudien bei 10^{-3} M keine Löslichkeit von DBP (z. B. eine Trübung) festgestellt hatten.

Löslichkeitsprüfungen und Dosisfindungsversuche für die Prüfchemikalien

19. In einem Vorversuch sollten die Löslichkeitsgrenze der einzelnen Prüfchemikalien ermittelt und der jeweils geeignete Konzentrationsbereich für die Prüfung bestimmt werden. Die Löslichkeitsgrenze der einzelnen Prüfchemikalien wird zunächst im Lösungsmittel bestimmt und anschließend unter den Bedingungen des Assays bestätigt. Die im Assay geprüfte Endkonzentration sollte höchstens bei 1 mM liegen. Für die Dosisfindungsprüfung werden eine Lösungsmittelkontrolle sowie acht logarithmische serielle Verdünnungen ausgehend von der maximal akzeptierbaren Konzentration (z. B. 1 mM oder weniger, je nach Löslichkeitsgrenze) verwendet. Das Auftreten einer Trübung oder die Bildung eines Niederschlags werden protokolliert. Die Konzentrationen beim zweiten und beim dritten Versuch sollten ggf. angepasst werden, um die Konzentrations-Reaktionskurve besser zu beschreiben.

Akzeptanzkriterien für Prüfläufe

20. Ob ein Prüflauf akzeptiert wird, hängt von der Bewertung der Ergebnisse mit dem jeweils verwendeten Referenzöstrogen und den Kontrollen ab. Zunächst sollten für Platte 1 die vollständigen Konzentrationskurven der Referenzkontrollen jedes einzelnen Versuchs mit den Werten der Leistungsmessungen bei den Parametern für die Kurvenanpassung (z. B. IC_{50} und Hillslope) übereinstimmen; der Vergleich erfolgt anhand der für die Protokolle des CERI- und des FW-Assays angegebenen Werte (Anlagen 2 und 3) und der historischen Kontrolldaten des Labors, das die Prüfungen durchführt. Bei allen Versuchen sollten alle Kontrollen (Referenzöstrogen, schwacher Binder und Nicht-Binder) korrekt eingestuft werden. Anschließend sind die Kontrollen auf allen folgenden Platten auf Übereinstimmung mit Platte 1 zu prüfen. Um den Höchstwert der Kurve der konkurrierenden Bindungen eindeutig zu ermitteln, sollte ein ausreichendes Spektrum an Konzentrationen der Prüfchemikalie berücksichtigt werden. Die Variabilität zwischen Wiederholungen bei den einzelnen Konzentrationen der Prüfchemikalie sowie zwischen den drei unabhängigen Prüfläufen sollte angemessen und wissenschaftlich vertretbar sein. Die Fähigkeit zur konsistenten Durchführung der Assays sollte durch den Aufbau und die Pflege einer historischen Datenbank für das Referenzöstrogen und die Kontrollen nachgewiesen werden. Standardabweichungen (SD) oder Variationskoeffizienten (VK) der Mittelwerte von Parametern zur Anpassung der Kurven für das Referenzöstrogen und die Kontrolle mit dem schwachen Binder aus mehreren Versuchen können als Maßstab für die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Labors herangezogen werden. Die Ergebnisse der Kontrollen auf den Platten der einzelnen Prüfläufe sowie die Ergebnisse für die einzelnen Prüfchemikalien sind einer qualifizierten fachlichen Beurteilung zu unterziehen.

Darüber hinaus sollten für Akzeptanzkriterien die folgenden Grundsätze gelten:

— Die Daten sollten für eine quantitative Bewertung der ER-Bindung ausreichen.

— Die geprüften Konzentrationen sollten im Löslichkeitsbereich der Prüfchemikalien bleiben.

Analyse der Daten

21. Das beschriebene Verfahren zur Analyse der Daten zur Sättigung und zu konkurrierenden Bindungen sollte unter Berücksichtigung der wesentlichen Grundsätze der Charakterisierung von Wechselwirkungen zwischen Rezeptoren und Liganden durchgeführt werden. In der Regel werden Daten zur Sättigungsbindung mit einem nicht linearen Regressionsmodell analysiert, das die Bindungswirkung insgesamt ebenso wie nicht spezifische Bindungen berücksichtigt. Bei der Bestimmung von B_{max} und K_d ist möglicherweise eine Korrektur für den Abbau von Liganden (z. B. Swillens, 1995 (19)) vorzunehmen. Daten aus Untersuchungen zur Ermittlung konkurrierender Bindungen werden gewöhnlich umgewandelt (z. B. spezifische Bindung in Prozent und Konzentration der Prüfchemikalie (log M)). Mit einer geeigneten Software zur nicht linearen Kurvenanpassung sollten die Schätzwerte für log (IC_{50}) für die einzelnen Prüfchemikalien zur Verwendung in einer Hill-Gleichung mit vier Parametern ermittelt werden. Nach einer ersten Analyse sollten die Parameter zur Kurvenanpassung geprüft werden; außerdem sollte geprüft werden, in welchem Umfang die Bindungsdaten mit der erzeugten Kurve der konkurrierenden Bindungen übereinstimmen. Manchmal müssen weitere Analysen vorgenommen werden, um die optimale Kurvenanpassung zu ermitteln (z. B. indem Höchst- und/oder Mindestwerte für die Kurve festgelegt werden oder die 10-%-Regel angewendet wird (siehe Anlage 4 und (2) (Abschnitt III.A.2).

22. Die Erfüllung der Akzeptanzkriterien (Nummer 20) deutet darauf hin, dass ein Assaysystem ordnungsgemäß funktioniert. Dies gewährleistet jedoch nicht, dass eine bestimmte Prüfung tatsächlich exakte Daten ergibt. Die Wiederholung der korrekten Ergebnisse der ersten Prüfung ist die beste Bestätigung dafür, dass exakte Daten ermittelt wurden.

Allgemeine Kriterien für die Auswertung von Daten

23. Zurzeit besteht keine allgemein anerkannte Methode zur Auswertung der Daten aus ER-Bindungsassays. Allerdings sollten qualitative (z. B. Binder/Nicht-Binder) und/oder quantitative (IC_{50}, relative Bindungsaffinität (RBA) usw.) Bewertungen einer durch hrER vermittelten Aktivität auf empirischen Daten und fundierten wissenschaftlichen Beurteilungen beruhen.

Prüfbericht

24. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Assay

— durchgeführter Assay.

Kontrolle/Referenz/Prüfchemikalie

— Herkunft, Partienummer, ggf. begrenztes Verwendungsdatum;

— Stabilität der Prüfchemikalie, falls bekannt;

— Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie in Lösungsmittel, falls bekannt;

— Messung des pH-Werts, der Osmolalität und ggf. des Niederschlags im Kulturmedium, dem die Prüfchemikalie zugegeben wurde;

einkomponentiger Stoff

— physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;

— chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;

mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:

— So weit wie möglich Charakterisierung durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Elemente.

Lösungsmittel/Vehikel

— Beschreibung (Art, Lieferant und Charge);

— Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels;

— Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie in Lösungsmittel/in einem Vehikel, falls bekannt.

Rezeptoren

— Herkunft der Rezeptoren (Hersteller, Bestellnummer, Charge, Art des Rezeptors, vom Hersteller gelieferte aktive Rezeptorkonzentration, Zertifizierung des Herstellers);

— Beschreibung der Rezeptoren (einschl. ermittelte Sättigungsbindungen): K_d, B_{max};

— Lagerung der Rezeptoren;

— radioaktiv markierter Ligand;

— Hersteller, Bestellnummer, Charge, spezifische Aktivität.

Prüfbedingungen

— Einschränkungen hinsichtlich der Löslichkeit unter Assay-Bedingungen;

— Zusammensetzung des Bindungspuffers;

— Konzentration des Rezeptors;

— Konzentration des Tracers (d. h. des radioaktiv markierten Liganden);

— Konzentrationen der Prüfchemikalie;

— Prozentanteil des Vehikels im endgültigen Assay;

— Inkubationstemperatur und -dauer;

— Methode zur Trennung von gebundenen/nicht gebundenen Chemikalien;

— positive und negative Kontrollen/Referenzstandards;

— Kriterien zur Einstufung der Prüfungen als positiv, negativ oder nicht eindeutig.

Akzeptanzprüfung

— tatsächliche IC_{50}- und Hillslope-Werte für gleichzeitige Positivkontrollen/Referenzstoffe.

Ergebnisse

— Rohdaten und Daten zu gebundenen/nicht gebundenen Chemikalien;

— ggf. Bestätigung durch Prüfung der Denaturierung;

— wenn vorhanden, niedrigste Wirkungskonzentration (LEC);

— RBA- und/oder IC_{50}-Werte;

— nach Möglichkeit Dosis-Reaktions-Verhältnis;

— wenn vorhanden, statistische Analysen sowie Messabweichung und Konfidenzwerte (z. B. SEM, SD, VK oder 95 % CI) sowie Angaben dazu, wie diese Werte ermittelt wurden.

Erörterung der Ergebnisse

— Anwendung der 10-%-Regel.

Schlussfolgerung.

LITERATUR

(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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organisation für Wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(4) OECD (2012). 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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(5) Cavailles, V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: S. 20-26.

(6) Welboren, W.J., u. a. (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr*. Relat. Cancer, 16(4): S. 1073-1089.

(7) Younes, M., und Honma, N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol*. Lab. Med., 135(1): S. 63-66.

(8) Diamanti-Kandarakis u. a. (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., u. a. (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 für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 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. S. 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, J.M.; Nestor, K.M.; Fasco, M.J.; Pentecost, B.T.; Arcaro, K.F. 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.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN UND ABKÜRZUNGEN

10-%-Regel: Bei den Analysen Möglichkeit des Ausschlusses von Datenpunkten, wenn bei Wiederholungen der Mittelwert der prozentualen spezifischen [^{3}H]-17β-Estradiol-Bindung mindestens 10 % über dem beobachteten Mittelwert bei einer geringeren Konzentration liegt (siehe Anlage 4).

Akzeptanzkriterien: Mindeststandards für Kontrollen und Referenzstandards. Damit ein Versuch als gültig betrachtet werden kann, sollten alle Akzeptanzkriterien erfüllt sein.

CF: OECD Conceptual Framework for the Testing and Evaluation of Endocrine Disrupters.

Chemikalie: Ein Stoff oder ein Gemisch.

E2: 17β-Estradiol

ED: Endokrine Störung.

Eignung: Die nachgewiesene Fähigkeit zur ordnungsgemäßen Durchführung eines Assays vor der Prüfung unbekannter Stoffe.

ER: Östrogenrezeptor.

Genauigkeit (Übereinstimmung): Der Grad an Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen eines Assays und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung eines Assays und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung" verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse eines Assays (1).

hERα: Humaner Östrogenrezeptor α.

IC50: Die Hälfte der maximalen Wirkungskonzentration einer Prüfchemikalie mit hemmender Wirkung.

ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (das US-amerikanische Validierungszentrum).

Inter-Labor-Reproduzierbarkeit: Das Ausmaß, in dem unterschiedliche qualifizierte Labors, die dasselbe Protokoll verwenden und dieselben Prüfstoffe untersuchen, qualitativ und quantitativ vergleichbare Ergebnisse erzielen können. Die Inter-Labor-Reproduzierbarkeit wird während der Prävalidierungs- und Validierungsverfahren ermittelt und zeigt das Maß an, in dem ein Assay erfolgreich zwischen Labors übertragen werden kann (1).

Intra-Labor-Reproduzierbarkeit: Das Ausmaß, in dem qualifizierte Personen innerhalb desselben Labors, die dasselbe spezifische Protokoll zu unterschiedlichen Zeiten verwenden, erfolgreich dieselben Ergebnisse replizieren können. Auch als „laborinterne Reproduzierbarkeit" bezeichnet (1).

LEC: Als niedrigste Wirkungskonzentration (Lowest Effective Concentration) wird die niedrigste Konzentration einer Prüfchemikalie bezeichnet, die eine Wirkung hervorruft (d. h. die niedrigste Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der die n-fache Induktion sich statistisch von der gleichzeitigen Vehikelkontrolle unterscheidet).

Leistungsstandards: Auf einer validierten Prüfmethode beruhende Normen, auf deren Grundlage die Vergleichbarkeit einem vorgeschlagenen, mechanistisch und funktionell ähnlichen Assay bewertet werden kann. Sie umfassen (1) wesentliche Elemente des Assays; (2) ein Mindestverzeichnis von Referenzchemikalien, ausgewählt aus den Chemikalien, die zum Nachweis der akzeptablen Leistung der validierten Referenzmethode verwendet werden, und (3) je nach den für die validierte Referenzmethode erzielten Ergebnissen die vergleichbaren Genauigkeits- und Zuverlässigkeitswerte, die der vorgeschlagene Assay bei der Bewertung anhand des Mindestverzeichnisses von Referenzchemikalien ergeben sollte (1).

Leistungsstoffe: Eine Untergruppe der in die Leistungsstandards einbezogenen Referenzstoffe, die von Labors bei standardisierten Assays zum Nachweis der fachlichen Kompetenz eingesetzt werden können. Auswahlkriterien für diese Stoffe sind u. a., dass sie den Reaktionsbereich abdecken und im Handel erhältlich sein müssen und dass für diese Stoffe hochwertige Referenzdaten verfügbar sein müssen.

Me-Too-Prüfung: [Im englischen Sprachraum gemeinsprachliche] Bezeichnung einer Prüfmethode, die strukturell und funktionell mit einer validierten und akzeptierten Referenzprüfmethode vergleichbar ist. Gleichbedeutend mit „vergleichbare Prüfmethode“ verwendet.

Östrogenaktivität: Die Fähigkeit einer Chemikalie, die Bindung von Östrogenrezeptoren durch 17β-Estradiol nachzubilden. Mit dieser Prüfmethode kann die Bindung an den hERα festgestellt werden.

PBTG: Leistungsbezogene Prüfrichtlinie.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

RBA: Relative Bindungsaffinität. Die RBA eines Stoffs wird als Prozentanteil von log (IC_{50}) des Stoffs im Vergleich zu log (IC_{50}) bei 17β-Estradiol berechnet.

Referenzöstrogen: 17ß-Estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referenzprüfmethode: Die Assays, auf denen die PBTG 493 beruht.

Relevanz: Dieser Begriff bezieht sich auf das Verhältnis zwischen dem Assay und der betreffenden Wirkung und auf die Frage, ob er aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Er beschreibt das Ausmaß, in dem der Assay die untersuchte biologische Wirkung korrekt misst oder vorhersagt. Die Relevanz schließt eine Beurteilung der Genauigkeit (Übereinstimmung) eines Assays ein (1).

SD: Standardabweichung,

Validierte Prüfmethode: Eine Prüfmethode, für die zwecks Bestimmung ihrer Relevanz (einschließlich Genauigkeit) und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck Validierungsstudien abgeschlossen wurden. Es wird darauf hingewiesen, dass eine validierte Prüfmethode möglicherweise nicht genau und zuverlässig genug ist, um für den vorgeschlagenen Zweck akzeptiert zu werden (1).

Validierung: Prozess, mit dem die Zuverlässigkeit und die Relevanz eines bestimmten Ansatzes, einer Methode, eines Assays, eines Prozesses oder einer Bewertung für einen bestimmten Zweck festgestellt wird (1).

VK: Variationskoeffizient.

Zuverlässigkeit: Maß der Reproduzierbarkeit einer Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien über einen längeren Zeitraum und bei einheitlichem Protokoll. Sie wird durch Berechnung der Intra- und Inter-Labor-Reproduzierbarkeit bewertet (13).

Anlage 2

DER FREYBERGER-WILSON-IN-VITRO-ÖSTROGENREZEPTOR-(ERA-)BINDUNGSASSAY MIT IN VOLLER LÄNGE REKOMBINANTEM ERA ZUR ERMITTLUNG VON SÄTTIGUNGSBINDUNGEN UND KONKURRIERENDEN BINDUNGEN

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

1. Bei diesem *In-vitro*-Östrogenrezeptor-(ERα)-Bindungsassay zur Ermittlung von Sättigungsbindungen und konkurrierenden Bindungen wird der in voller Länge rekombinante humane ERαα(hrERα) verwendet. Dieser Östrogenrezeptor wird in mit einem Baculovirus infizierten Insektenzellen erzeugt und aus diesen Zellen isoliert. Das von Freyberger und Wilson entwickelte Protokoll wurde einer internationalen Validierungsstudie durch mehrere Labors unterzogen (2). Dabei wurden die Relevanz und die Zuverlässigkeit des Protokolls für den vorgesehenen Zweck des Assays nachgewiesen.

2. Der Assay besteht in einem Prüfverfahren zur Ermittlung von Stoffen, die eine Bindung mit dem hrERα über die volle Länge eingehen können. Mit dem Assay kann untersucht werden, ob eine Prüfchemikalie mit 17β-Estradiol um Bindungen an den hrERα konkurrieren kann. Als quantitative Ergebnisse können mit dem Assay u. a. die Werte für IC_{50} (als Maßstab für die zur Verdrängung der Hälfte des [^{3}H]-17β-Estradiols vom hrERα durch eine Prüfchemikalie erforderliche Konzentration) und die relative Affinität von Prüfchemikalien für Bindungen an den hrERα im Vergleich zu 17β-Estradiol ermittelt werden. Mit Blick auf die Verwendung zur Prüfung von Chemikalien kann ein akzeptables qualitatives Ergebnis des Assays auch darin bestehen, dass Prüfchemikalien nach ihrer Bindung an den hrERα und nach den genannten Kriterien für die Bindungskurven als Binder, Nicht-Binder oder nicht eindeutig eingestuft werden.

3. Da bei diesem Assay ein radioaktiver Ligand verwendet wird, benötigen die Labors eine Genehmigung für die Verwendung von radioaktivem Material. Bei allen Verfahren unter Verwendung von Radioisotopen und von gefährlichen Chemikalien sind die nach den nationalen Rechtsvorschriften geltenden Bestimmungen und die dort vorgesehenen Verfahren einzuhalten.

4. Vor der Verwendung dieses Assays für rechtliche Zwecke sollten die Abschnitte „**ALLGEMEINE EINLEITUNG**“ und „**ELEMENTE DES hrER-BINDUNGSASSAYS**“ gelesen werden. Die in dieser Prüfrichtlinie verwendeten Begriffe und Abkürzungen werden in Anlage 1 erläutert.

PRINZIPIEN DES ASSAYS (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

5. Mit dem hrERα-Bindungsassay wird die Fähigkeit eines radioaktiv markierten Liganden ([^{3}H]-17β-Estradiol) gemessen, bei zunehmenden Konzentrationen einer Prüfchemikalie (z. B. eines Bindungskonkurrenten) eine Bindung mit dem ER einzugehen. Prüfchemikalien mit einer starken ER-Affinität konkurrieren mit dem radioaktiv markierten Liganden bei einer niedrigen Konzentration als Chemikalien mit einer geringeren Affinität für diesen Rezeptor.

6. Dieser Assay beinhaltet zwei wesentliche Elemente: einen Versuch zur Ermittlung von Sättigungsbindungen zur Charakterisierung der Parameter der Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand und einen anschließenden Versuch zur Ermittlung konkurrierender Bindungen, mit dem die Konkurrenz zwischen einer Prüfchemikalie und einem radioaktiv markierten Liganden im Hinblick auf die Bindung an den ER beschrieben wird.

7. Zur Vorbereitung der Prüfung konkurrierender Bindungen soll anhand einer Ermittlung der Sättigungsbindung eine bestimmte Rezeptorcharge hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität geprüft und quantitativ bewertet werden. Mit der Prüfung konkurrierender Bindungen werden unter Gleichgewichtsbedingungen die Affinität einer bestimmten Konzentration des Östrogenrezeptors für seinen natürlichen Liganden (ausgedrückt durch die Dissoziationskonstante K_d) und die Konzentration der aktiven Rezeptor-Bindungsstellen (B_{max}) gemessen.

8. Mit der Prüfung konkurrierender Bindungen wird die Affinität eines Stoffs für Bindungen an den ER im Hinblick auf die Konkurrenz mit [^{3}H]-17β-Estradiol bewertet. Die Affinität wird anhand der Konzentration der Prüfchemikalie quantifiziert, die unter Gleichgewichtsbedingungen 50 % der spezifischen Bindung von [^{3}H]-17β-Estradiol hemmt („Hemmkonzentration 50 %“ oder IC_{50}). Diese Affinität kann auch anhand der relativen Bindungsaffinität (RBA, bezogen auf IC_{50} Estradiol, im selben Prüflauf getrennt gemessen) beurteilt werden. Bei der Prüfung konkurrierender Bindungen wird die Bindung von [^{3}H]-17β-Estradiol in einer bestimmten Konzentration an zahlreiche (acht Größenordnungen) Konzentrationen einer Prüfchemikalie gemessen. Die ermittelten Daten werden dann möglichst entsprechend der Hill-Gleichung (Hill, 1910) angepasst, die die Verdrängung des Radioliganden durch einen für eine bestimmte Bindungsstelle spezifischen konkurrierenden Binder beschreibt. Anhand des Umfangs der Verdrängung des radioaktiv markierten Estradiols bei Gleichgewichtsbedingungen wird die Prüfchemikalie als Binder, Nicht-Binder oder nicht eindeutig eingestuft.

PRÜFVERFAHREN

Nachweis einer akzeptablen Leistungsfähigkeit bei Untersuchungen des hrERα-Proteins

9. Vor der regelmäßigen Durchführung der Assays zur Ermittlung von Sättigungsbindungen und konkurrierenden Bindungen ist jeweils mit einer neuen Charge des hrERα nachzuweisen, dass in dem Labor, in dem der Rezeptor verwendet wird, korrekte Ergebnisse ermittelt werden. Die Leistungsfähigkeit sollte in zwei Schritten nachgewiesen werden:

— Durchführung des [^{3}H]-17β-Estradiol-Bindungsassays zum Nachweis der Spezifität und der Sättigung für den hrERα; anhand einer nicht linearen Regressionsanalyse der ermittelten Daten (z. B. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) und des anschließenden Scatchard-Diagramms sollten die Bindungsaffinität des [^{3}H]-17β-Estradiols (K_d) für den hrERα und die Anzahl der Rezeptoren (B_{max}) der einzelnen hrERα-Chargen dokumentiert werden;

— Durchführung eines Assays zur Prüfung konkurrierender Bindungen mit Kontrollstoffen (Referenzöstrogen (17β-Estradiol)), einem schwachen Binder (z. B. Norethynodrel oder Norethindron) und einem Nicht-Binder (Octyltriethoxysilan, OTES). Jedes Labor sollte eine historische Datenbank zum Nachweis der Konsistenz der IC_{50}-Werte und sonstiger relevanter Werte zwischen den einzelnen Versuchen sowie zwischen den einzelnen hrERα-Chargen bei Versuchen mit dem Referenzöstrogen und einem schwachen Binder aufbauen. Die Parameter der Kurven der konkurrierenden Bindungen bei den Kontrollstoffen sollten innerhalb des 95-%-Konfidenzintervalls liegen (siehe Tabelle 1), das anhand von Daten von an der Validierungsstudie zu diesem Assay beteiligten Labors festgelegt wurde (2).

Tabelle 1

Leistungskriterien für das Referenzöstrogen und den schwachen Binder, FW-hrER-Bindungsassay

Stoff	Parameter	Mittelwert [a]	Standardabweichung (n)	95-%-Konfidenzintervalle [b]	
				Untere Grenze	Obere Grenze
17β-Estradiol	Höchstwert (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Mindestwert (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hillslope	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	Log IC_{50} (M)	-8,92 [b]	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Norethynodrel	Höchstwert (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Mindestwert (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hillslope	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	IC_{50} (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Norethindron [b]	Höchstwert (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Mindestwert (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hillslope	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	Log IC_{50}(M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

[a] Der Mittelwert (n) ± Standardabweichung (SD) wurde anhand der Parameterschätzungen für die Kurvenanpassung (Hill-Gleichung mit 4 Parametern) für Prüfläufe in vier Labors im Rahmen der Validierungsstudie berechnet (siehe (2), Anlage N).
[b] Die 95-%-Konfidenzintervalle dienen zur Orientierung für die Akzeptanzkriterien.
[b] In der Validierung war die Prüfung von Norethindron optional für Unteraufgabe 4 vorgesehen (siehe (2), siehe Unteraufgabe 4). Die Mittelwerte ± SD (n) wurden also anhand der Schätzungen für die Kurvenanpassung (Hill-Gleichung mit 4 Parametern) für in zwei Labors durchgeführte Kontrollprüfungen berechnet.
Der Bereich für IC_{50} hängt von der K_d der Rezeptorzubereitung und von der Konzentration des radioaktiv markierten Liganden in den einzelnen Labors ab. Eine geeignete Anpassung des Bereichs für IC_{50} je nach den Bedingungen bei der Durchführung des Assays ist akzeptabel.

Nachweis der Eignung des Labors

10. Siehe Nummern 17 und 18 sowie Tabelle 2 im Abschnitt „**ELEMENTE DES hrER-BINDUNGSASSAYS**“ für diese Prüfmethode. Die Assays (zur Ermittlung von Sättigungsbindungen und konkurrierenden Bindungen) sollten jeweils drei unabhängige Prüfläufe (d. h. mit frischen Rezeptor-, Chemikalien- und Reagenzienverdünnungen) an unterschiedlichen Tagen jeweils mit drei Wiederholungen umfassen.

Ermittlung der Rezeptorkonzentration (hrERα)

11. Die Konzentration des aktiven Rezeptors ist je nach Charge und Lagerungsbedingungen leicht unterschiedlich. Daher sollte die Konzentration des vom Hersteller gelieferten aktiven Rezeptors bestimmt werden. Daraus ergibt sich die geeignete Konzentration des aktiven Rezeptors beim Prüflauf.

12. Unter den Bedingungen bei der konkurrierenden Bindung (d. h. 1 nM [^{3}H]-Estradiol) werden Nennkonzentrationen von 0,25, 0,5, 0,75 und 1 nM Rezeptor einmal ohne (Gesamtbindung) und einmal mit (nicht spezifische Bindung) 1 µM nicht markiertem Estradiol inkubiert. Die spezifische Bindung wird berechnet als Differenz zwischen der Gesamtbindung und der nicht spezifischen Bindung bezogen auf die Rezeptor-Nennkonzentration in einem Diagramm dargestellt. Die Rezeptorkonzentration, bei der sich spezifische Bindungswerte entsprechend einem Anteil von 20 % des zugesetzten radioaktiven Liganden ergeben, wird auf die entsprechende Rezeptor-Nennkonzentration bezogen; diese Rezeptorkonzentration ist bei den Versuchen zur Ermittlung von Sättigungsbindungen und konkurrierenden Bindungen zu verwenden. Diese Anforderung wird häufig mit einer endgültigen hrER-Konzentration von 0,5 nM erfüllt.

13. Wenn das 20-%-Kriterium mehrfach nicht erfüllt werden kann, sollte der Versuchsaufbau auf mögliche Fehlerquellen geprüft werden. Dass das 20-%-Kriterium nicht erfüllt werden kann, deutet möglicherweise auch darauf hin, dass die rekombinante Charge den aktiven Rezeptor nur in einem sehr geringen Anteil enthält. In diesem Fall sollte die Verwendung einer anderen Rezeptor-Charge in Betracht gezogen werden.

Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung

14. Acht zunehmende [^{3}H]-17β-Estradiol-Konzentrationen sollten jeweils dreifach unter den drei folgenden Bedingungen geprüft werden (siehe Tabelle 2):

— ohne nicht markiertes 17β-Estradiol und mit dem ER, um anhand einer Messung der Radioaktivität der Wells, die ausschließlich [^{3}H]-17β-Estradiol enthalten, die Gesamtbindung zu ermitteln;

— bei einer 1 000-mal höheren Konzentration des nicht markierten 17β-Estradiols im Vergleich zum markierten 17β-Estradiol und zu Prüfungen mit dem ER; dadurch sollen die aktiven Bindungsstellen mit nicht markiertem 17β-Estradiol gesättigt werden, um anhand einer Messung der Radioaktivität in den Wells die nicht spezifische Bindung zu bestimmen. Verbleibendes warmes Estradiol, das Bindungen mit dem Rezeptor eingehen kann, wird als Bindung an eine nicht spezifischen Bindungsstelle betrachtet, da das kalte Estradiol in einer derart hohen Konzentration vorliegen sollte, dass es an allen verfügbaren spezifischen Bindungsstellen des Rezeptors gebunden ist;

— ohne nicht markiertes 17β-Estradiol und ohne den ER (Ermittlung der Gesamt-Radioaktivität).

Zubereitung der Lösungen mit [^{3}H]-17β-Estradiol und mit nicht markiertem 17β-Estradiol

15. Unter Zugabe eines Assay-Puffers zu einer 12-nM-Vorratslösung [^{3}H]-17β-Estradiol wird [^{3}H]-17β-Estradiol auf Konzentrationen von anfänglich 0,12 nM bis 12 nM verdünnt. Durch Zugabe von 40 µl dieser Lösungen in die jeweiligen Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte (mit einem Endvolumen von 160 µl) werden die endgültigen Assay-Konzentrationen von 0,03-3,0 nM hergestellt. Die Zubereitung des Assay-Puffers, der [^{3}H]-17β-Estradiol-Vorratslösung und der Verdünnungen sowie die Bestimmung der Konzentrationen werden im FW-Protokoll eingehend beschrieben (2).

16. Die Ethanol-17β-Estradiol-Lösungen sind unter Zugabe des Assay-Puffers so zu verdünnen, dass sich acht zunehmende Ausgangskonzentrationen von 0,06-6 µM ergeben. Durch Zugabe von 80 µl dieser Lösungen in die jeweiligen Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte (mit einem Endvolumen von 160 µl) werden die endgültigen Assay-Konzentrationen von 0,03-3,0 µM hergestellt. Die Endkonzentrationen des nicht markierten 17β-Estradiols in den einzelnen Assays zur Ermittlung der nicht spezifischen Bindung sollten das 1 000-Fache der markierten [^{3}H]-17β-Estradiol-Konzentration betragen. Die Zubereitung der nicht markierten 17β-Estradiol-Lösungen wird eingehend im FW-Protokoll beschrieben (2).

17. Für die Versuche ist die Nennkonzentration des Rezeptors zu verwenden, bei der sich eine spezifische Bindung von 20 ± 5 % ergibt (Nummern 12 und 13). Die hrERα-Lösung ist unmittelbar vor Gebrauch zuzubereiten.

18. Die 96-Well-Mikrotiterplatten werden mit 3 Wiederholungen pro Konzentration vorbereitet, wie in Tabelle 2 dargestellt. Anlage 2.2 enthält ein Beispiel für die Anordnung der Konzentrationen und der Volumina von [^{3}H]-17β-Estradiol, nicht markiertem 17β-Estradiol, des Puffers und des Rezeptors.

Tabelle 2

Anordnung auf der Mikrotiterplatte beim Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER			Gesamtbindung (Lösungsmittel)
B	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,03 µM E2			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,06 µM E2			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,08 µM E2			0,10 nM [3H] E2 + ER+ 0,10 µM E2			Nicht spezifische Bindung
E	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,30 µM E2			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,60 µM E2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 1,0 µM E2			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 3,0 µM E2			
F													
G													
H													

[^{3}H] E2: [^{3}H]-17β-Estradiol
ER: = Östrogenrezeptor.
E2: nicht markiertes 17β-Estradiol

19. Die für den Assay verwendeten Mikrotiterplatten werden 16-20 Stunden bei 2-8 °C auf einem Karussell inkubiert.

Messung des an den hrERα gebundenen [^{3}H]-17β-Estradiols

20. Das an den hrERα gebundene [^{3}H]-17β-Estradiol ist von dem nicht gebundenen [^{3}H]-17β-Estradiol zu trennen. Dazu werden in jedes Well 80 µl kalte DCC-Suspension gegeben; anschließend werden die Mikrotiterplatten 10 Minuten geschüttelt und danach 10 Minuten mit etwa 2 500 rpm zentrifugiert. Um bei diesem Prozess eine Dissoziation des gebundenen [^{3}H]-17β-Estradiols vom hrERα zu minimieren, ist von entscheidender Bedeutung, dass bei den Puffer- und den Assay-Wells eine Temperatur von 2-8 °C aufrechterhalten wird und dass alle Schritte rasch durchgeführt werden. Für eine effiziente und rasche Behandlung der Platten wird eine Schüttelvorrichtung für Mikrotiterplatten benötigt.

21. 50 µl des Überstands des an den hrERα gebundenen [^{3}H]-17β-Estradiols sind anschließend mit äußerster Sorgfalt zu entnehmen, damit Verunreinigungen der Wells durch Berührung mit der DCC-Lösung verhindert werden. Der Überstand wird auf eine zweite Mikrotiterplatte gegeben.

22. Danach werden in jedes Well (A1-B12 und D1-E12) 200 µl einer Szintillationsflüssigkeit gegeben, die die kinetische Energie radioaktiver Emissionen in Lichtenergie umwandeln kann. Die Wells G1-H12 (= DPM gesamt) enthalten serielle Verdünnungen des [^{3}H]-17β-Estradiols (40 µl), die unmittelbar in die Szintillationsflüssigkeit in den Wells der Messplatte zu geben sind, wie in Tabelle 3 angegeben (d. h. die Wells enthalten jeweils nur 200 µl Szintillationsflüssigkeit und [^{3}H]-17β-Estradiol in der jeweiligen Verdünnung). Anhand der Zerfallsereignisse pro Minute (DPM) wird so nachgewiesen, wie viel [^{3}H]-17β-Estradiol jeweils in die Wells zur Ermittlung der Gesamtbindung und der nicht spezifischen Bindung gegeben wurde.

Tabelle 3

Anordnung auf der Mikrotiterplatte beim Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung, Messung der Radioaktivität

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER			Gesamtbindung (Lösungsmittel)
B	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,03 µM E2			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,06 µM E2			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,08 µM E2			0,10 nM [3H] E2 + + ER+ 0,10 µM E2			Nicht spezifische Bindung
E	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,30 µM E2			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,60 µM E2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 1,0 µM E2			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER + + 3,0 µM E2			
F													
G	0,03 nM [^{3}H] E2 (DPM gesamt)			0,06 nM [^{3}H] E2			0,08 nM [^{3}H] E2			0,10 nM [^{3}H] E2			DPM gesamt (-*)
H	0,30 nM [^{3}H] E2			0,60 nM [^{3}H] E2			1,0 nM [^{3}H] E2			3,0 nM [^{3}H] E2			

[^{3}H] E2: [^{3}H]-17β-Estradiol
ER: Östrogenrezeptor.
E2: nicht markiertes 17β-Estradiol
DPM: Zerfallsereignisse pro Minute
(*) Die warmen seriellen Verdünnungen des markierten [^{3}H]-Estradiols werden unmittelbar in die 200 µl Szintillationsflüssigkeit in den Wells G1-H12 gegeben.

23. Die Messungen werden mit einer Verzögerung von mindestens zwei Stunden durchgeführt; die Zählung sollte 40 Minuten pro Well andauern. Zur Bestimmung der DPM-Werte pro Well ist ein Mikrotiterplatten-Szintillationszähler mit Querempfindlichkeitskorrektur zu verwenden. Wenn kein Szintillationszähler für Mikrotiterplatten verfügbar ist, können die Proben auch mit einem sonstigen Zähler gemessen werden. In diesem Fall kann die Dauer der Zählung reduziert werden.

Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

24. Mit dem Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen wird die Bindung von [^{3}H]-17β- Estradiol einer einzelnen Konzentration bei zunehmenden Konzentrationen einer Prüfchemikalie gemessen. Bei jedem Prüflauf sind für jede Konzentration drei gleichzeitige Replikate zu verwenden. Außerdem werden für jede zu prüfende Chemikalie drei nicht gleichzeitige Prüfläufe durchgeführt. Der Assay ist auf zwei oder mehr 96-Well-Mikrotiterplatten durchzuführen.

Kontrollen

25. Bei der Durchführung des Assays sind die Lösungsmittelkontrolle und die sonstigen Kontrollen (d. h. die Kontrollen mit dem Referenzöstrogen, dem schwachen Binder und dem Nicht-Binder) gleichzeitig zu prüfen. Bei jedem Prüflauf sollten auf jeweils einer Platte vollständige Konzentrationskurven des Referenzöstrogens und der Kontrollen (d. h. schwache Binder und Nicht-Binder) verwendet werden. Alle anderen Platten sollten Folgendes enthalten: (i) eine hohe Konzentration (maximale Verdrängung) und eine mittlere Konzentration (etwa IC_{50}) sowohl von E2 als auch des schwachen Binders jeweils dreifach, (ii) eine Lösungsmittelkontrolle und einen nicht spezifischen Binder, ebenfalls jeweils mindestens dreifach. Die Verfahren für die Zubereitung des Assay-Puffers, der Kontrollen, des [^{3}H]-17β-Estradiols, des hrERα und der Prüfchemikalienlösungen werden in (2) (Anlage K, siehe Protokoll zum FW-Assay) beschrieben.

Lösungsmittelkontrolle

26. Die Lösungsmittelkontrolle bestätigt, dass das Lösungsmittel nicht mit dem Prüfsystem reagiert und die Gesamtbindung (TB) misst. Bevorzugtes Lösungsmittel ist Ethanol. Wenn die höchste Konzentration der Prüfchemikalie in Ethanol nicht löslich ist, kann alternativ DMSO verwendet werden. Die Ethanol- bzw. ggf. die DMSO-Konzentration in den endgültigen Assay-Wells sollte bei 1,5 % liegen und darf höchstens 2 % betragen.

Pufferkontrolle

27. Die Pufferkontrolle (PK) darf weder Lösungsmittel noch die Prüfchemikalie, jedoch alle sonstigen im Assay verwendeten Elemente enthalten. Die Ergebnisse der Pufferkontrolle werden mit der Lösungsmittelkontrolle verglichen, um sicherzustellen, dass das verwendete Lösungsmittel das Assay-System nicht beeinträchtigt.

Starker Binder (Referenzöstrogen)

28. 17β-Estradiol (CAS 50-28-2) bindet sich als endogener Ligand mit hoher Affinität an den ER Untertyp alpha. Für jeden hrERα-Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen wird eine Standardkurve mit nicht markiertem 17β-Estradiol erstellt, damit die Variabilität bei Durchführung des Assays in einem Labor im Zeitverlauf beurteilt werden kann. Aus nicht markiertem 17β-Estradiol werden acht Lösungen in Ethanol hergestellt. Das Spektrum der Konzentrationen in den Assay-Wells reicht von 100 nM – 10 pM (-7[log M] bis -11[log M]) mit den folgenden Einzelkonzentrationen: (-7[log M], -8[log M], -8,5[log M], -9[log M], -9,5[log M], -10[log M], -11[log M]). Die höchste Konzentration des nicht markierten 17β-Estradiols (1 μM) dient auch als nicht spezifischer Bindungsindikator. In Tabelle 4 wird diese Konzentration als „NSB" bezeichnet, obwohl sie Teil der Standardkurve ist.

Schwacher Binder

29. Um die Empfindlichkeit der einzelnen Versuche nachzuweisen und um die Variabilität bei der Durchführung des Assays im Laufe der Zeit beurteilen zu können, sollte ein schwacher Binder (Norethynodrel (CAS68-23-5) oder Norethindron (CAS 68-22-4)) einbezogen werden. Aus dem schwachen Binder werden acht Lösungen in Ethanol hergestellt. Das Spektrum der Konzentrationen in den Assay-Wells reicht von 3 nM – 30 pM (-8,5[log M] bis -4,5[log M]) mit den folgenden Einzelkonzentrationen: -4,5[log M], -5[log M], -5,5[log M], -6[log M], -6,5[log M], -7[log M],-7,5[log M], -8,5[log M].

Nicht-Binder

30. Als Negativkontrolle (Nicht-Binder) wird Octyltriethoxysilan (OTES, CAS 2 943-75-1) verwendet. Die Negativkontrolle gewährleistet, dass mit dem Assay unter den gegebenen Bedingungen erkannt wird, wenn Prüfchemikalien sich nicht an den hrERα binden. Aus dem Nicht-Binder werden acht Lösungen in Ethanol hergestellt. Das Spektrum der Konzentrationen in den Assay-Wells reicht von 0,1 nM – 1 000 pM (-10[log M] bis -3[log M]) in logarithmischen Schritten. Als Nicht-Binder kann zur Kontrolle alternativ auch Di-*n*-butylphtalat (DBP) verwendet werden. Die maximale Löslichkeit wurde für -4[log M] ermittelt.

hrERα-Konzentration

31. Für die Versuche ist die Menge des Rezeptors zu verwenden, bei der sich eine spezifische Bindung von 20 ± 5 % bezogen auf 1 nM des Radioliganden ergibt (Nummern 12 und 13 in Anlage 2). Die hrERα-Lösung ist unmittelbar vor Gebrauch zuzubereiten.

[^{3}H]-17β-Estradiol

32. In den Assay-Wells ist [^{3}H]-17β-Estradiol in einer Konzentration von 1,0 nM zu verwenden.

Prüfchemikalien

33. Zunächst muss anhand einer Löslichkeitsprüfung die Löslichkeitsgrenze der einzelnen Prüfchemikalien ermittelt und ein geeigneter Konzentrationsbereich für die Durchführung des Prüfprotokolls bestimmt werden. Die Löslichkeitsgrenze der einzelnen Prüfchemikalien wird zunächst im Lösungsmittel bestimmt und anschließend unter den Bedingungen des Assays bestätigt. Mit dem Assay sind Endkonzentrationen höchstens bis zu 1 mM zu prüfen. Der Vorversuch zur Dosisfindung wird mit einer Lösungsmittelkontrolle und 8 logarithmischen seriellen Verdünnungen beginnend mit der maximal akzeptierbaren Konzentration (z. B. 1 mM oder weniger, je nach Löslichkeitsgrenze) durchgeführt; dabei ist das Auftreten einer Trübung oder eines Niederschlags zu protokollieren (Nummer 35). Die Prüfchemikalie wird anhand der Kurven für 8 im Vorversuch ermittelte logarithmische Konzentrationskurven untersucht. Die Konzentrationen im zweiten und im dritten Versuch sind ggf. so anzupassen, dass die Konzentrations-Reaktionskurve besser charakterisiert wird.

34. Verdünnungen der Prüfchemikalien werden mit dem jeweils geeigneten Lösungsmittel hergestellt (Nummer 26 in Anlage 2). Wenn die höchste Konzentration der Prüfchemikalie weder in Ethanol noch in DMSO löslich ist und die Zugabe von weiterem Lösungsmittel dazu führen würde, dass die Lösungsmittelkonzentration im letzten Röhrchen die Akzeptanzgrenze überschreiten würde, kann die nächstgeringere Konzentration als höchste Konzentration angenommen werden. In diesem Fall kann am unteren Ende der Konzentrationsreihe eine weitere Konzentration eingefügt werden. Die übrigen Konzentrationen der Reihe bleiben unverändert.

35. Die Lösungen mit der Prüfchemikalie werden beim Einbringen in die Assay-Wells sorgfältig beobachtet, da die Prüfchemikalien nach dem Einbringen in die Assay-Wells einen Niederschlag bilden können. Die Daten aller Wells mit einem Niederschlag werden bei der Kurvenanpassung nicht berücksichtigt. Der Grund für den Ausschluss der betreffenden Wells ist zu vermerken.

36. Wenn bereits Informationen aus anderen Quellen mit einem log (IC_{50}) für eine Prüfchemikalie verfügbar sind, können geometrische Verdünnungsstufen (in 0,5-log-Einheiten um den erwarteten log (IC_{50}) angemessen sein. Am Ende sollte ein ausreichender Abstand der Konzentrationen auf beiden Seiten von log (IC_{50}) einschließlich der höchsten und der niedrigsten Konzentration erreicht sein, damit die Bindungskurve angemessen beschrieben werden kann.

Vorbereitung der Assay-Platte

37. Mit Etiketten versehene Mikrotiterplatten werden für sechs Inkubationen mit Codes für die Lösungsmittelkontrolle, die höchste Konzentration des Referenzöstrogens (die auch als Indikator für die nicht spezifische Bindung (NSB) dient) und die Pufferkontrolle vorbereitet; außerdem werden für drei Inkubationen Etiketten mit Codes für jede einzelne der acht Konzentrationen der Nicht-Binder-Kontrolle (Octyltriethyxysilan) und für die 7 geringeren Konzentrationen des Referenzöstrogens, die 8 Konzentrationen des schwachen Binders und die 8 Konzentrationen der einzelnen Prüfchemikalien (TC) vorbereitet. Ein Beispiel für die Gestaltung des Plattendiagramms für die vollständigen Konzentrationskurven des Referenzöstrogens und der Kontrolle ist Tabelle 4 zu entnehmen. Für die Prüfchemikalien werden weitere Mikrotiterplatten verwendet; diese Platten sollten Plattenkontrollen, d. h. 1) eine hohe (maximale Verdrängung) und eine mittlere Konzentration (etwa die IC_{50}-Konzentration) von E2 sowie des schwachen Binders (dreifach) und 2) eine Lösungsmittelkontrolle und eine nicht spezifische Bindung (jeweils sechsfach) umfassen (Tabelle 5). Ein Beispiel für die Anordnung auf einer Mikrotiterplatte für einen Assay zur Untersuchung konkurrierender Bindungen mit drei unbekannten Prüfchemikalien ist Anlage 2.3 zu entnehmen. Die in den Tabellen 4 und 5 genannten Konzentrationen sind die Endkonzentrationen des Assays. Die maximale E2-Konzentration beträgt 1×10^{-7} M. Für den schwachen Binder ist die höchste Konzentration zu verwenden, auch für den schwachen Binder auf Platte 1 verwendet wurde. Die IC_{50}-Konzentration wird vom Labor anhand der Datenbank mit historischen Kontrollen des Labors bestimmt. Dieser Wert sollte sich in etwa mit dem in der Validierungsstudie ermittelten Wert decken (siehe Tabelle 1).

Tabelle 4

Anordnung der Mikrotiterplatte für einen Assay zur Untersuchung konkurrierender Bindungen, vollständige Konzentrationskurven für das Referenzöstrogen und die Kontrollen (Platte 1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (nur Lösungsmittel)			TB (nur Lösungsmittel)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1\times10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1\times10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Blindkontrolle (*)		
D	NE ($1\times10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1\times10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1\times10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1\times10^{-7,5}$)			NE ($1\times10^{-8,5}$)		
F	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
G	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
H	Blindkontrolle (für warme Wells) (**)			Blindkontrolle (für warme Wells) (**)			Pufferkontrolle			Pufferkontrolle		

Bei diesem Beispiel wird Norethinodrel (NE) als schwacher Binder verwendet.
(*) Leer, Well nicht verwendet.
(**) Blindkontrolle bei der Inkubation nicht verwendet; Verwendung aber zur Bestätigung der insgesamt zugesetzten Radioaktivität.

Tabelle 5

Anordnung der Mikrotiterplatte für einen Assay zur Untersuchung konkurrierender Bindungen, vollständige Konzentrationskurven für die Prüfchemikalien und die Plattenkontrollen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (nur Lösungsmittel)			TB (nur Lösungsmittel)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
C	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
D	TC2 (1×10^{-3})			TC2 (1×10^{-4})			TC2 (1×10^{-5})			TC2 (1×10^{-6})		
E	TC2 (1×10^{-7})			TC2 (1×10^{-8})			TC2 (1×10^{-9})			TC2 (1×10^{-10})		
F	TC3 (1×10^{-3})			TC3 (1×10^{-4})			TC3 (1×10^{-5})			TC3 (1×10^{-6})		
G	TC3 (1×10^{-7})			TC3 (1×10^{-8})			TC3 (1×10^{-9})			TC3 (1×10^{-10})		
H	NE (IC_{50})			NE ($1\times10^{-4,5}$)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10^{-7})		

Bei diesem Beispiel wird Norethinodrel (NE) als schwacher Binder verwendet.

Abschluss des Assays zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

38. Wie in Tabelle 6 dargestellt, werden 80 µl der Lösungsmittelkontrolle, der Pufferkontrolle, des Referenzöstrogens, des schwachen Binders, des Nicht-Binders und der im Assay-Puffer zubereiteten Prüfchemikalien in die Wells gegeben. Anschließend werden in jeden Well 40 µl einer Lösung mit 4 nM [^{3}H]-17β-Estradiol gegeben. Nach sanftem Drehen über einen Zeitraum von 10-15 Minuten bei Temperaturen zwischen 2 und 8 °C werden 40 µl der hrERα-Lösung hinzugegeben. Die für den Assay verwendeten Mikrotiterplatten werden 16-20 Stunden bei 2-8 °C auf einem Karussell inkubiert.

Tabelle 6

Volumina der Elemente des hrER-Assays zur Ermittlung konkurrierender Bindungen auf den Mikrotiterplatten

Volumen (µl)	Element
80	Nicht markiertes 17β-Estradiol, Norethynodrel, OTES, Prüfchemikalien, Lösungsmittel oder Puffer
40	4 nM [^{3}H]-17β-Estradiol-Lösung
40	hrERα-Lösung, Konzentration wie ermittelt
160	***Gesamtvolumen in den einzelnen Assay-Wells***

39. Nach der Trennung des an den hrERα gebundenen [^{3}H]-17β-Estradiols von dem freien [^{3}H]-17β-Estradiol durch Zugabe von 80 µl kalter DCC-Suspension zu jedem einzelnen Well (wie in den Nummern 20-23 für den Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung beschrieben) wird die Bindung von [^{3}H]-17β-Estradiol an den hrERα quantifiziert.

40. Die Wells H1-6 (in Tabelle 4 als Blindkontrollen (für warme Wells) gekennzeichnet) geben Aufschluss über die Zerfallsereignisse pro Minute (DPM) des markierten [^{3}H]-Estradiols in einer Aliquote von 40 µl. Die Aliquote von 40 µl wird unmittelbar in die Szintillationsflüssigkeit in den Wells H1-H6 gegeben.

Akzeptanzkriterien

Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung

41. Die spezifische Bindungskurve sollte mit zunehmenden Konzentrationen des [^{3}H]-17β-Estradiols (soweit verwendet) ein Plateau erreichen. Dieses Plateau zeigt, dass der hrERα mit dem Liganden gesättigt wurde.

42. Die spezifische Bindung bei 1 nM [^{3}H]-17β-Estradiol sollte im akzeptablen Bereich von 15-25 % des Durchschnitts der insgesamt gemessenen Radioaktivität liegen, um die sich die Radioaktivität in allen Prüfläufen erhöht hat. Gelegentliche geringfügige Über- oder Unterschreitungen dieses Bereichs sind akzeptabel. Wenn Prüfläufe aber durchgängig außerhalb dieses Bereichs liegen bzw. ein bestimmter Prüflauf erheblich außerhalb dieses Bereichs liegt, sollte die Proteinkonzentration angepasst und der Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung wiederholt werden.

43. Aus den Daten sollte sich ein lineares Scatchard-Diagramm ergeben.

44. Die nicht spezifische Bindung sollte nicht überhöht sein. In der Regel sollte der Wert der nicht spezifischen Bindung weniger als 35 % der Gesamtbindung betragen. Diese Grenze kann jedoch in Einzelfällen überschritten werden, wenn bei der niedrigsten Konzentration des geprüften 17β-Estradiols sehr wenige Zerfallsereignisse pro Minute gemessen werden.

Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

45. Zunehmende Konzentrationen nicht markierten 17β-Estradiols sollten [^{3}H]-17β-Estradiol aus dem Rezeptor verdrängen; die Verdrängung sollte im Einklang mit einer konkurrierenden Bindung an einer einzigen Bindungsstelle stehen.

46. Der IC_{50}-Wert des Referenzöstrogens (17β-Estradiol) sollte in etwa mit der molaren Konzentration von [^{3}H]-17β-Estradiol zuzüglich der im Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung berechneten Dissoziationskonstante (K_d) übereinstimmen.

47. Die spezifische Gesamtbindung sollte einheitlich im akzeptablen Bereich von 20 ± 5 % liegen, wenn die gemessene durchschnittliche Konzentration, um die sich die Radioaktivität in jedem einzelnen Well erhöht hat, im Verlauf der Prüfläufe bei 1 nM lag. Gelegentliche geringfügige Über- oder Unterschreitungen dieses Bereichs sind akzeptabel. Wenn Prüfläufe aber durchgängig außerhalb dieses Bereichs liegen bzw. ein bestimmter Prüflauf erheblich außerhalb dieses Bereichs liegt, sollte die Proteinkonzentration angepasst werden.

48. Das Lösungsmittel darf keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit oder die Reproduzierbarkeit des Assays haben. Die Ergebnisse der Lösungsmittelkontrolle werden mit der Pufferkontrolle verglichen, um sicherzustellen, dass das verwendete Lösungsmittel das Assay-System nicht beeinträchtigt. Die Ergebnisse für die Gesamtbindung (TB) und die Pufferkontrolle sollten vergleichbar sein, wenn das Lösungsmittel den Assay nicht beeinflusst.

49. Bei Prüfungen mit bis zu 10^{-3} M (OTES) bzw. 10^{-4} M (DBP) darf der Nicht-Binder nicht mehr als 25 % des [^{3}H]-17β-Estradiols vom hrERα verdrängen.

50. Aufgrund von Daten der Studie zur Validierung des FW-Bindungsassays mit hrER wurden Leistungskriterien für das Referenzöstrogen und zwei schwache Binder (z. B. Norethynodrel und Norethindron) entwickelt (Anhang N in (2)). Für den Mittelwert (n) +/- SD aller Kontrolldurchläufe in den an der Validierungsstudie beteiligten Labors werden 95-%-Konfidenzintervalle angegeben. 95-%-Konfidenzintervalle wurden für die Parameter zur Kurvenanpassung (Höchstwert, Mindestwert, Hillslope und log IC_{50}) für das Referenzöstrogen und für schwache Binder sowie für $\log_{10}$ RBA der schwachen Binder bezogen auf das Referenzöstrogen berechnet. Die Konfidenzintervalle werden als Leistungskriterien für die Positivkontrollen angegeben. Tabelle 1 enthält die erwarteten Spannen der Kurvenanpassungsparameter, die als Leistungskriterien verwendet werden können. In der Praxis kann die IC_{50}-Spanne je nach K_d der Rezeptorzubereitung und der Ligandenkonzentration leicht variieren.

51. In Anbetracht der großen Anzahl potenzieller Prüfchemikalien und der Unterschiede hinsichtlich der potenziellen Affinitäten und Ergebnisse (vollständige Kurve, Teilkurve, keine Kurvenanpassung usw.) wurden keine Leistungskriterien für die Kurvenanpassungsparameter der Prüfchemikalien entwickelt. Die Ergebnisse der einzelnen Prüfläufe sowie die Ergebnisse für die einzelnen Prüfchemikalien sind jedoch einer fachlich qualifizierten Beurteilung zu unterziehen. Um den Höchstwert der Kurve der konkurrierenden Bindungen (z. B. eine Bindungsquote von 90-100 %) eindeutig zu ermitteln, sollte ein ausreichendes Spektrum an Konzentrationen der Prüfchemikalie berücksichtigt werden. Die Variabilität zwischen Wiederholungen bei den einzelnen Konzentrationen der Prüfchemikalie sowie zwischen den drei nicht gleichzeitigen Prüfläufen sollte angemessen und wissenschaftlich vertretbar sein. Die Kontrollen der einzelnen Prüfläufe einer Prüfchemikalie sollten sich im Bereich der Messungen der für diesen FW-Assay angegebenen Leistungen bewegen und mit historischen Kontrolldaten der jeweiligen Labors übereinstimmen.

ANALYSE DER DATEN

Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung

52. Gemessen werden sowohl die Gesamtbindung als auch die nicht spezifische Bindung. Aufgrund dieser Werte wird die spezifische Bindung bei zunehmenden Konzentrationen von [^{3}H]-17β-Estradiol unter Gleichgewichtsbedingungen ermittelt, indem die nicht spezifische Bindung von der Gesamtbindung abgezogen wird. In der grafischen Darstellung der spezifischen Bindung im Vergleich zur Konzentration von [^{3}H]-17β-Estradiol sollte sich bei der maximalen spezifischen Konzentration ein Plateau als Bestätigung für die erfolgte Sättigung des hrERα mit [^{3}H]-17β-Estradiol ergeben. Außerdem sollte in der Analyse der Daten die Bindung des [^{3}H]-17β-Estradiols an eine einzelne Bindungsstelle mit hoher Affinität dokumentiert werden. Die nicht spezifische Bindung, die Gesamtbindung und die spezifische Bindung sind auf einer Sättigungskurve darzustellen. Darüber hinaus sollte eine nicht lineare Regressionsanalyse (z. B. mit BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) vorgenommen werden. Die ermittelten Daten sind in einem endgültigen Scatchard-Diagramm darzustellen.

53. Bei der Analyse sind B_{max} und K_d ausschließlich anhand der Daten zur Gesamtbindung zu ermitteln. Dabei ist von einem linearen Verlauf der nicht spezifischen Bindung auszugehen. Eine anderweitige Vorgehensweise ist zu begründen. Ferner sollte eine robuste Regression zur Ermittlung der Best-Fit-Werte vorgenommen werden, sofern nicht eine Begründung für ein anderweitiges Vorgehen angegeben wird. Die gewählte Methode für die Durchführung der robusten Regression ist anzugeben. Bei der Ermittlung von B_{max} und K_d aufgrund von Daten zur Sättigungsbindung ist immer eine Korrektur aufgrund des Ligandenabbaus vorzunehmen (z. B. nach der Methode von Swillens 1995).

Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

54. Die Kurve zur Darstellung konkurrierender Bindungen wird als spezifische Bindung von [^{3}H]-17β-Estradiol im Vergleich zur Konzentration (log_{10}-Stufen) des Bindungskonkurrenten dargestellt. Die Konzentration der Prüfchemikalie, die die maximale spezifische Bindung von [^{3}H]-17β-Estradiol um 50 % hemmt, wird als IC_{50}-Wert bezeichnet.

55. Schätzungen der log-(IC_{50})-Werte der positiven Kontrollen (z. B. Referenzöstrogen und ein schwacher Binder) sollten mit einer geeigneten Software zur nicht linearen Kurvenanpassung für eine Hill-Gleichung mit 4 Parametern (z. B. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) vorgenommen werden. Die Höchstwerte, die Mindestwerte, die Hillslope-Werte und die log-(IC_{50})-Werte sollten bei der Anpassung dieser Kurven allgemein nicht beschränkt werden. Zur Ermittlung der Best-Fit-Werte sollte eine robuste Regression vorgenommen werden, sofern nicht eine Begründung für ein anderweitiges Vorgehen angegeben wird. Eine Korrektur aufgrund des Ligandenabbaus sollte nicht vorgenommen werden. Nach der Ausgangsanalyse sollte jede einzelne Bindungskurve nochmals geprüft werden, um eine angemessene Anpassung an das Modell sicherzustellen. Die relative Bindungsaffinität (RBA) des schwachen Binders sollte als Prozentanteil von log (IC_{50}) für den schwachen Binder bezogen auf log (IC_{50}) für 17β-Estradiol berechnet werden. Die Ergebnisse der Positivkontrollen und der Nicht-Binder-Kontrolle sind anhand der Kriterien für die Leistungsfähigkeit des Assays (Nummern 45-50 in Anlage 2) zu bewerten.

56. Die Daten aller Prüfchemikalien werden schrittweise analysiert, um eine angemessene Vorgehensweise und eine korrekte Einstufung der einzelnen Kurven zum konkurrierenden Bindungsverhalten sicherzustellen. Für jeden Prüflauf einer Prüfchemikalie sollte zunächst eine standardisierte Datenanalyse nach dem Verfahren vorgenommen werden, das auch zur Analyse der Kontrollen mit dem Referenzöstrogen und dem schwachen Binder durchgeführt wird (Nummer 55). Nach dieser Analyse sollten die Parameter zur Kurvenanpassung fachlich geprüft werden; außerdem sollte geprüft werden, in welchem Umfang die Daten mit der erzeugten Kurve der konkurrierenden Bindungen übereinstimmen. Bei dieser fachlichen Prüfung sind die Feststellung eines konzentrationsabhängigen Rückgangs der prozentualen spezifischen Bindung von [^{3}H]-17β-Estradiol, eine geringe Variabilität der technischen Wiederholungen bei den einzelnen Chemikalienkonzentrationen und die Konsistenz der Anpassungsparameter bei den drei Prüfläufen gute Indikatoren für die ordnungsgemäße Durchführung des Assays und der Datenanalysen.

Datenauswertung

57. Sofern alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, wird eine Prüfchemikalie als Binder für den hrERα betrachtet, wenn eine Bindungskurve angepasst werden kann und der niedrigste Punkt auf der Reaktionskurve im Datenbereich weniger als 50 % beträgt (Abbildung 1).

58. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als Nicht-Binder für den hrERα, wenn die folgenden Bedingungen gegeben sind:

— Eine Bindungskurve kann angepasst werden, und der niedrigste Punkt auf der angepassten Reaktionskurve innerhalb des Datenbereichs liegt über 75 %, oder

— es kann keine Anpassung der Bindungskurve vorgenommen werden, und der niedrigste nicht korrigierte Durchschnittswert der prozentualen Bindung der Konzentrationsgruppen im Datenbereich liegt über 75 %.

59. Prüfchemikalien werden als nicht eindeutig betrachtet, wenn keine der genannten Bedingungen erfüllt ist (z. B. wenn der niedrigste Punkt auf der angepassten Reaktionskurve zwischen 76 und 51 % liegt).

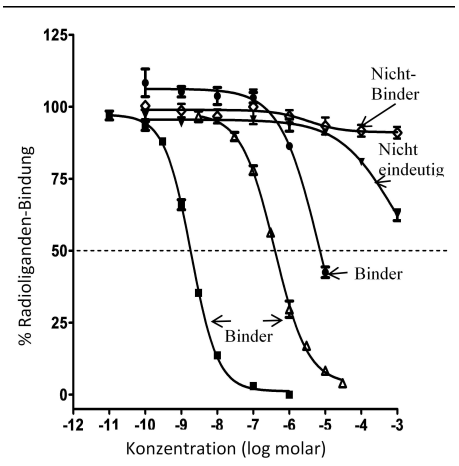
Tabelle 7

Kriterien für eine Einstufung nach der Kurve des konkurrierenden Bindungsverhaltens bei einer Prüfchemikalie

Einstufung	Kriterien
Binder[a]	Eine Bindungskurve kann angepasst werden. **Der niedrigste Punkt auf der Reaktionskurve im Datenbereich liegt bei weniger als 50 %.**
Nicht-Binder [b]	Wenn eine Bindungskurve angepasst werden kann: **Der niedrigste Punkt auf der angepassten Reaktionskurve im Datenbereich liegt über 75 %.** Wenn keine Bindungskurve angepasst werden kann: **Der niedrigste nicht korrigierte Durchschnittswert der prozentualen Bindung der Konzentrationsgruppen im Datenbereich liegt über 75 %.**
Nicht eindeutig[c]	Alle analysierbaren Prüfläufe, bei denen die Prüfchemikalie weder als Binder noch als Nicht-Binder eingestuft wird (beispielsweise wenn der niedrigste Punkt auf der angepassten Reaktionskurve zwischen 76 und 51 % liegt).

Abbildung 1

Beispiele für die Einstufung von Prüfchemikalien anhand der Kurve der konkurrierenden Bindungen



60. Mehrere in einem Labor mit einer Prüfchemikalie durchgeführte Prüfläufe werden unter Zuweisung von numerischen Werten zu den einzelnen Prüfläufen und unter Ermittlung des Durchschnitts der Prüfläufe durchgeführt (siehe Tabelle 8). Die Ergebnisse der kombinierten Prüfläufe in den einzelnen Labors werden mit der erwarteten Einstufung der einzelnen Prüfchemikalien verglichen.

Tabelle 8

Methode zur Einstufung von Prüfchemikalien aufgrund mehrerer Prüfläufe in einem Labor

Zuweisung eines Wertes zu den einzelnen Prüfläufen:	
Einstufung	**Numerischer Wert**
Binder	2
Nicht eindeutig	1
Nicht-Binder	0
Einstufung des durchschnittlichen numerischen Werts für mehrere Prüfläufe:	
Einstufung	**Numerischer Wert**
Binder	Durchschnitt ≥ 1,5
Nicht eindeutig	0,5 ≤ Durchschnitt < 1,5
Nicht-Binder	Durchschnitt ≥ 0,5

PRÜFBERICHT

61. Siehe Nummer 24 im Abschnitt „**ELEMENTE DES hrER-BINDUNGSASSAYS**“ für diese Prüfmethode.

Anlage 2.1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

[^{3}H]E2: 17β-Estradiol mit Tritium radioaktiv markiert.

Assay-Puffer: 10 mM Tris, 10 mg Rinderserumalbumin/ml, 2 mM DTT, 10 % Glycerin, 0,2 mM Leupeptin, pH 7,5.

DCC: Dextranbeschichtete Aktivkohle.

E2: Nicht markiertes 17β-Estradiol (inert).

hrERα: Humaner rekombinanter Östrogenrezeptor alpha.

Prüflauf: Eine vollständige Reihe gleichzeitig zu prüfender Mikrotiterplatten-Wells, denen alle Informationen zu entnehmen sind, die zur Charakterisierung der Bindung einer Prüfchemikalie an den hrERα benötigt werden (d. h. insgesamt zum Well hinzugegebenes [^{3}H]-17β-Estradiol, maximale Bindung von [^{3}H]-17β-Estradiol an den hrERα, nicht spezifische Bindung und Gesamtbindung bei verschiedenen Konzentrationen der Prüfchemikalie). Ein Prüflauf kann bereits aus einem einzigen Well (d. h. einer einzigen Wiederholung) pro Konzentration bestehen. Da nach diesem Protokoll jedoch eine dreifache Untersuchung vorzunehmen ist, umfasst ein Prüflauf drei Wells pro Konzentration. Außerdem sind nach diesem Protokoll drei unabhängige (d. h. nicht gleichzeitige) Prüfläufe pro Chemikalie vorzunehmen.

Wiederholung (Replikat): Eines von mehreren Wells mit denselben Inhalten in denselben Konzentrationen, die in einem einzelnen Prüflauf gleichzeitig untersucht werden. Bei diesem Protokoll wird jede Konzentration der Prüfchemikalie dreimal geprüft, d. h. je Konzentration der Prüfchemikalie werden drei Wiederholungen gleichzeitig untersucht.

Anlage 2.2

TYPISCHER ASSAY ZUR ERMITTLUNG DER SÄTTIGUNGSBINDUNG MIT [^{3}H]-17B-ESTRADIOL MIT DREI REPLIKAT-WELLS

Typischer Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung mit [^{3}H]-17β-Estradiol mit drei Replikat-Wells

Position	Replikat	Well-Typ-Code	Ausgangskonzentration warmes E2 (nM)	Volumen warmes E2 (µl)	Endkonzentration warmes E2 (nM)	Ausgangskonzentration kaltes E2 (µM)	Volumen kaltes E2 (µl)	Ausgangskonzentration kaltes E2 (µM)	Puffer-Volumen (µl)	Rezeptor-Volumen (µl)	Ausgangsvolumen in Wells
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

Typischer Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung mit [^{3}H]-17β-Estradiol mit drei Replikat-Wells											
Position	**Replikat**	**Well-Typ-Code**	**Ausgangskonzentration warmes E2 (nM)**	**Volumen warmes E2 (µl)**	**Endkonzentration warmes E2 (nM)**	**Ausgangskonzentration kaltes E2 (µM)**	**Volumen kaltes E2 (µl)**	**Ausgangskonzentration kaltes E2 (µM)**	**Puffer-Volumen (µl)**	**Rezeptor-Volumen (µl)**	**Ausgangsvolumen in Wells**
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

Typischer Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung mit [^{3}H]-17β-Estradiol mit drei Replikat-Wells											
Position	**Replikat**	**Well-Typ-Code**	**Ausgangskonzentration warmes E2 (nM)**	**Volumen warmes E2 (µl)**	**Endkonzentration warmes E2 (nM)**	**Ausgangskonzentration kaltes E2 (µM)**	**Volumen kaltes E2 (µl)**	**Ausgangskonzentration kaltes E2 (µM)**	**Puffer-Volumen (µl)**	**Rezeptor-Volumen (µl)**	**Ausgangsvolumen in Wells**
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	Warm	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Warm	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Warm	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Warm	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Warm	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Warm	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Warm	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Warm	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Warm	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Warm	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Warm	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Warm	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Warm	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Warm	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Warm	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Warm	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40

Typischer Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung mit [^{3}H]-17β-Estradiol mit drei Replikat-Wells

Position	Replikat	Well-Typ-Code	Ausgangskonzentration warmes E2 (nM)	Volumen warmes E2 (µl)	Endkonzentration warmes E2 (nM)	Ausgangskonzentration kaltes E2 (µM)	Volumen kaltes E2 (µl)	Ausgangskonzentration kaltes E2 (µM)	Puffer-Volumen (µl)	Rezeptor-Volumen (µl)	Ausgangsvolumen in Wells
H5	2	Warm	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Warm	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Warm	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Warm	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Warm	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Warm	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Warm	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Warm	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Die „warmen“ Wells sind bei der Inkubation leer. Die 40 µl werden nur für die Szintillationszählung hinzugegeben.

Anlage 2.3

ANORDNUNG DER WELLS BEIM ASSAY ZUR ERMITTLUNG KONKURRIERENDER BINDUNGEN

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Volumen (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
S	A1	1	Gesamtbindung	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
S	A2	2	Gesamtbindung	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
S	A3	3	Gesamtbindung	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
S	A4	1	Gesamtbindung	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
S	A5	2	Gesamtbindung	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
S	A6	3	Gesamtbindung	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
S	A7	1	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	$2{,}0E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
S	A8	2	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	$2{,}0E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
S	A9	3	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	$2{,}0E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
S	A10	1	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	$2{,}0E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
S	A11	2	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	$2{,}0E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
S	A12	3	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	$2{,}0E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
S	B1	1	kaltes E2	S	S1	$2{,}0E^{-7}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
S	B2	2	kaltes E2	S	S1	$2{,}0E^{-7}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
S	B3	3	kaltes E2	S	S1	$2{,}0E^{-7}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
S	B4	1	kaltes E2	S	S2	$2{,}0E^{-8}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
S	B5	2	kaltes E2	S	S2	$2{,}0E^{-8}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
S	B6	3	kaltes E2	S	S2	$2{,}0E^{-8}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
S	B7	1	kaltes E2	S	S3	$6{,}0E^{-9}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-9}$
S	B8	2	kaltes E2	S	S3	$6{,}0E^{-9}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-9}$
S	B9	3	kaltes E2	S	S3	$6{,}0E^{-9}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-9}$

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Volumen (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
S	B10	1	kaltes E2	S	S4	$2{,}0E^{-9}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
S	B11	2	kaltes E2	S	S4	$2{,}0E^{-9}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
S	B12	3	kaltes E2	S	S4	$2{,}0E^{-9}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
S	C1	1	kaltes E2	S	S5	$6{,}0E^{-10}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-10}$
S	C2	2	kaltes E2	S	S5	$6{,}0E^{-10}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-10}$
S	C3	3	kaltes E2	S	S5	$6{,}0E^{-10}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-10}$
S	C4	1	kaltes E2	S	S6	$2{,}0E^{-10}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-10}$
S	C5	2	kaltes E2	S	S6	$2{,}0E^{-10}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-10}$
S	C6	3	kaltes E2	S	S6	$2{,}0E^{-10}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-10}$
S	C7	1	kaltes E2	S	S7	$2{,}0E^{-11}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-11}$
S	C8	2	kaltes E2	S	S7	$2{,}0E^{-11}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-11}$
S	C9	3	kaltes E2	S	S7	$2{,}0E^{-11}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-11}$
S	C10	1	Blindkontrolle	Blindkontrolle	B1	—	—	160	—	—	160	—
S	C11	2	Blindkontrolle	Blindkontrolle	B2	—	—	160	—	—	160	—
S	C12	3	Blindkontrolle	Blindkontrolle	B3	—	—	160	—	—	160	—
S	D1	1	Norethynodrel	NE	WP1	$6{,}0E^{-5}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-5}$
S	D2	1	Norethynodrel	NE	WP1	$6{,}0E^{-5}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-5}$
S	D3	1	Norethynodrel	NE	WP1	$6{,}0E^{-5}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-5}$
S	D4	1	Norethynodrel	NE	WP2	$2{,}0E^{-5}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-5}$
S	D5	1	Norethynodrel	NE	WP2	$2{,}0E^{-5}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-5}$
S	D6	1	Norethynodrel	NE	WP2	$2{,}0E^{-5}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-5}$

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Volumen (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
S	D7	1	Norethynodrel	NE	WP3	$6{,}0E^{-6}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-6}$
S	D8	1	Norethynodrel	NE	WP3	$6{,}0E^{-6}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-6}$
S	D9	1	Norethynodrel	NE	WP3	$6{,}0E^{-6}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-6}$
S	D10	1	Norethynodrel	NE	WP4	$2{,}0E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
S	D11	1	Norethynodrel	NE	WP4	$2{,}0E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
S	D12	1	Norethynodrel	NE	WP4	$2{,}0E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
S	E1	1	Norethynodrel	NE	WP	$6{,}0E^{-7}$	40		40	80	160	$3{,}0E^{-7}$
S	E2	2	Norethynodrel	NE	WP	$6{,}0E^{-7}$	40		40	80	160	$3{,}0E^{-7}$
S	E3	3	Norethynodrel	NE	WP	$6{,}0E^{-7}$	40		40	80	160	$3{,}0E^{-7}$
S	E4	1	Norethynodrel	NE	WP	$2{,}0E^{-7}$	40		40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
S	E5	2	Norethynodrel	NE	WP	$2{,}0E^{-7}$	40		40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
S	E6	3	Norethynodrel	NE	WP	$2{,}0E^{-7}$	40		40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
S	E7	1	Norethynodrel	NE	WP	$6{,}0E^{-8}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-8}$
S	E8	2	Norethynodrel	NE	WP	$6{,}0E^{-8}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-8}$
S	E9	3	Norethynodrel	NE	WP	$6{,}0E^{-8}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-8}$
S	E10	1	Norethynodrel	NE	WP	$6{,}0E^{-9}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-9}$

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Volumen (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
S	E11	2	Norethynodrel	NE	WP	$6{,}0E^{-9}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-9}$
S	E12	3	Norethynodrel	NE	WP	$6{,}0E^{-9}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-9}$
S	F1	1	OTES	N	OTES	$2{,}0E^{-3}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-3}$
S	F2	2	OTES	N	OTES	$2{,}0E^{-3}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-3}$
S	F3	3	OTES	N	OTES	$2{,}0E^{-3}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-3}$
S	F4	1	OTES	N	OTES	$2{,}0E^{-4}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-4}$
S	F5	2	OTES	N	OTES	$2{,}0E^{-4}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-4}$
S	F6	3	OTES	N	OTES	$2{,}0E^{-4}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-4}$
S	F7	1	OTES	N	OTES	$2{,}0E^{-5}$	40	—	40	80	160	3,0E-5
S	F8	2	OTES	N	OTES	$2{,}0E^{-5}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-5}$
S	F9	3	OTES	N	OTES	$2{,}0E^{-5}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-5}$
S	F10	1	OTES	N	OTES	$2{,}0E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
S	F11	2	OTES	N	OTES	$2{,}0E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
S	F12	3	OTES	N	OTES	$2{,}0E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
S	G1	1	OTES	N	OTES	$2{,}0E^{-7}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-7}$
S	G2	2	OTES	N	OTES	$2{,}0E^{-7}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-7}$
S	G3	3	OTES	N	OTES	$2{,}0E^{-7}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-7}$
S	G4	1	OTES	N	OTES	$2{,}0E^{-8}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
S	G5	2	OTES	N	OTES	$2{,}0E^{-8}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
S	G6	3	OTES	N	OTES	$2{,}0E^{-8}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
S	G7	1	OTES	N	OTES	$2{,}0E^{-9}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Volumen (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
S	G8	2	OTES	N	OTES	$2{,}0E^{-9}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
S	G9	3	OTES	N	OTES	$2{,}0E^{-9}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
S	G10	1	OTES	N	OTES	$2{,}0E^{-10}$	40	—	40	—	160	$1{,}0E^{-10}$
S	G11	2	OTES	N	OTES	$2{,}0E^{-10}$	40	—	40	—	160	$1{,}0E^{-10}$
S	G12	3	OTES	N	OTES	$2{,}0E^{-10}$	40	—	40	—	160	$1{,}0E^{-10}$
S	H1	1	Warm	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H2	1	Warm	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H3	1	Warm	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H4	1	Warm	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H5	1	Warm	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H6	1	Warm	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H7	1	Pufferkontrolle	PK	PK	—	40	80	40	—	160	—
S	H8	1	Pufferkontrolle	PK	PK	—	40	80	40	—	160	—
S	H9	1	Pufferkontrolle	PK	PK	—	40	80	40	—	160	—
S	H10	1	Pufferkontrolle	PK	PK	—	40	80	40	—	160	—
S	H11	1	Pufferkontrolle	PK	PK	—	40	80	40	—	160	—
S	H12	1	Pufferkontrolle	PK	PK	—	40	80	40	—	160	—

Die „warmen“ Wells sind bei der Inkubation leer. Die 40 µl werden nur für die Szintillationszählung hinzugegeben.

Anordnung der Wells beim Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
P1	A1	1	Gesamtbindung	TB	TBB1B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	Gesamtbindung	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	Gesamtbindung	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	Gesamtbindung	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	Gesamtbindung	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	Gesamtbindung	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	$2{,}0E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
P1	A8	2	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	$2{,}0E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
P1	A9	3	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	$2{,}0E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
P1	A10	1	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	$2{,}0E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
P1	A11	2	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	$2{,}0E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
P1	A12	3	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	$2{,}0E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
P1	B1	1	Prüfchemikalie 1	TC1	1	$2{,}0E^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-3}$
P1	B2	2	Prüfchemikalie 1	TC1	1	$2{,}0E^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-3}$
P1	B3	3	Prüfchemikalie 1	TC1	1	$2{,}0E^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-3}$
P1	B4	1	Prüfchemikalie 1	TC1	2	$2{,}0E^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-4}$
P1	B5	2	Prüfchemikalie 1	TC1	2	$2{,}0E^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-4}$
P1	B6	3	Prüfchemikalie 1	TC1	2	$2{,}0E^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-4}$
P1	B7	1	Prüfchemikalie 1	TC1	3	$2{,}0E^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-5}$
P1	B8	2	Prüfchemikalie 1	TC1	3	$2{,}0E^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-5}$
P1	B9	3	Prüfchemikalie 1	TC1	3	$2{,}0E^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-5}$
P1	B10	1	Prüfchemikalie 1	TC1	4	$2{,}0E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
P1	B11	2	Prüfchemikalie 1	TC1	4	$2{,}0E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
P1	B12	3	Prüfchemikalie 1	TC1	4	$2{,}0E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$

Anordnung der Wells beim Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
P1	C1	1	Prüfchemikalie 1	TC1	5	$2{,}0E^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
P1	C2	2	Prüfchemikalie 1	TC1	5	$2{,}0E^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
P1	C3	3	Prüfchemikalie 1	TC1	5	$2{,}0E^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
P1	C4	1	Prüfchemikalie 1	TC1	6	$2{,}0E^{-8}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
P1	C5	2	Prüfchemikalie 1	TC1	6	$2{,}0E^{-8}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
P1	C6	3	Prüfchemikalie 1	TC1	6	$2{,}0E^{-8}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
P1	C7	1	Prüfchemikalie 1	TC1	7	$2{,}0E^{-9}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
P1	C8	2	Prüfchemikalie 1	TC1	7	$2{,}0E^{-9}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
P1	C9	3	Prüfchemikalie 1	TC1	7	$2{,}0E^{-9}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
P1	C10	1	Prüfchemikalie 1	TC1	8	$2{,}0E^{-10}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-10}$
P1	C11	2	Prüfchemikalie 1	TC1	8	$2{,}0E^{-10}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-10}$
P1	C12	3	Prüfchemikalie 1	TC1	8	$2{,}0E^{-10}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-10}$
P1	D1	1	Prüfchemikalie 2	TC2	1	$2{,}0E^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-3}$
P1	D2	2	Prüfchemikalie 2	TC2	1	$2{,}0E^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-3}$
P1	D3	3	Prüfchemikalie 2	TC2	1	$2{,}0E^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-3}$
P1	D4	1	Prüfchemikalie 2	TC2	2	$2{,}0E^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-4}$
P1	D5	2	Prüfchemikalie 2	TC2	2	$2{,}0E^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-4}$
P1	D6	3	Prüfchemikalie 2	TC2	2	$2{,}0E^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-4}$
P1	D7	1	Prüfchemikalie 2	TC2	3	$2{,}0E^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-5}$
P1	D8	2	Prüfchemikalie 2	TC2	3	$2{,}0E^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-5}$
P1	D9	3	Prüfchemikalie 2	TC2	3	$2{,}0E^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-5}$
P1	D10	1	Prüfchemikalie 2	TC2	4	$2{,}0E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
P1	D11	2	Prüfchemikalie 2	TC2	4	$2{,}0E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
P1	D12	3	Prüfchemikalie 2	TC2	4	$2{,}0E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$

Anordnung der Wells beim Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
P1	E1	1	Prüfchemikalie 2	TC2	5	$2{,}0E^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
P1	E2	2	Prüfchemikalie 2	TC2	5	$2{,}0E^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
P1	E3	3	Prüfchemikalie 2	TC2	5	$2{,}0E^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
P1	E4	1	Prüfchemikalie 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
P1	E5	2	Prüfchemikalie 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
P1	E6	3	Prüfchemikalie 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
P1	E7	1	Prüfchemikalie 2	TC2	7	$2{,}0E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
P1	E8	2	Prüfchemikalie 2	TC2	7	$2{,}0E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
P1	E9	3	Prüfchemikalie 2	TC2	7	$2{,}0E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
P1	E10	1	Prüfchemikalie 2	TC2	8	$2{,}0E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-10}$
P1	E11	2	Prüfchemikalie 2	TC2	8	$2{,}0E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-10}$
P1	E12	3	Prüfchemikalie 2	TC2	8	$2{,}0E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-10}$
P1	F1	1	Prüfchemikalie 3	TC3	1	$2{,}0E^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-3}$
P1	F2	2	Prüfchemikalie 3	TC3	1	$2{,}0E^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-3}$
P1	F3	3	Prüfchemikalie 3	TC3	1	$2{,}0E^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-3}$
P1	F4	1	Prüfchemikalie 3	TC3	2	$2{,}0E^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-4}$
P1	F5	2	Prüfchemikalie 3	TC3	2	$2{,}0E^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-4}$
P1	F6	3	Prüfchemikalie 3	TC3	2	$2{,}0E^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-4}$
P1	F7	1	Prüfchemikalie 3	TC3	3	$2{,}0E^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-5}$
P1	F8	2	Prüfchemikalie 3	TC3	3	$2{,}0E^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-5}$
P1	F9	3	Prüfchemikalie 3	TC3	3	$2{,}0E^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-5}$
P1	F10	1	Prüfchemikalie 3	TC3	4	$2{,}0E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
P1	F11	2	Prüfchemikalie 3	TC3	4	$2{,}0E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
P1	F12	3	Prüfchemikalie 3	TC3	4	$2{,}0E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$

Anordnung der Wells beim Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
P1	G1	1	Prüfchemikalie 3	TC3	5	$2{,}0E^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
P1	G2	2	Prüfchemikalie 3	TC3	5	$2{,}0E^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
P1	G3	3	Prüfchemikalie 3	TC3	5	$2{,}0E^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
P1	G4	1	Prüfchemikalie 3	TC3	6	$2{,}0E^{-8}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
P1	G5	2	Prüfchemikalie 3	TC3	6	$2{,}0E^{-8}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
P1	G6	3	Prüfchemikalie 3	TC3	6	$2{,}0E^{-8}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
P1	G7	1	Prüfchemikalie 3	TC3	7	$2{,}0E^{-9}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
P1	G8	2	Prüfchemikalie 3	TC3	7	$2{,}0E^{-9}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
P1	G9	3	Prüfchemikalie 3	TC3	7	$2{,}0E^{-9}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
P1	G10	1	Prüfchemikalie 3	TC3	8	$2{,}0E^{-10}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-10}$
P1	G11	2	Prüfchemikalie 3	TC3	8	$2{,}0E^{-10}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-10}$
P1	G12	3	Prüfchemikalie 3	TC3	8	$2{,}0E^{-10}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-10}$
P1	H1	1	Norethynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	Norethynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	Norethynodrel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	Norethynodrel	NE		1,0E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	Norethynodrel	NE		$1{,}0E^{-4{,}5}$	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	Norethynodrel	NE		$1{,}0E^{-4{,}5}$	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	kaltes E2 S			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	kaltes E2 S			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	kaltes E2 S			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	kaltes E2 S			$1{,}0E^{-7}$	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	kaltes E2 S			$1{,}0E^{-7}$	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	kaltes E2 S			$1{,}0E^{-7}$	40	0	40	80	160	

Anlage 3

DER *IN-VITRO*-ÖSTROGENREZEPTOR-BINDUNGSASSAY DES CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE (CERI) MIT EINEM LIGANDENBINDUNGS-DOMÄNEN-PROTEIN DES HUMANEN REKOMBINANTEN ERA

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

1. Bei diesem *In-vitro*-Assay zur Ermittlung der Sättigung mit dem Östrogenrezeptor ERα und zur Ermittlung konkurrierender Bindungen wird eine Ligandenbindungs-Domäne (LBD) des humanen ERα (hrERα) verwendet. Dieses Proteinmodell wurde vom Chemicals Evaluation Research Institute (CERI), Japan, hergestellt und wird als GST-Fusionsprotein (GST = Glutathion-S-transferase) in *E. coli* exprimiert. Das CERI-Protokoll wurde einer internationalen Validierungsstudie durch mehrere Labors unterzogen (2). Dabei wurden die Relevanz und die Zuverlässigkeit des Protokolls für den vorgesehenen Zweck des Assays nachgewiesen.

2. Der Assay besteht in einem Prüfverfahren zur Ermittlung von Stoffen, die eine Bindung mit dem hrERα eingehen können. Mit dem Assay kann untersucht werden, ob eine Prüfchemikalie mit 17β-Estradiol um Bindungen an die hrERα-LBD konkurrieren kann. Als quantitative Ergebnisse können mit dem Assay u. a. die Werte für IC_{50} (als Maßstab für die zur Verdrängung der Hälfte des [^{3}H]-17β-Estradiols vom hrERα durch eine Prüfchemikalie) und die relative Affinität von Prüfchemikalien für Bindungen an den hrERα im Vergleich zu 17β-Estradiol ermittelt werden. Mit Blick auf die Verwendung zur Prüfung von Chemikalien kann ein akzeptables qualitatives Ergebnis des Assays auch darin bestehen, dass Prüfchemikalien nach ihrer Bindung an den hrERα und nach den genannten Kriterien für die Bindungskurven als Binder, Nicht-Binder oder nicht eindeutig eingestuft werden.

3. Da bei diesem Assay ein radioaktiver Ligand verwendet wird, benötigen die Labors eine Genehmigung für die Verwendung von radioaktivem Material. Bei allen Verfahren unter Verwendung von Radioisotopen und von gefährlichen Chemikalien sind die nach den nationalen Rechtsvorschriften geltenden Bestimmungen und die dort vorgesehenen Verfahren einzuhalten.

4. Vor der Verwendung dieses Assays für rechtliche Zwecke sollten die Abschnitte **„ALLGEMEINE EINLEITUNG“** und **„ELEMENTE DES hrER-BINDUNGSASSAYS“** gelesen werden. Die in dieser Prüfrichtlinie verwendeten Begriffe und Abkürzungen werden in Anlage 1 erläutert.

PRINZIPIEN DES ASSAYS (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

5. Mit dem hrERα-Bindungsassay wird die Fähigkeit eines radioaktiv markierten Liganden ([^{3}H]-17β-Estradiol) gemessen, bei zunehmenden Konzentrationen einer Prüfchemikalie (z. B. eines Bindungskonkurrenten) eine Bindung mit dem ER einzugehen. Prüfchemikalien mit einer starken ER-Affinität konkurrieren mit dem radioaktiv markierten Liganden bei einer niedrigeren Konzentration als Chemikalien mit einer geringeren Affinität für diesen Rezeptor.

6. Dieser Assay beinhaltet zwei wesentliche Elemente: einen Versuch zur Ermittlung von Sättigungsbindungen zur Charakterisierung der Parameter der Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand und einen anschließenden Versuch zur Ermittlung konkurrierender Bindungen, mit dem die Konkurrenz zwischen einer Prüfchemikalie und einem radioaktiv markierten Liganden im Hinblick auf die Bindung an den ER beschrieben wird.

7. Zur Vorbereitung der Prüfung konkurrierender Bindungen soll anhand einer Ermittlung der Sättigungsbindung eine bestimmte Rezeptorcharge hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität geprüft und quantitativ bewertet werden. Mit der Prüfung konkurrierender Bindungen werden unter Gleichgewichtsbedingungen die Affinität einer bestimmten Konzentration des Östrogenrezeptors für seinen natürlichen Liganden (ausgedrückt durch die Dissoziationskonstante K_d) und die Konzentration der aktiven Rezeptor-Bindungsstellen (B_{max}) gemessen.

8. Ferner wird mit der Prüfung konkurrierender Bindungen die Affinität eines Stoffs für Bindungen an den ER im Hinblick auf die Konkurrenz mit [^{3}]17β-Estradiol bewertet. Die Affinität wird anhand der Konzentration der Prüfchemikalie quantifiziert, die unter Gleichgewichtsbedingungen 50 % der spezifischen Bindung von [^{3}]17β-Estradiol („Hemmkonzentration 50 %“ oder IC_{50}) hemmt. Diese Affinität kann auch anhand der relativen Bindungsaffinität (RBA, bezogen auf IC_{50} Estradiol, im selben Prüflauf getrennt gemessen) beurteilt werden. Bei der Prüfung konkurrierender Bindungen wird die Bindung von [^{3}H]-17β-Estradiol in einer bestimmten Konzentration an zahlreiche (acht Größenordnungen) Konzentrationen einer Prüfchemikalie gemessen. Die ermittelten Daten werden dann möglichst entsprechend der Hill-Gleichung (Hill, 1910) angepasst, die die Verdrängung des Radioliganden durch einen für eine bestimmte Bindungsstelle spezifischen konkurrierenden Binder beschreibt. Anhand des Umfangs der Verdrängung des radioaktiv markierten Estradiols bei Gleichgewichtsbedingungen wird die Prüfchemikalie als Binder, Nicht-Binder oder nicht eindeutig eingestuft.

PRÜFVERFAHREN

Nachweis einer akzeptablen Leistungsfähigkeit bei Untersuchungen des hrERα-Proteins

9. Vor der regelmäßigen Durchführung der Assays zur Ermittlung von Sättigungsbindungen und konkurrierenden Bindungen ist jeweils mit einer neuen Charge des hrERα nachzuweisen, dass in dem Labor, in dem der Rezeptor verwendet wird, korrekte Ergebnisse ermittelt werden. Die Leistungsfähigkeit sollte in zwei Schritten nachgewiesen werden:

— Durchführung des [^{3}H]-17β-Estradiol-Bindungsassays zum Nachweis der Spezifität und der Sättigung für den hrERα; anhand einer nicht linearen Regressionsanalyse der ermittelten Daten (z. B. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) und des anschließenden Scatchard-Diagramms sollten die Bindungsaffinität des [^{3}H]-17β-Estradiols (K_d) für den hrERα und die Anzahl der Rezeptoren (B_{max}) einer bestimmten hrERα-Charge dokumentiert werden;

— Durchführung eines Assays zur Prüfung konkurrierender Bindungen mit Kontrollstoffen (Referenzöstrogen (17β-Estradiol), einem schwachen Binder (z. B. Norethynodrel oder Norethindron) und einem Nicht-Binder (Octyltriethoxysilan, OTES). Jedes Labor sollte eine historische Datenbank zum Nachweis der versuchs- und hrERα-Chargenübergreifenden Konsistenz der IC50-Werte und der relevanten Werte aus den Versuchen mit dem Referenzöstrogen und einem schwachen Binder aufbauen. Außerdem sollten die Parameter der Kurven der konkurrierenden Bindungen bei den Kontrollstoffen innerhalb des 95-%-Konfidenzintervalls liegen (siehe Tabelle 1), das anhand von Daten von an der Validierungsstudie zu diesem Assay beteiligten Labors festgelegt wurde (2).

Tabelle 1

Leistungskriterien für das Referenzöstrogen und den schwachen Binder beim hrER-Bindungsassay des CERI

Stoff	Parameter	Mittelwert [a]	Standardabweichung(en)	95-%-Konfidenzintervalle [b]	
				Obere Grenze	Untere Grenze
17β-Estradiol	Höchstwert	104,74	13.12 (70)	101,6	107,9
	Mindestwert	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Hillslope	−1,22	0,20 (70)	−1,27	−1,17
	log IC_{50}	−8,93	0,23 (70)	−8,98	−8,87
Norethynodrel	Höchstwert	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Mindestwert	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hillslope	−1,04	0,21 (68)	−1,09	−0,99
	log IC_{50}	−6,19	0,40 (68)	−6,29	−6,10
Norethindron [c]	Höchstwert	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Mindestwert	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hillslope	−1,18	0,32 (23)	−1,31	−1,04
	log IC_{50}	−6,01	0,54 (23)	−6,25	−5,78

[a] Der Mittelwert ± Standardabweichung (SD) bei der Probengröße n wurde anhand der Parameterschätzungen für die Kurvenanpassung (Hill-Gleichung mit 4 Parametern) für Prüfläufe in vier Labors im Rahmen der Validierungsstudie berechnet (siehe (2) Anlage N).

[b] Das 95-%-Konfidenzintervall dient zur Orientierung für die Akzeptanzkriterien.

[c] In der Validierung war die Prüfung von Norethindron optional für Unteraufgabe 4 vorgesehen (siehe (2), siehe Unteraufgabe 4). Die Mittelwerte ± SD (n) wurden also anhand der Schätzungen für die Kurvenanpassung (Hill-Gleichung mit 4 Parametern) für in zwei Labors durchgeführte Kontrollprüfungen berechnet.
Der Bereich für IC_{50} hängt von der K_d der Rezeptorzubereitung und von der Konzentration des radioaktiv markierten Liganden in den einzelnen Labors ab. Eine geeignete Anpassung des Bereichs für IC_{50} je nach den Bedingungen bei der Durchführung des Assays ist akzeptabel.

Nachweis der Eignung des Labors

10. Siehe Nummern 17 und 18 sowie Tabelle 2 im Abschnitt „**ELEMENTE DES hrER-BINDUNGSASSAYS**“ für diese Prüfmethode. Die Assays (zur Ermittlung von Sättigungsbindungen und konkurrierenden Bindungen) sollten jeweils drei unabhängige Prüfläufe (d. h. mit frischen Rezeptor-, Chemikalien- und Reagenzienverdünnungen) an unterschiedlichen Tagen jeweils mit drei Wiederholungen umfassen.

Ermittlung der Rezeptorkonzentration (hrERα)

11. Die Konzentration des aktiven Rezeptors ist je nach Charge und Lagerungsbedingungen leicht unterschiedlich. Daher sollte die Konzentration des vom Hersteller gelieferten aktiven Rezeptors bestimmt werden. Daraus ergibt sich die geeignete Konzentration des aktiven Rezeptors beim Prüflauf.

12. Unter den Bedingungen bei der konkurrierenden Bindung (d. h. 0,5 nM [^{3}H]-Estradiol) werden Nennkonzentrationen von 0,1, 0,2, 0,4 und 0,6 nM Rezeptor einmal ohne (Gesamtbindung) und einmal mit (nicht spezifische Bindung) 1 µM nicht markiertem Estradiol inkubiert. Die spezifische Bindung wird berechnet als Differenz zwischen der Gesamtbindung und der nicht spezifischen Bindung bezogen auf die Rezeptor-Nennkonzentration in einem Diagramm dargestellt. Die Konzentration des Rezeptors, bei der sich spezifische Bindungswerte entsprechend einem Anteil von 40 % des zugesetzten radioaktiven Liganden ergeben, wird auf die entsprechende Rezeptor-Konzentration bezogen; diese Rezeptorkonzentration ist bei den Versuchen zur Ermittlung von Sättigungsbindungen und konkurrierenden Bindungen zu verwenden. Diese Anforderung wird häufig mit einer hrER-Endkonzentration von 0,2 nM erfüllt.

13. Wenn das 40-%-Kriterium mehrfach nicht erfüllt werden kann, sollte der Versuchsaufbau auf mögliche Fehlerquellen geprüft werden. Dass das 40-%-Kriterium nicht erfüllt werden kann, deutet möglicherweise auch darauf hin, dass die rekombinante Charge den aktiven Rezeptor nur in einem sehr geringen Anteil enthält. In diesem Fall sollte die Verwendung einer anderen Rezeptor-Charge in Betracht gezogen werden.

Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung

14. Acht zunehmende [^{3}H]-17β-Estradiol-Konzentrationen sollten jeweils dreifach unter den drei folgenden Bedingungen geprüft werden (siehe Tabelle 2):

    a. ohne nicht markiertes 17β-Estradiol und mit dem ER, um anhand einer Messung der Radioaktivität der Wells, die ausschließlich [^{3}H]-17β-Estradiol enthalten, die Gesamtbindung zu ermitteln;

    b. bei einer 2000-mal höheren Konzentration des nicht markierten 17β-Estradiols im Vergleich zum markierten 17β-Estradiol und zu Prüfungen mit dem ER; dadurch sollen die aktiven Bindungsstellen mit nicht markiertem 17β-Estradiol gesättigt werden, um anhand einer Messung der Radioaktivität in den Wells die nicht spezifische Bindung zu bestimmen. Verbleibendes warmes Estradiol, das Bindungen mit dem Rezeptor eingehen kann, wird als Bindung an eine nicht spezifischen Bindungsstelle betrachtet, da das kalte Estradiol in einer derart hohen Konzentration vorliegen sollte, dass es an allen verfügbaren spezifischen Bindungsstellen des Rezeptors gebunden ist;

    c. ohne nicht markiertes 17β-Estradiol und ohne den ER (Ermittlung der Gesamt-Radioaktivität).

Zubereitung der Lösungen mit [^{3}H]-17β-Estradiol und mit nicht markiertem 17β-Estradiol und dem hrERα

15. Aus einer Vorratslösung mit 1 µM [^{3}H]-17β-Estradiol in DMSO wird unter Zugabe von DMSO (zur Herstellung von 200 nM) und des Assay-Puffers (zur Herstellung von 40 nM) bei Raumtemperatur eine Lösung mit einer molaren Masse von 40 nM [^{3}H]-17β-Estradiol hergestellt. Mit dieser Lösung mit einer Konzentration von 40 nM werden mit dem Assay-Puffer bei Raumtemperatur serielle Verdünnungen von [^{3}H]-17β-Estradiol im Bereich von 0,313 nM bis 40 nM hergestellt (siehe Zeile 12 in Tabelle 2). Um die endgültigen Assay-Konzentrationen von 0,0313-4,0 nM herzustellen, werden 10 µl dieser Lösungen in die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben (siehe Tabellen 2 und 3). Die Zubereitung des Assay-Puffers, die Berechnung der Ausgangskonzentration der [^{3}H]-17β-Estradiol-Vorratslösung und der Verdünnungen sowie die Bestimmung der Konzentrationen werden im CERI-Protokoll eingehend beschrieben (2).

16. Die nicht markierten 17β-Estradiol-Lösungen werden aus einer 1-nM-17β-Estradiol-Vorratslösung unter Zugabe des Assay-.Puffers so verdünnt, dass sich acht zunehmende Ausgangskonzentrationen von 0,625-80 µM ergeben. Um die endgültigen Assay-Konzentrationen von 0,0625-8 µM herzustellen, werden 10 µl dieser Lösungen in die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte zur Messung nicht spezifischer Bindungen gegeben (siehe Tabellen 2 und 3). Die Zubereitung der nicht markierten 17â-Estradiol-Lösungen wird eingehend im CERI-Protokoll beschrieben (2).

17. Für die Versuche ist die Rezeptorkonzentration zu verwenden, bei der sich eine spezifische Bindung von 40 ± 10 % ergibt (Nummern 12 und 13). Die hrERα-Lösung wird mit eiskaltem Assay-Puffer unmittelbar vor der Verwendung hergestellt, d. h. nachdem alle Wells zur Ermittlung der Gesamtbindung, der nicht spezifischen Bindung und der warmen Liganden vorbereitet wurden.

18. Die 96-Well-Mikrotiterplatten werden mit 2-3 Wiederholungen pro Konzentration des [^{3}H]-17β-Estradiols vorbereitet, wie in Tabelle 2 dargestellt. Die Anordnung der Volumina von [^{3}H]-17β-Estradiol, nicht markiertem 17β-Estradiol, des Puffers und des Rezeptors ist Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 2

Anordnung auf der Mikrotiterplatte beim Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	Zur Messung der TB			Zur Messung der NSB			Zur Ermittlung nur des warmen Liganden				Nicht markierte E2-Verdünnungen für die Plattenreihen 4-6.	[^{3}H]E2-Verdünnungen für die Plattenreihen 1-9
A	0,0313 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0313 nM [^{3}H] E2+ 0,0625 µM E2+ ER			0,0313 nM				0,625 µM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0625 nM [^{3}H] E2+ 0,125 µM E2+ ER			0,0625 nM				1,25 µM	0,625 nM
C	0,125 nM [^{3}H] E2+ ER			0,125 nM [^{3}H] E2+ 0,25 µM E2+ ER			0,125 nM				2,5 µM	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3}H] E2+ ER			0,250 nM [^{3}H] E2+ 0,5 µM E2+ ER			0,250 nM				5 µM	2,5 nM
E	0,50 nM [^{3}H] E2+ ER			0,50 nM [^{3}H] E2+ 1 µM E2+ ER			0,50 nM				10 µM	5 nM
F	1,00 nM [^{3}H] E2+ ER			1,00 nM [^{3}H] E2+ 2 µM E2+ ER			1,00 nM				20 µM	10 nM
G	2,00 nM [^{3}H] E2+ ER			2,00 nM [^{3}H] E2+ 4 µM E2+ ER			2,00 nM				40 µM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H] E2+ ER			4,00 nM [^{3}H] E2+ 8 µM E2+ ER			4,00 nM				80 µM	40 nM

TB- Gesamtbindung
NSB- Nicht spezifische Bindung
[3H] E2- [3H]-17β-Estradiol
E2- nicht markiertes 17β-Estradiol
(*) Die hier angegebenen Konzentrationen sind die Endkonzentrationen in den einzelnen Wells.
(**) Die Verdünnungen von nicht markiertem E2 und [^{3}H]E2 können auf einer anderen Platte hergestellt werden.

Tabelle 3

Volumina der Reagenzien auf der Mikrotiterplatte zur Ermittlung der Sättigungsbindung

Plattenreihe		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Vorbereitungsschritte		TB-Wells			NSB-Wells			Nur warme Liganden		
Volumen der Bestandteile für die genannten Reaktions-Wells und Reihenfolge der Zugabe des …	… Puffers	60 µl			50 µl			90 µl		
	… nicht markierten E2 aus Reihe 11 in Tabelle 2	–			10 µl			–		
	…[^{3}H]E2 aus Reihe 12 in Tabelle 2	10 µl			10 µl			10 µl		
	… hrERα	30 µl			30 µl			–		
Gesamtreaktionsvolumen		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubation		**REAKTION NACH 2-STÜNDIGER INKUBATION**						Quantifizierung der Radioaktivität unmittelbar nach der Vorbereitung Keine Inkubation		
Behandlung mit 0,4 % DCC		**Ja**			**Ja**			**Nein**		
Volumen 0,4 % DCC		100 µl			100 µl			–		
Filtration		Ja			Ja			Nein		
MESSUNG DER DPM										
Quantifizierung des dem Szintillationscocktail zuzusetzenden Volumens		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Wenn zur Messung der DPM ein Flüssigszintillationszähler für Mikroplatten verwendet wird, ist eine Vorbereitung nur des warmen Liganden auf der Assay-Platte, auf der sich auch die Wells zur Bestimmung von TB und NSB befinden, nicht angemessen. Die Wells, die ausschließlich den warmen Liganden enthalten, sind auf einer anderen Platte vorzubereiten.

(**) Wenn die Trennung von der DCC durch Zentrifugieren erfolgt, sind die 50 µl Überstand durch Flüssigszintillationszählung zu messen, um Verunreinigungen der DCC zu vermeiden.

19. Assay-Mikrotiterplatten zur Ermittlung der Gesamtbindung und der nicht spezifischen Bindung werden zwei Stunden bei Raumtemperatur (22-28 °C) inkubiert.

Messung des an den hrERα gebundenen [^{3}H]-17β-Estradiols

20. Nach der 2-stündigen Inkubationszeit wird das an den hrERα gebundene [^{3}H]-17β-Estradiol unter Zugabe von 100 µl einer eiskalten Suspension mit 0,4 % DCC zu den Wells vom freien [^{3}H]-17β-Estradiol getrennt. Danach werden die Platten 10 Minuten auf Eis gelegt. Um das DCC zu entfernen, werden das Reaktionsgemisch und die DCC-Suspension durch Übertragung auf einen Mikrotiterplatten-Filter gefiltert. 100 µl des Filtrats werden zur Szintillationsflüssigkeit in Flüssigszintillationsfläschchen hinzugegeben, um anhand von Flüssigkeitsszintillationszählungen den Abbau pro Minute (DPM) pro Fläschchen zu ermitteln.

21. Wenn kein Mikrotiterplatten-Filter verfügbar ist, kann das DCC auch durch Zentrifugieren entfernt werden. 50 µl des Überstands des an den hrERα gebundenen [^{3}H]-17β-Estradiols sind anschließend mit äußerster Sorgfalt zu entnehmen, damit Verunreinigungen der Wells durch Berührung mit der DCC-Lösung vermieden werden. Der Überstand wird zur Szintillationszählung verwendet.

22. Anhand der Wells, die ausschließlich den warmen Liganden enthalten, wird der Zerfall des zu den Assay-Wells hinzugegebenen [^{3}H]-17β-Estradiols (DPM = Zerfallsereignisse pro Minute) bestimmt. Die Radioaktivität wird erst nach der Zubereitung ermittelt. Die betreffenden Wells werden nicht inkubiert und nicht mit der DCC-Suspension behandelt; ihr Inhalt wird direkt in die Szintillationsflüssigkeit gegeben. Anhand der Zerfallsereignisse pro Minute (DPM) wird so nachgewiesen, wieviel [^{3}H]-17β-Estradiol jeweils in die Wells zur Ermittlung der Gesamtbindung und der nicht spezifischen Bindung gegeben wurde.

Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

23. Mit dem Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen wird die Bindung von [^{3}H]-17β- Estradiol einer einzelnen Konzentration bei zunehmenden Konzentrationen einer Prüfchemikalie gemessen. Bei jedem Prüflauf sind für jede Konzentration drei gleichzeitige Replikate zu verwenden. Außerdem werden für jede zu prüfende Chemikalie drei nicht gleichzeitige Prüfläufe durchgeführt. Der Assay ist auf zwei oder mehr 96-Well-Mikrotiterplatten durchzuführen.

Kontrollen

24. Bei der Durchführung des Assays sind die Lösungsmittelkontrolle und die sonstigen Kontrollen (d. h. die Kontrollen mit dem Referenzöstrogen, dem schwachen Binder und dem Nicht-Binder) gleichzeitig zu prüfen. Bei jedem Prüflauf sollten auf jeweils einer Platte vollständige Konzentrationskurven des Referenzöstrogens und der Kontrollen (d. h. schwache Binder und Nicht-Binder) verwendet werden. Alle anderen Platten sollten Folgendes enthalten: (i) eine hohe Konzentration (maximale Verdrängung, d. h. etwa die Konzentration, bei der der radioaktiv markierte Ligand vollständig verdrängt wird) und eine mittlere Konzentration (etwa IC_{50}) sowohl von E2 als auch des schwachen Binders jeweils dreifach, (ii) eine Lösungsmittelkontrolle und einen nicht spezifischen Binder, ebenfalls jeweils dreifach. Die Verfahren für die Zubereitung des Assay-Puffers, des [^{3}H]-17β-Estradiols, des hrERα und der Prüfchemikalienlösungen werden im CERI-Protokoll eingehend beschrieben (2).

Lösungsmittelkontrolle

25. Die Lösungsmittelkontrolle bestätigt, dass das Lösungsmittel nicht mit dem Prüfsystem reagiert und die Gesamtbindung (TB) misst. Bevorzugtes Lösungsmittel ist DMSO. Wenn die höchste Konzentration der Prüfchemikalie in DMSO nicht löslich ist, kann alternativ Ethanol verwendet werden. Die DMSO-Konzentration in den endgültigen Assay-Wells sollte 2,05 % betragen und kann auf bis zu 2,5 % erhöht werden, wenn sich die Prüfchemikalie nicht löst. DMSO-Konzentrationen über 2,5 % sollten nicht verwendet werden, da der Assay durch höhere Lösungsmittelkonzentrationen beeinträchtigt werden kann. Bei Prüfchemikalien, die in DMSO nicht löslich sind, sich aber in Ethanol lösen, kann der Assay ohne Beeinträchtigungen mit Höchstkonzentrationen von bis zu 2 % Ethanol durchgeführt werden.

Pufferkontrolle

26. Die Pufferkontrolle (PK) darf weder Lösungsmittel noch die Prüfchemikalie, jedoch alle sonstigen im Assay verwendeten Elemente enthalten. Die Ergebnisse der Pufferkontrolle werden mit der Lösungsmittelkontrolle verglichen, um sicherzustellen, dass das verwendete Lösungsmittel das Assay-System nicht beeinträchtigt.

Starker Binder (Referenzöstrogen)

27. 17β-Estradiol (CAS 50-28-2) bindet sich als endogener Ligand mit hoher Affinität an den ER Untertyp alpha. Für jeden hrERα-Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen wird eine Standardkurve mit nicht markiertem 17β-Estradiol erstellt, damit die Variabilität bei Durchführung des Assays in einem Labor im Laufe der Zeit beurteilt werden kann. In DMSO und im Assay-Puffer werden acht Lösungen mit nicht markiertem 17β-Estradiol mit den folgenden Endkonzentrationen in den Assay-Wells für die Erstellung der Standardkurve hergestellt: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10} und 10^{-11} M. Die höchste Konzentration mit nicht markiertem 17β-Estradiol (1 μM) sollte als Indikator für nicht spezifische Bindungen verwendet werden. In Tabelle 4 wird diese Konzentration als „NSB" bezeichnet, obwohl sie Teil der Standardkurve ist.

Schwacher Binder

28. Um die Empfindlichkeit der einzelnen Versuche nachzuweisen und um die Variabilität bei der Durchführung des Assays im Laufe der Zeit beurteilen zu können, sollte ein schwacher Binder (Norethynodrel (CAS68-23-5) oder Norethindron (CAS 68-22-4)) einbezogen werden. In DMSO und im Assay-Puffer werden acht Lösungen des schwachen Binders mit den folgenden Endkonzentrationen hergestellt: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} und 10^{-9} M.

Nicht-Binder

29. Als Negativkontrolle (Nicht-Binder) wird Octyltriethoxysilan (OTES, CAS 2943-75-1) verwendet. Die Negativkontrolle gewährleistet, dass mit dem Assay unter den gegebenen Bedingungen erkannt wird, wenn Prüfchemikalien sich nicht an den hrERα binden. In DMSO und im Assay-Puffer werden acht Lösungen des Nicht-Binders mit den folgenden Endkonzentrationen hergestellt: 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9} und 10^{-10} M. Als alternativer Nicht-Binder kann Di-n-butylphthalat (DBP, CAS 84-72-2) verwendet werden, das allerdings nur bei Konzentrationen bis zu höchstens 10^{-4} M zu prüfen ist. Die maximale Löslichkeit von DBP wurde im Assay bei einer Konzentration von 10^{-4} M festgestellt.

hrERα-Konzentration

30. Für die Versuche ist die Menge des Rezeptors zu verwenden, bei der sich eine spezifische Bindung von 40 ± 10 % ergibt (Nummern 12 und 13 in Anlage 3). Die hrERα-Lösung ist unmittelbar vor der Verwendung durch Verdünnung des funktionalen hrERα in eiskaltem Assay-Puffer herzustellen.

[^{3}H]-17β-Estradiol

31. In den Assay-Wells ist [^{3}H]-17β-Estradiol in einer Endkonzentration von 0,5 nM zu verwenden.

Prüfchemikalien

32. Zunächst muss anhand einer Löslichkeitsprüfung die Löslichkeitsgrenze der einzelnen Prüfchemikalien ermittelt und ein geeigneter Konzentrationsbereich für die Durchführung des Prüfprotokolls bestimmt werden. Die Löslichkeitsgrenze der einzelnen Prüfchemikalien wird zunächst im Lösungsmittel bestimmt und anschließend unter den Bedingungen des Assays bestätigt. Mit dem Assay sind Endkonzentrationen höchstens bis zu 1 mM zu prüfen. Der Vorversuch zur Dosisfindung wird mit einer Lösungsmittelkontrolle und mindestens 8 logarithmischen seriellen Verdünnungen beginnend mit der maximal akzeptierbaren Konzentration (z. B. 1 mM oder weniger, je nach Löslichkeitsgrenze) durchgeführt; dabei ist das Auftreten einer Trübung oder eines Niederschlags zu protokollieren (Nummer 35 in Anlage 3). Nachdem der Konzentrationsbereich für die Prüfungen ermittelt wurde, sollte eine Prüfchemikalie mit 8 im Vorversuch ermittelten logarithmischen Konzentrationen geprüft werden. Die im zweiten und im dritten Versuch geprüften Konzentrationen sind ggf. so anzupassen, dass die Konzentrations-Reaktionskurve ggf. besser charakterisiert wird.

33. Verdünnungen der Prüfchemikalien werden mit dem jeweils geeigneten Lösungsmittel hergestellt (Nummer 25 in Anlage 3). Wenn die höchste Konzentration der Prüfchemikalie weder in DMSO noch in Ethanol löslich ist und die Zugabe von weiterem Lösungsmittel dazu führen würde, dass die Lösungsmittelkonzentration im letzten Röhrchen die Akzeptanzgrenze überschreiten würde, kann die nächstgeringere Konzentration als höchste Konzentration angenommen werden. In diesem Fall kann am unteren Ende der Konzentrationsreihe eine weitere Konzentration eingefügt werden. Die übrigen Konzentrationen der Reihe bleiben unverändert.

34. Die Lösungen mit der Prüfchemikalie werden beim Einbringen in die Assay-Wells sorgfältig beobachtet, da die Prüfchemikalien nach dem Einbringen in die Assay-Wells einen Niederschlag bilden können. Die Daten aller Wells mit einem Niederschlag werden bei der Kurvenanpassung nicht berücksichtigt. Der Grund für den Ausschluss der betreffenden Wells ist zu vermerken.

35. Wenn bereits Informationen aus anderen Quellen mit einem log (IC_{50}) für eine Prüfchemikalie verfügbar sind, können geometrische Verdünnungsstufen enger um den erwarteten log (IC50) (in 0,5 log-Einheiten) angemessen sein. Am Ende sollte ein ausreichender Abstand der Konzentrationen auf beiden Seiten von log (IC_{50}) einschließlich der höchsten und der niedrigsten Konzentration erreicht sein, damit die Bindungskurve angemessen beschrieben werden kann.

Vorbereitung der Assay-Platte

36. Mit Etiketten versehene Mikrotiterplatten werden für sechs Inkubationen für die Lösungsmittelkontrolle, die höchste Konzentration des Referenzöstrogens (E2) (die auch als Indikator für die nicht spezifische Bindung (NSB) dient), die Pufferkontrolle, drei Inkubationen für jede der acht Konzentrationen der Nicht-Binder-Kontrolle (Octyltriethoxysilan), die 7 geringeren Konzentrationen des Referenzöstrogens (E2), die 8 Konzentrationen des schwachen Binders und die 8 Konzentrationen der einzelnen Prüfchemikalien (TC) vorbereitet. Ein Beispiel für die Gestaltung des Plattendiagramms für die vollständigen Konzentrationskurven des Referenzöstrogens und die Kontrollen ist Tabelle 4 zu entnehmen. Für die Prüfchemikalie werden weitere Mikrotiterplatten verwendet; diese Platten sollten Plattenkontrollen, d. h. (i) eine hohe (maximale Verdrängung) und eine mittlere Konzentration (etwa die IC_{50}-Konzentration) von E2 sowie des schwachen Binders (dreifach) und (ii) eine Lösungsmittelkontrolle (als Gesamtbindung) und eine nicht spezifische Bindung (jeweils sechsfach), umfassen (Tabelle 5). Ein Beispiel für die Anordnung auf einer Mikrotiterplatte für einen Assay zur Untersuchung konkurrierender Bindungen mit drei unbekannten Prüfchemikalien ist Anlage 3.3 zu entnehmen. Die auf dem Arbeitsblatt und in den Tabellen 4 und 5 genannten Konzentrationen sind die Endkonzentrationen in den jeweiligen Assay-Wells. Die maximale E2-Konzentration beträgt 1×10^{-7} M. Für den schwachen Binder ist die höchste Konzentration zu verwenden, die auch für den schwachen Binder auf Platte 1 verwendet wurde. Die IC_{50}-Konzentration wird vom Labor anhand der Datenbank mit historischen Kontrollen des Labors bestimmt. Dieser Wert sollte sich in etwa mit dem in der Validierungsstudie ermittelten Wert decken (siehe Tabelle 1).

Tabelle 4

Anordnung der Mikrotiterplatte für einen Assay zur Untersuchung konkurrierender Bindungen [1] [2]**, vollständige Konzentrationskurven für das Referenzöstrogen und die Kontrollen (Platte 1).**

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Pufferkontrolle und Positivkontrolle (E2)			Schwach positiv (Norethynodrel)			Negativkontrolle (OTES)			TB und NSB		
A	Blindkontrolle (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (Lösungsmittelkontrolle) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1\times10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1\times10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1\times10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Pufferkontrolle		
F	E2 ($1\times10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1\times10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Blindkontrolle (für warme Wells) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1\times10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

[1] Probe für die bei jedem Versuch mitzuführende Standard-Mikrotiterplatte.
[2] Diese Mikrotiterplatte wird mit den für die Standards in den vorstehenden Abschnitten beschriebenen Verdünnungen auf der Verdünnungsplatte vorbereitet.
Bei diesem Beispiel wird Norethinodrel (NE) als schwacher Binder verwendet.
(*) Leer, Well nicht verwendet.
(**) Blindkontrolle bei der Inkubation nicht verwendet; Verwendung aber zur Bestätigung der insgesamt zugesetzten Radioaktivität.

Tabelle 5

Anordnung der Mikrotiterplatte für einen Assay zur Untersuchung konkurrierender Bindungen, weitre Platten für Prüfchemikalien (TC) und Plattenkontrollen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Prüfchemikalie 1 (TC-1)			Prüfchemikalie 2 (TC-2)			Prüfchemikalie 3 (TC-3)			Kontrollen		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7}M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E2 (IC_{50})		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1\times10^{-4,5}$)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (Lösungsmittelkontrolle)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

Bei diesem Beispiel wird Norethinodrel (NE) als schwacher Binder verwendet.

Abschluss des Assays zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

37. Mit Ausnahme der Wells zur Ermittlung der Gesamtbindung und zur Prüfung der Blindkontrollen (für warme Wells) (siehe Tabelle 6) sollten in jedes Well 50 µl des Assay-Puffer:s gegeben und mit 10 µl der Lösungsmittelkontrolle, des Referenzöstrogens (E2), des schwachen Binders, des Nicht-Binders und der Prüfchemikalien bzw. mit 10 µl einer 5-nM-[^{3}H]-17β-Estradiollösung gemischt werden. Anschließend werden 30 µl der eiskalten Rezeptorlösung zu den Platten gegeben und vorsichtig gemischt. Als letztes Reagens ist die hrERα-Lösung hinzuzugeben. Die Assay-Mikrotiterplatten sollten 2 Stunden bei Raumtemperatur (22-28 °C) inkubiert werden.

Tabelle 6

Volumina der Elemente des hrER-Assays zur Ermittlung konkurrierender Bindungen auf den Mikrotiterplatten

Vorbereitungsschritte		Wells mit Ausnahme der TB-Wells	TB-Wells	Blindkontrolle (für warme Wells)
Volumen der Bestandteile für die genannten Reaktions-Wells und Reihenfolge der Zugabe des …	Assay-Puffers bei Raumtemperatur	50 µl	60 µl	90 µl
	nicht markierten E2, des schwachen Binders, des Nicht-Binders, des Lösungsmittels und der Prüfchemikalien (*)	10 µl	–	–
	[3H]-17β-Estradiols zur Herstellung einer Endkonzentration von 0,5 nM (d. h. 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	der ermittelten hrERα-Konzentration (Nummern 12 und 13)	30 µl	30 µl	–
Gesamtvolumen in den einzelnen Assay-Wells		100 µl	100 µl	100 µl

(*) Ordnungsgemäß so zubereitet, dass sich eine Endkonzentration im Bereich der akzeptablen Lösungsmittelkonzentration ergibt.

38. Nach der Trennung des an den hrERα gebundenen [^{3}H]-17β-Estradiols von dem freien [^{3}H]-17β-Estradiol durch Zugabe von 100 µl kalter DCC-Suspension zu jedem einzelnen Well wie in den Nummern 21-23 in Anlage 3 für den Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung beschrieben, wird anschließend die Bindung von [^{3}H]-17β-Estradiol an den hrERα quantifiziert.

39. Die Wells G10-12 und H10-12 (in Tabelle 4 als Blindkontrollen (für warme Wells) gekennzeichnet) geben Aufschluss über die Zerfallsereignisse pro Minute (DPM) des markierten [^{3}H]-Estradiols in einer Aliquote von 10 µl. Die Aliquote von 10 µl wird unmittelbar in die Szintillationsflüssigkeit gegeben.

Akzeptanzkriterien

Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung

40. Die spezifische Bindungskurve sollte mit zunehmenden Konzentrationen des [^{3}H]-17β-Estradiols (soweit verwendet) ein Plateau erreichen. Dieses Plateau zeigt, dass der hrERα mit dem Liganden gesättigt wurde.

41. Die spezifische Bindung bei 0,5 nM [H]-17β-Estradiol sollte im akzeptablen Bereich von 30-50 % des Durchschnitts der insgesamt gemessenen Radioaktivität liegen, um die sich die Radioaktivität in allen Prüfläufen erhöht hat. Gelegentliche geringfügige Über- oder Unterschreitungen dieses Bereichs sind akzeptabel. Wenn Prüfläufe aber durchgängig außerhalb dieses Bereichs liegen bzw. wenn ein bestimmter Prüflauf erheblich außerhalb dieses Bereichs liegt, sollte die Proteinkonzentration angepasst und der Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung wiederholt werden.

42. Aus den Daten sollte sich ein lineares Scatchard-Diagramm ergeben.

43. Die nicht spezifische Bindung sollte nicht überhöht sein. In der Regel sollte der Wert der nicht spezifischen Bindung weniger als 35 % der Gesamtbindung betragen. Diese Grenze kann jedoch in Einzelfällen überschritten werden, wenn bei der niedrigsten Konzentration des geprüften 17β-Estradiols sehr wenige Zerfallsereignisse pro Minute gemessen werden.

Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

44. Zunehmende Konzentrationen nicht markierten 17β-Estradiols sollten [^{3}H]-17β-Estradiol aus dem Rezeptor verdrängen; die Verdrängung sollte im Einklang mit einer konkurrierenden Bindung an einer einzigen Bindungsstelle stehen.

45. Der IC_{50}-Wert des Referenzöstrogens (17β-Estradiol) sollte in etwa mit der molaren Konzentration von [^{3}H]-17β-Estradiol zuzüglich der im Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung berechneten Dissoziationskonstante (K_d) übereinstimmen.

46. Die spezifische Gesamtbindung sollte einheitlich im akzeptablen Bereich von 40 ± 10 % liegen, wenn die gemessene durchschnittliche Konzentration, um die sich die Radioaktivität in jedem einzelnen Well erhöht hat, im Verlauf der Prüfläufe bei 0,5 nM lag. Gelegentliche geringfügige Über- oder Unterschreitungen dieses Bereichs sind akzeptabel. Wenn Prüfläufe aber durchgängig außerhalb dieses Bereichs liegen bzw. wenn ein bestimmter Prüflauf erheblich außerhalb dieses Bereichs liegt, sollte die Proteinkonzentration angepasst werden.

47. Das Lösungsmittel darf keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit oder die Reproduzierbarkeit des Assays haben. Die Ergebnisse der Lösungsmittelkontrolle werden mit der Pufferkontrolle verglichen, um sicherzustellen, dass das verwendete Lösungsmittel das Assay-System nicht beeinträchtigt. Die Ergebnisse für die Gesamtbindung (TB) und die Pufferkontrolle sollten vergleichbar sein, wenn das Lösungsmittel den Assay nicht beeinflusst.

48. Bei Prüfungen mit bis zu 10^{-3} M (OTES) bzw. 10^{-4} M (DBP) darf der Nicht-Binder nicht mehr als 25 % des [^{3}H]-17β-Estradiols vom hrERα verdrängen.

49. Aufgrund von Daten der Studie zur Validierung des CERI-Bindungsassays mit hrER wurden Leistungskriterien für das Referenzöstrogen und zwei schwache Binder (z. B. Norethynodrel und Norethindron) entwickelt (Anhang N in (2)). Für den Mittelwert ± SD (n) aller Kontrolldurchläufe in den vier an der Validierungsstudie beteiligten Labors werden 95-%-Konfidenzintervalle angegeben. 95-%-Konfidenzintervalle wurden für die Parameter zur Kurvenanpassung (Höchstwert, Mindestwert, Hillslope und log IC_{50}) für das Referenzöstrogen und für schwache Binder sowie für $\log_{10}$ RBA der schwachen Binder bezogen auf das Referenzöstrogen berechnet. Tabelle 1 enthält die erwarteten Spannen der Kurvenanpassungsparameter, die als Leistungskriterien verwendet werden können. In der Praxis kann die IC_{50}-Spanne je nach der im Versuch ermittelten K_d der Rezeptorzubereitung und der Ligandenkonzentration für den Assay leicht variieren.

50. In Anbetracht der großen Anzahl potenzieller Prüfchemikalien und der Unterschiede hinsichtlich der potenziellen Affinitäten und Ergebnisse (vollständige Kurve, Teilkurve, keine Kurvenanpassung usw.) wurden keine Leistungskriterien für die Kurvenanpassungsparameter der Prüfchemikalien entwickelt. Die Ergebnisse der einzelnen Prüfläufe sowie die Ergebnisse für die einzelnen Prüfchemikalien sind jedoch einer fachlich qualifizierten Beurteilung zu unterziehen. Um den Höchstwert der Kurve der konkurrierenden Bindungen (z. B. eine Bindungsquote von 90-100 %) eindeutig zu ermitteln, sollte ein ausreichendes Spektrum an Konzentrationen der Prüfchemikalie berücksichtigt werden. Die Variabilität zwischen Wiederholungen bei den einzelnen Konzentrationen der Prüfchemikalie sowie zwischen den drei nicht gleichzeitigen Prüfläufen sollte angemessen und wissenschaftlich vertretbar sein. Die Kontrollen der einzelnen Prüfläufe einer Prüfchemikalie sollten sich im Bereich der Messungen der für diesen CERI-Assay angegebenen Leistungen bewegen und mit historischen Kontrolldaten der jeweiligen Labors übereinstimmen.

ANALYSE DER DATEN

Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung

51. Gemessen werden sowohl die Gesamtbindung als auch die nicht spezifische Bindung. Aufgrund dieser Werte wird die spezifische Bindung bei zunehmenden Konzentrationen von [^{3}H]-17β-Estradiol unter Gleichgewichtsbedingungen ermittelt, indem die nicht spezifische Bindung von der Gesamtbindung abgezogen wird. In der grafischen Darstellung der spezifischen Bindung im Vergleich zur Konzentration von [^{3}H]-17β-Estradiol sollte sich bei der maximalen spezifischen Konzentration ein Plateau als Bestätigung für die erfolgte Sättigung des hrERα mit [^{3}H]-17β-Estradiol ergeben. Außerdem sollte in der Analyse der Daten die Bindung des [^{3}H]-17β-Estradiols an eine einzelne Bindungsstelle mit hoher Affinität dokumentiert werden. Die nicht spezifische Bindung, die Gesamtbindung und die spezifische Bindung sind auf einer Sättigungskurve darzustellen. Darüber hinaus sollte eine nicht lineare Regressionsanalyse (z. B. mit BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) vorgenommen werden. Die ermittelten Daten sind in einem endgültigen Scatchard-Diagramm darzustellen.

52. Bei der Analyse sind B_{max} und K_d ausschließlich anhand der Daten zur Gesamtbindung zu ermitteln. Dabei ist von einem linearen Verlauf der nicht spezifischen Bindung auszugehen. Ansonsten ist eine Begründung für eine anderweitige Vorgehensweise anzugeben. Ferner sollte eine robuste Regression zur Ermittlung der Best-Fit-Werte vorgenommen werden, sofern nicht eine Begründung für ein anderweitiges Vorgehen angegeben wird. Die gewählte Methode für die Durchführung der robusten Regression ist anzugeben. Bei der Ermittlung von B_{max} und K_d aufgrund von Daten zur Sättigungsbindung ist immer eine Korrektur aufgrund des Ligandenabbaus vorzunehmen (z. B. nach der Methode von Swillens 1995).

Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

53. Die Kurve zur Darstellung konkurrierender Bindungen wird als spezifische Bindung von [^{3}H]-17β-Estradiol im Vergleich zur Konzentration ($\log_{10}$-Stufen) des Bindungskonkurrenten dargestellt. Die Konzentration der Prüfchemikalie, die die maximale spezifische Bindung von [^{3}H]-17β-Estradiol um 50 % hemmt, wird als IC_{50}-Wert bezeichnet.

54. Schätzungen der log(IC_{50})-Werte der positiven Kontrollen (z. B. Referenzöstrogen und ein schwacher Binder) sollten mit einer geeigneten Software zur nicht linearen Kurvenanpassung für eine Hill-Gleichung mit 4 Parametern (z. B. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) vorgenommen werden. Die Höchstwerte, die Mindestwerte, die Hillslope-Werte und die log(IC_{50})-Werte sollten bei der Anpassung dieser Kurven allgemein nicht beschränkt werden. Zur Ermittlung der Best-Fit-Werte sollte eine robuste Regression vorgenommen werden, sofern nicht eine Begründung für ein anderweitiges Vorgehen angegeben wird. Eine Korrektur aufgrund des Ligandenabbaus sollte nicht vorgenommen werden. Nach der Ausgangsanalyse sollte jede einzelne Bindungskurve nochmals geprüft werden, um eine angemessene Anpassung an das Modell sicherzustellen. Die relative Bindungsaffinität (RBA) des schwachen Binders sollte als Prozentanteil von log (IC_{50}) für den schwachen Binder bezogen auf log (IC_{50}) für 17β-Estradiol berechnet werden. Die Ergebnisse der Positivkontrollen und der Nicht-Binder-Kontrolle sind anhand der Kriterien für die Leistungsfähigkeit des Assays (Nummern 44-49 in Anlage 3) zu bewerten.

55. Die Daten aller Prüfchemikalien werden schrittweise analysiert, um eine angemessene Vorgehensweise und eine korrekte Einstufung der einzelnen Kurven zum konkurrierenden Bindungsverhalten sicherzustellen. Für jeden Prüflauf einer Prüfchemikalie sollte zunächst eine standardisierte Datenanalyse nach dem Verfahren vorgenommen werden, das auch zur Analyse der Kontrollen mit dem Referenzöstrogen und dem schwachen Binder durchgeführt wird (Nummer 54 in Anlage 3). Nach dieser Analyse sollten die Parameter zur Kurvenanpassung fachlich geprüft werden; außerdem sollte geprüft werden, in welchem Umfang die Daten mit der erzeugten Kurve der konkurrierenden Bindungen übereinstimmen. Bei dieser fachlichen Prüfung sind die Feststellung eines konzentrationsabhängigen Rückgangs der prozentualen spezifischen Bindung von [^{3}H]-17β-Estradiol, eine geringe Variabilität der technischen Wiederholungen bei den einzelnen Prüfchemikalienkonzentrationen und die Konsistenz der Anpassungsparameter bei den drei Prüfläufen gute Indikatoren für die ordnungsgemäße Durchführung des Assays und der Datenanalysen.

Datenauswertung

56. Sofern alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, wird eine Prüfchemikalie als Binder für den hrERα betrachtet, wenn eine Bindungskurve angepasst werden kann und der niedrigste Punkt auf der Reaktionskurve im Datenbereich bei weniger als 50 % liegt (Abbildung 1).

57. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als Nicht-Binder für den hrERα, wenn die folgenden Bedingungen gegeben sind:

— Eine Bindungskurve kann angepasst werden, und der niedrigste Punkt auf der angepassten Reaktionskurve innerhalb des Datenbereichs liegt über 75 %, oder

— es kann keine Anpassung der Bindungskurve vorgenommen werden, und der niedrigste nicht korrigierte Durchschnittswert der prozentualen Bindung der Konzentrationsgruppen im Datenbereich liegt über 75 %.

58. Prüfchemikalien werden als nicht eindeutig betrachtet, wenn keine der genannten Bedingungen erfüllt ist (z. B. wenn der niedrigste Punkt auf der angepassten Reaktionskurve zwischen 76 und 51 % liegt).

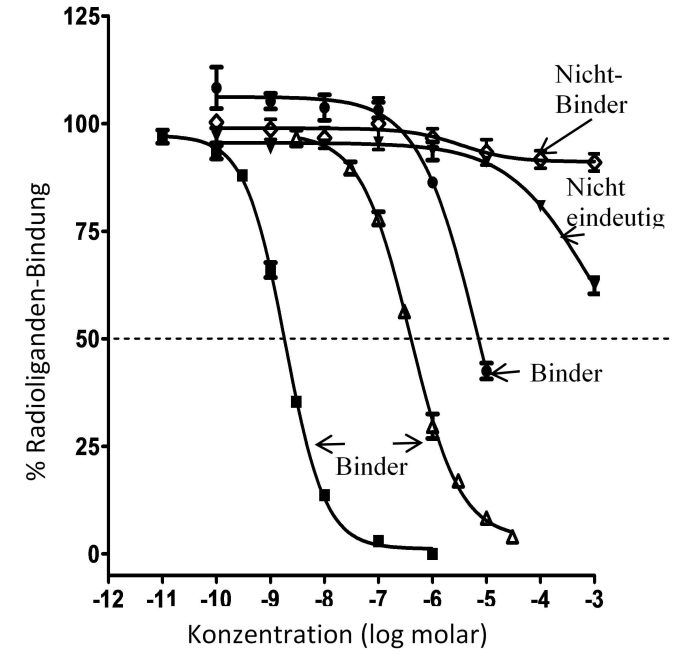
Tabelle 7

Kriterien für eine Einstufung nach der Kurve des konkurrierenden Bindungsverhaltens bei einer Prüfchemikalie

Einstufung	Kriterien
Binder[a]	Eine Bindungskurve kann angepasst werden. **Der niedrigste Punkt auf der Reaktionskurve im Datenbereich liegt bei weniger als 50 %.**
Nicht-Binder [b]	Wenn eine Bindungskurve angepasst werden kann: **Der niedrigste Punkt auf der angepassten Reaktionskurve im Datenbereich liegt über 75 %.** Wenn keine Bindungskurve angepasst werden kann: **Der niedrigste nicht korrigierte Durchschnittswert der prozentualen Bindung der Konzentrationsgruppen im Datenbereich liegt über 75 %.**
Nicht eindeutig[c]	Alle analysierbaren Prüfläufe, bei denen die Prüfchemikalie weder als Binder noch als Nicht-Binder eingestuft wird (beispielsweise wenn der niedrigste Punkt auf der angepassten Reaktionskurve zwischen 76 und 51 % liegt).

Abbildung 1

Beispiele für die Einstufung von Prüfchemikalien anhand der Kurve der konkurrierenden Bindungen



59. Mehrere in einem Labor mit einer Prüfchemikalie durchgeführte Prüfläufe werden unter Zuweisung von nummerischen Werten zu den einzelnen Prüfläufen und unter Ermittlung des Durchschnitts der Prüfläufe durchgeführt (siehe Tabelle 8). Die Ergebnisse der kombinierten Prüfläufe in den einzelnen Labors werden mit der erwarteten Einstufung der einzelnen Prüfchemikalien verglichen.

Tabelle 8

Methode zur Einstufung von Prüfchemikalien aufgrund mehrerer Prüfläufe in einem Labor

Zuweisung eines Wertes zu einem Prüflauf:	
Einstufung	**Numerischer Wert**
Binder	2
Nicht eindeutig	1
Nicht-Binder	0
Einstufung des durchschnittlichen numerischen Werts für mehrere Prüfläufe:	
Einstufung	**Numerischer Wert**
Binder	Durchschnitt ≥ 1,5
Nicht eindeutig	0,5 ≤ Durchschnitt < 1,5
Nicht-Binder	Durchschnitt ≥ 0,5

PRÜFBERICHT

60. Siehe Nummer 24 im Abschnitt „ELEMENTE DES hrER-BINDUNGSASSAYS“ für diese Prüfmethode.

Anlage 3.1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

[^{3}H]E2: 17β-Estradiol mit Tritium radioaktiv markiert.

Assay-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, mit 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM NaVO3, 10 % Glycerin, 0,2 mM Leupeptin, 1 mM Dithiothreitol und 10 mg/ml Rinderseriumalbumin.

DCC: Dextranbeschichtete Aktivkohle.

E2: Nicht markiertes 17β-Estradiol (inert).

hrERα: Humaner rekombinanter Östrogenrezeptor alpha (Lingandenbindungs-Domäne).

Prüflauf: Eine vollständige Reihe gleichzeitig zu prüfender Mikrotiterplatten-Wells, denen alle Informationen zu entnehmen sind, die zur Charakterisierung der Bindung einer Prüfchemikalie an den hrERα benötigt werden (d. h. insgesamt zum Well hinzugegebenes [^{3}H]-17β-Estradiol, maximale Bindung von [^{3}H]-17β-Estradiol an den hrERα, nicht spezifische Bindung und Gesamtbindung bei verschiedenen Konzentrationen der Prüfchemikalie). Ein Prüflauf kann bereits aus einem einzigen Well (d. h. einer einzigen Wiederholung) pro Konzentration bestehen. Da nach diesem Protokoll jedoch eine dreifache Untersuchung vorzunehmen ist, umfasst ein Prüflauf drei Wells pro Konzentration. Außerdem sind nach diesem Protokoll drei unabhängige (d. h. nicht gleichzeitige) Prüfläufe pro Chemikalie vorzunehmen.

Wiederholung (Replikat): Eines von mehreren Wells mit denselben Inhalten in denselben Konzentrationen, die in einem einzelnen Prüflauf gleichzeitig untersucht werden. Bei diesem Protokoll wird jede Konzentration der Prüfchemikalie dreimal geprüft, d. h. je Konzentration der Prüfchemikalie werden drei Wiederholungen gleichzeitig untersucht.

Anlage 3.2

ANORDNUNG DER WELLS BEIM ASSAY ZUR ERMITTLUNG KONKURRIERENDER BINDUNGEN

Platte	**Position**	**Replikat**	**Well-Typ**	**Well-Code**	**Konzentrationscode**	**Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)**	**hrER-Vorratslösung (µl)**	**Puffer-Vol. (µl)**	**Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)**	**Volumen der Verdünnungsplatte (µl)**	**Endvolumen (µl)**	**Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)**
S	A1	1	Blindkontrolle	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Blindkontrolle	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Blindkontrolle	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	kaltes E2	S	S1	$1{,}0E^{-10}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-11}$
S	B2	2	kaltes E2	S	S1	$1{,}0E^{-10}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-11}$
S	B3	3	kaltes E2	S	S1	$1{,}0E^{-10}$	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	kaltes E2	S	S2	$1{,}0E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
S	C2	2	kaltes E2	S	S2	$1{,}0E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
S	C3	3	kaltes E2	S	S2	$1{,}0E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
S	D1	1	kaltes E2	S	S3	$3{,}16E^{-9}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-10}$
S	D2	2	kaltes E2	S	S3	$3{,}16E^{-9}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-10}$

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
S	D3	3	kaltes E2	S	S3	$3{,}16E^{-9}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-10}$
S	E1	1	kaltes E2	S	S4	$1{,}0E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
S	E2	2	kaltes E2	S	S4	$1{,}0E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
S	E3	3	kaltes E2	S	S4	$1{,}0E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
S	F1	1	kaltes E2	S	S5	$3{,}16E^{-8}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-9}$
S	F2	2	kaltes E2	S	S5	$3{,}16E^{-8}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-9}$
S	F3	3	kaltes E2	S	S5	$3{,}16E^{-8}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-9}$
S	G1	1	kaltes E2	S	S6	$1{,}0E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
S	G2	2	kaltes E2	S	S6	$1{,}0E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
S	G3	3	kaltes E2	S	S6	$1{,}0E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
S	H1	1	kaltes E2	S	S7	$1{,}0E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
S	H2	2	kaltes E2	S	S7	$1{,}0E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
S	H3	3	kaltes E2	S	S7	$1{,}0E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
S	A4	1	Norethynodrel	NE	WP1	$1{,}0E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
S	A5	2	Norethynodrel	NE	WP1	$1{,}0E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
S	A6	3	Norethynodrel	NE	WP1	$1{,}0E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
S	B4	1	Norethynodrel	NE	WP2	$1{,}0E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
S	B5	2	Norethynodrel	NE	WP2	$1{,}0E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
S	B6	3	Norethynodrel	NE	WP2	$1{,}0E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
S	C4	1	Norethynodrel	NE	WP3	$3{,}16E^{-7}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-8}$
S	C5	2	Norethynodrel	NE	WP3	$3{,}16E^{-7}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-8}$
S	C6	3	Norethynodrel	NE	WP3	$3{,}16E^{-7}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-8}$
S	D4	1	Norethynodrel	NE	WP4	$1{,}0E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
S	D5	2	Norethynodrel	NE	WP4	$1{,}0E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
S	D6	3	Norethynodrel	NE	WP4	$1{,}0E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
S	E4	1	Norethynodrel	NE	WP5	$3{,}16E^{-6}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-7}$

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
S	E5	2	Norethynodrel	NE	WP5	$3{,}16E^{-6}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-7}$
S	E6	3	Norethynodrel	NE	WP5	$3{,}16E^{-6}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-7}$
S	F4	1	Norethynodrel	NE	WP6	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
S	F5	2	Norethynodrel	NE	WP6	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
S	F6	3	Norethynodrel	NE	WP6	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
S	G4	1	Norethynodrel	NE	WP7	$3{,}16E^{-5}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-6}$
S	G5	2	Norethynodrel	NE	WP7	$3{,}16E^{-5}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-6}$
S	G6	3	Norethynodrel	NE	WP7	$3{,}16E^{-5}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-6}$
S	H4	1	Norethynodrel	NE	WP8	$3{,}16E^{-4}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-5}$
S	H5	2	Norethynodrel	NE	WP8	$3{,}16E^{-4}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-5}$
S	H6	3	Norethynodrel	NE	WP8	$3{,}16E^{-4}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-5}$
S	A7	1	OTES	N	OTES1	$1{,}0E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
S	A8	2	OTES	N	OTES1	$1{,}0E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
S	A9	3	OTES	N	OTES1	$1{,}0E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
S	B7	1	OTES	N	OTES2	$1{,}0E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
S	B8	2	OTES	N	OTES2	$1{,}0E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
S	B9	3	OTES	N	OTES2	$1{,}0E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
S	C7	1	OTES	N	OTES3	$1{,}0E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
S	C8	2	OTES	N	OTES3	$1{,}0E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
S	C9	3	OTES	N	OTES3	$1{,}0E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
S	D7	1	OTES	N	OTES4	$1{,}0E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
S	D8	2	OTES	N	OTES4	$1{,}0E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
S	D9	3	OTES	N	OTES4	$1{,}0E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
S	E7	1	OTES	N	OTES5	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
S	E8	2	OTES	N	OTES5	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
S	E9	3	OTES	N	OTES5	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
S	F7	1	OTES	N	OTES6	$1{,}0E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-5}$
S	F8	2	OTES	N	OTES6	$1{,}0E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-5}$
S	F9	3	OTES	N	OTES6	$1{,}0E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-5}$
S	G7	1	OTES	N	OTES7	$1{,}0E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4}$
S	G8	2	OTES	N	OTES7	$1{,}0E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4}$
S	G9	3	OTES	N	OTES7	$1{,}0E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4}$
S	H7	1	OTES	N	OTES8-DBP7	$1{,}0E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-3}$
S	H8	2	OTES	N	OTES8	$1{,}0E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-3}$
S	H9	3	OTES	N	OTES8	$1{,}0E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-3}$
S	A10	1	Gesamtbindung	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
S	A11	2	Gesamtbindung	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	Gesamtbindung	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	Gesamtbindung	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
S	B11	5	Gesamtbindung	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	Gesamtbindung	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	kaltes E2 (hoch)	NSB	S1	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
S	C11	2	kaltes E2 (hoch)	NSB	S2	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
S	C12	3	kaltes E2 (hoch)	NSB	S3	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
S	D10	4	kaltes E2 (hoch)	NSB	S4	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
S	D11	5	kaltes E2 (hoch)	NSB	S5	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
S	D12	6	kaltes E2 (hoch)	NSB	S6	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
S	E10	1	Pufferkontrolle	PK	PK1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	Pufferkontrolle	PK	PK2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	Pufferkontrolle	PK	PK3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	Pufferkontrolle	PK	PK4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	Pufferkontrolle	PK	PK5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	Pufferkontrolle	PK	PK6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	Blindkontrolle (für warme Wells)	Warm	H1	—	90	—	10	—	100	—

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
S	G11 (*)	2	Blindkontrolle (für warme Wells)	Warm	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	Blindkontrolle (für warme Wells)	Warm	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	Blindkontrolle (für warme Wells)	Warm	H4	—	90	—	10	—	100	—
S	H11 (*)	5	Blindkontrolle (für warme Wells)	Warm	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	Blindkontrolle (für warme Wells)	Warm	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	Unbekannt 1	U1	1	$1{,}0E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
P1	A2	2	Unbekannt 1	U1	1	$1{,}0E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
P1	A3	3	Unbekannt 1	U1	1	$1{,}0E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
P1	B1	1	Unbekannt 1	U1	2	$1{,}0E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
P1	B2	2	Unbekannt 1	U1	2	$1{,}0E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
P1	B3	3	Unbekannt 1	U1	2	$1{,}0E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
P1	C1	1	Unbekannt 1	U1	3	$1{,}0E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
P1	C2	2	Unbekannt 1	U1	3	$1{,}0E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
P1	C3	3	Unbekannt 1	U1	3	$1{,}0E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
P1	D1	1	Unbekannt 1	U1	4	$1{,}0E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
P1	D2	2	Unbekannt 1	U1	4	$1{,}0E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
P1	D3	3	Unbekannt 1	U1	4	$1{,}0E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
P1	E1	1	Unbekannt 1	U1	5	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	E2	2	Unbekannt 1	U1	5	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	E3	3	Unbekannt 1	U1	5	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	F1	1	Unbekannt 1	U1	6	$1{,}0E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-5}$
P1	F2	2	Unbekannt 1	U1	6	$1{,}0E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-5}$
P1	F3	3	Unbekannt 1	U1	6	$1{,}0E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-5}$
P1	G1	1	Unbekannt 1	U1	7	$1{,}0E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4}$
P1	G2	2	Unbekannt 1	U1	7	$1{,}0E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4}$
P1	G3	3	Unbekannt 1	U1	7	$1{,}0E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4}$
P1	H1	1	Unbekannt 1	U1	8	$1{,}0E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-3}$
P1	H2	2	Unbekannt 1	U1	8	$1{,}0E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-3}$

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
P1	H3	3	Unbekannt 1	U1	8	$1{,}0E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-3}$
P1	A4	1	Unbekannt 2	U2	1	$1{,}0E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
P1	A5	2	Unbekannt 2	U2	1	$1{,}0E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
P1	A6	3	Unbekannt 2	U2	1	$1{,}0E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
P1	B4	1	Unbekannt 2	U2	2	$1{,}0E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
P1	B5	2	Unbekannt 2	U2	2	$1{,}0E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
P1	B6	3	Unbekannt 2	U2	2	$1{,}0E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
P1	C4	1	Unbekannt 2	U2	3	$1{,}0E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
P1	C5	2	Unbekannt 2	U2	3	$1{,}0E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
P1	C6	3	Unbekannt 2	U2	3	$1{,}0E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
P1	D4	1	Unbekannt 2	U2	4	$1{,}0E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
P1	D5	2	Unbekannt 2	U2	4	$1{,}0E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
P1	D6	3	Unbekannt 2	U2	4	$1{,}0E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
P1	E4	1	Unbekannt 2	U2	5	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
P1	E5	2	Unbekannt 2	U2	5	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	E6	3	Unbekannt 2	U2	5	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	F4	1	Unbekannt 2	U2	6	$1{,}0E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-5}$
P1	F5	2	Unbekannt 2	U2	6	$1{,}0E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-5}$
P1	F6	3	Unbekannt 2	U2	6	$1{,}0E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-5}$
P1	G4	1	Unbekannt 2	U2	7	$1{,}0E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4}$
P1	G5	2	Unbekannt 2	U2	7	$1{,}0E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4}$
P1	G6	3	Unbekannt 2	U2	7	$1{,}0E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4}$
P1	H4	1	Unbekannt 2	U2	8	$1{,}0E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-3}$
P1	H5	2	Unbekannt 2	U2	8	$1{,}0E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-3}$
P1	H6	3	Unbekannt 2	U2	8	$1{,}0E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-3}$
P1	A7	1	Unbekannt 3	U3	1	$1{,}0E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
P1	A8	2	Unbekannt 3	U3	1	$1{,}0E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
P1	A9	3	Unbekannt 3	U3	1	$1{,}0E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
P1	B7	1	Unbekannt 3	U3	2	$1{,}0E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
P1	B8	2	Unbekannt 3	U3	2	$1{,}0E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
P1	B9	3	Unbekannt 3	U3	2	$1{,}0E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
P1	C7	1	Unbekannt 3	U3	3	$1{,}0E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
P1	C8	2	Unbekannt 3	U3	3	$1{,}0E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
P1	C9	3	Unbekannt 3	U3	3	$1{,}0E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
P1	D7	1	Unbekannt 3	U3	4	$1{,}0E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
P1	D8	2	Unbekannt 3	U3	4	$1{,}0E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
P1	D9	3	Unbekannt 3	U3	4	$1{,}0E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
P1	E7	1	Unbekannt 3	U3	5	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	E8	2	Unbekannt 3	U3	5	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	E9	3	Unbekannt 3	U3	5	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	F7	1	Unbekannt 3	U3	6	$1{,}0E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-5}$
P1	F8	2	Unbekannt 3	U3	6	$1{,}0E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-5}$

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
P1	F9	3	Unbekannt 3	U3	6	$1{,}0E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-5}$
P1	G7	1	Unbekannt 3	U3	7	$1{,}0E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4}$
P1	G8	2	Unbekannt 3	U3	7	$1{,}0E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4}$
P1	G9	3	Unbekannt 3	U3	7	$1{,}0E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4}$
P1	H7	1	Unbekannt 3	U3	8	$1{,}0E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-3}$
P1	H8	2	Unbekannt 3	U3	8	$1{,}0E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-3}$
P1	H9	3	Unbekannt 3	U3	8	$1{,}0E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-3}$
P1	A10	1	Kontrolle E2 (max)	S	$E2_{max}1$	$1{,}0E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
P1	A11	2	Kontrolle E2 (max)	S	$E2_{max}2$	$1{,}0E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
P1	A12	3	Kontrolle E2 (max)	S	$E2_{max}3$	$1{,}0E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
P1	B10	1	Kontrolle E2 (IC_{50})	S	$E2IC_{50}1$	$E2IC_{50}x10$	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	B11	2	Kontrolle E2 (IC_{50})	S	$E2IC_{50}2$	$E2IC_{50}x10$	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	B12	3	Kontrolle E2 (IC_{50})	S	$E2IC_{50}3$	$E2IC_{50}x10$	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
P1	C10	1	Kontrolle NE (max)	S	$Ne_{max}1$	$1{,}0E^{-3{,}5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4{,}5}$
P1	C11	2	Kontrolle NE (max)	S	$Ne_{max}2$	$1{,}0E^{-3{,}5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4{,}5}$
P1	C12	3	Kontrolle NE (max)	S	$Ne_{max}3$	$1{,}0E^{-3{,}5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4{,}5}$
P1	D10	1	Kontrolle NE (IC_{50})	S	$NEIC_{50}1$	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	D11	2	Kontrolle NE (IC_{50})	S	$NEIC_{50}2$	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	D12	3	Kontrolle NE (IC_{50})	S	$NEIC_{50}3$	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	E10	1	kaltes E2 (hoch)	NSB	S1	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	E11	2	kaltes E2 (hoch)	NSB	S2	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	E12	3	kaltes E2 (hoch)	NSB	S3	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	F10	4	kaltes E2 (hoch)	NSB	S4	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	F11	5	kaltes E2 (hoch)	NSB	S5	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	F12	6	kaltes E2 (hoch)	NSB	S6	$1{,}0E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
P1	G10	1	Gesamtbindung	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	Gesamtbindung	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	Gesamtbindung	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
P1	H10	4	Gesamtbindung	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	Gesamtbindung	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	Gesamtbindung	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	–

(*) Die „warmen“ Wells sind bei der Inkubation leer. Die 10 µl werden nur für die Szintillationszählung hinzugegeben.

Anlage 4

HINWEISE ZUR ANALYSE DER DATEN AUS DEM hrER-ASSSAY ZUR ERMITTLUNG KONKURRIERENDER BINDUNGEN

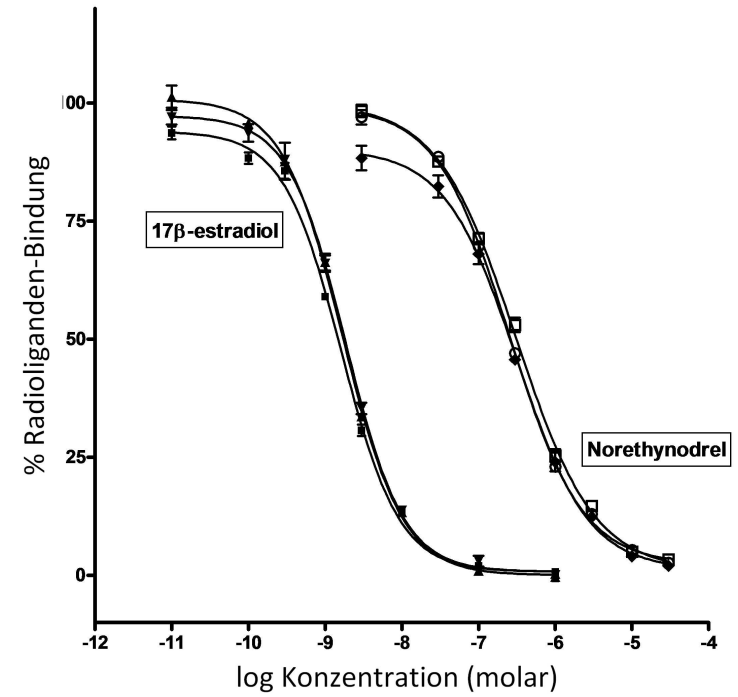
1. Mit dem hrERα-Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen wird die Bindung von [^{3}H]-17β-Estradiol einer einzelnen Konzentration bei zunehmenden Konzentrationen einer Prüfchemikalie gemessen. Die Kurve zur Darstellung konkurrierender Bindungen wird als spezifische Bindung von [^{3}H]-17β-Estradiol im Vergleich zur Konzentration (log_{10}-Stufen) des Bindungskonkurrenten dargestellt. Die Konzentration der Prüfchemikalie, die die maximale spezifische Bindung von [^{3}H]-17β-Estradiol um 50 % hemmt, wird als IC_{50} bezeichnet.

Analyse der Daten zum Referenzöstrogen und zum schwachen Binder (1)

2. Daten aus den Prüfläufen mit den Kontrollen werden für weitere Analysen umgewandelt (prozentuale [^{3}H]-17β-Estradiol-spezifische Bindung und Log-Konzentration der Kontrollchemikalie). Schätzungen der log-(IC_{50})-Werte der positiven Kontrollen (z. B. Referenzöstrogen und ein schwacher Binder) sollten mit einer geeigneten Software zur nicht linearen Kurvenanpassung für eine Hill-Gleichung mit 4 Parametern (z. B. BioSoft; GraphPad Prism) vorgenommen werden (2). Die Höchstwerte, die Mindestwerte, die Hillslope-Werte und die log-(IC50)-Werte brauchen bei der Anpassung dieser Kurven allgemein nicht beschränkt zu werden. Zur Ermittlung der Best-Fit-Werte sollte eine robuste Regression vorgenommen werden, sofern nicht eine Begründung für ein anderweitiges Vorgehen angegeben wird. Die gewählte Methode für die Durchführung der robusten Regression ist anzugeben. Beim FW- und beim CERI-hrER-Assay waren Korrekturen für den Ligandenabbau nicht erforderlich; solche Korrekturen können aber ggf. in Betracht gezogen werden. Nach der Ausgangsanalyse sollte jede einzelne Bindungskurve nochmals geprüft werden, um eine angemessene Anpassung an das Modell sicherzustellen. Die relative Bindungsaffinität (RBA) des schwachen Binders kann als Prozentanteil von log (IC_{50}) für den schwachen Binder bezogen auf log (IC_{50}) für 17β-Estradiol berechnet werden. Die Ergebnisse der Positivkontrollen und der Nicht-Binder-Kontrolle sollten anhand von Parametern für die Leistungsfähigkeit des Assays sowie aufgrund von Akzeptanzkriterien bewertet werden. Im Zusammenhang mit dieser Prüfmethode (Nummer 20), in Anlage 2 (FW-Assay, Nummern 41-51) und in Anlage 3 (CERI-Assay, Nummern 41-51) wurden Beispiele für solche Akzeptanzkriterien genannt. Abbildung 1 enthält Beispiele aus 3 Prüfläufen mit dem Referenzöstrogen und dem schwachen Binder.

Abbildung 1

Beispiele für Kurven konkurrierender Bindungen für das Referenzöstrogen un die Kontrolle mit dem schwachen Binder



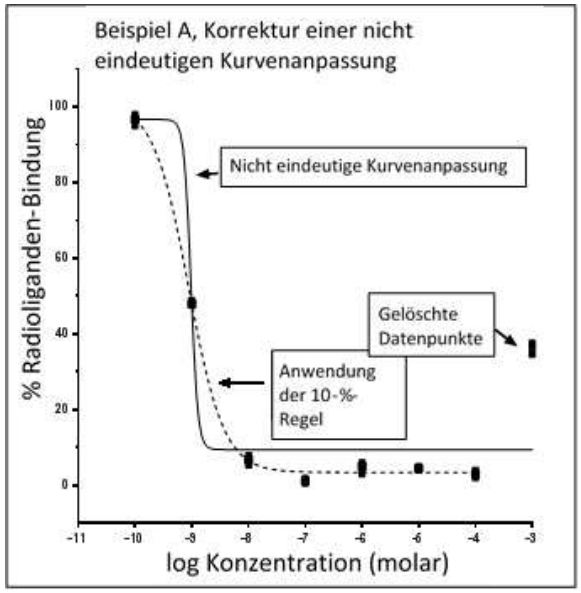
Analyse der Daten zu den Prüfchemikalien

3. Die Daten aller Prüfchemikalien werden schrittweise analysiert, um eine angemessene Vorgehensweise und eine korrekte Einstufung der einzelnen Kurven zum konkurrierenden Bindungsverhalten sicherzustellen. Für jeden Prüflauf einer Prüfchemikalie sollte zunächst eine standardisierte Datenanalyse nach dem Verfahren vorgenommen werden, das auch zur Analyse der Kontrollen mit dem Referenzöstrogen und dem schwachen Binder durchgeführt wird. Nach dieser Analyse sollten die Parameter zur Kurvenanpassung fachlich geprüft werden; außerdem sollte geprüft werden, in welchem Umfang die Daten mit der erzeugten Kurve der konkurrierenden Bindungen übereinstimmen. Bei dieser fachlichen Prüfung sind die Feststellung eines konzentrationsabhängigen Rückgangs der prozentualen spezifischen Bindung von [^{3}H]-17β-Estradiol, eine geringe Variabilität der technischen Wiederholungen bei den einzelnen Chemikalienkonzentrationen und die Konsistenz der Anpassungsparameter bei den drei Prüfläufen gute Indikatoren für die ordnungsgemäße Durchführung des Assays und der Datenanalysen. Die Ergebnisse der einzelnen Prüfläufe mit einer Prüfchemikalie sollten einer fachlichen Bewertung unterzogen werden, und die zur Einstufung der einzelnen Prüfchemikalien als Binder oder als Nicht-Binder verwendeten Daten sollten wissenschaftlich fundiert sein.

4. Gelegentlich liegen möglicherweise Daten vor, die besondere Aufmerksamkeit erfordern, wenn angemessene Analysen und Auswertungen der Daten zu hrER-Bindungen sichergestellt werden sollen. In früheren Studien wurden Fälle festgestellt, in denen die Analyse und die Auswertung von Daten zur Bindung an konkurrierende Rezeptoren durch eine Zunahme der prozentualen spezifischen Bindung bei den höchsten Konzentrationen der betreffenden Prüfchemikalien erschwert werden (Abbildung 2). Dieses Problem ist hinlänglich bekannt und wurde bei der Verwendung von Protokollen für mehrere Assays zur Untersuchung konkurrierender Rezeptorbindungen deutlich (3). In diesen Fällen wird eine konzentrationsabhängige Reaktion bei niedrigeren Konzentrationen festgestellt; wenn sich die Konzentration der Prüfchemikalie jedoch der Löslichkeitsgrenze nähert, nimmt die Verdrängung von [^{3}H]-17β-Estradiol nicht mehr weiter ab. In diesen Fällen deuten die Daten bei den höheren Konzentrationen darauf hin, dass die biologische Grenze des Assays erreicht ist. Häufig hängt dieses Phänomen damit zusammen, dass Chemikalien bei hohen Konzentrationen nicht mehr löslich sind und sich niederschlagen. Außerdem kann dies darauf zurückzuführen sein, dass die Kapazität der dextranbeschichteten Aktivkohle zur Bindung des ungebundenen radioaktiv markierten Liganden während des Trennverfahrens bei den höchsten Chemikalienkonzentrationen überschritten wird. Wenn die betreffenden Datenpunkte bei der Anpassung der Daten zu konkurrierenden Bindungen an eine Sigmoidkurve beibehalten werden, kann es zu Fehleinstufungen des Potenzials der jeweiligen Chemikalien für ER-Bindungen kommen (Abbildung 2). Um dies zu vermeiden, sieht das Protokoll des FW- und des CERI-Bindungsassays mit dem hrER die Möglichkeit vor, Datenpunkte aus den Analysen auszuschließen, bei denen der Mittelwert der Wiederholungen für die prozentuale [^{3}H]-17β-Estradiol-spezifische Bindung um mindestens 10 % über dem Mittelwert bei einer niedrigeren Konzentration liegt. (Diese Regel wird allgemein als 10-%-Regel bezeichnet.) Bei jeder Kurve kann diese Regel nur einmal angewendet werden. Außerdem ist eine Anwendung nur dann möglich, wenn Daten für mindestens 6 weitere Konzentrationen verbleiben, damit die Kurve korrekt eingestuft werden kann.

Abbildung 2

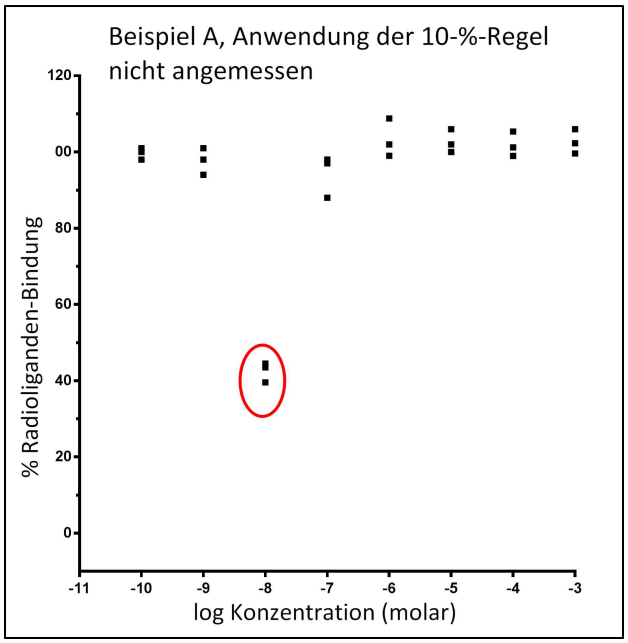
Beispiele für die Kurven konkurrierender Binder mit und ohne Anwendung der 10-%-Regel

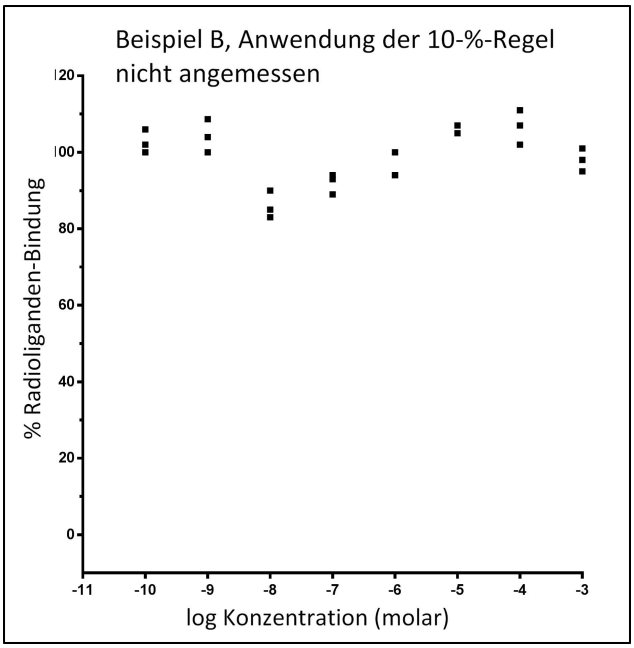


5. Ob es angemessen ist, die 10-%-Regel zur Korrektur dieser Kurven anzuwenden, sollte sorgfältig geprüft werden. Die Anwendung sollte auf die Fälle beschränkt werden, in denen starke Anhaltspunkte für das Vorliegen eines hrER-Binders vorliegen. Bei der Durchführung von Versuchen für die Studie zur Validierung des FW-hrER-Bindungsassays wurde festgestellt, dass die 10-%-Regel manchmal nicht beabsichtigte und unvorhergesehene Folgen hatte. Chemikalien, bei denen keine Wechselwirkung mit dem Rezeptor auftrat (d. h. echte Nicht-Binder), zeigten häufig eine Variabilität von mehr als 10 % über das Spektrum der geprüften Konzentrationen, wenn der Wert der Radioliganden-Bindung bei nahe 100 % lag. Wenn der niedrigste Wert bei einer niedrigen Konzentration auftrat, konnten nach der 10-%-Regel die Daten aller höheren Konzentrationen aus der Analyse möglicherweise gelöscht werden. Allerdings konnten die Daten auch dieser Konzentrationen hilfreich für die Einstufung der betreffenden Chemikalie als Nicht-Binder sein. Abbildung 3 enthält Beispiele, bei denen die Anwendung der 10-%-Regel nicht angemessen wäre.

Abbildung 3

Beispiele für Daten konkurrierender Binder, bei denen eine Anwendung der 10-%-Regel nicht angemessen wäre





LITERATUR

(1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation für Wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

(2) Motulsky, H., und 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, S. 187-191. www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf.

(3) Laws, S.C., Yavanhxay, S., Cooper, R.L., Eldridge, J.C. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.

B.71 *IN-VITRO*-TESTS ZUR SENSIBILISIERUNG DER HAUT IN BEZUG AUF DEN SCHLÜSSELVORGANG DER AKTIVIERUNG VON DENDRITISCHEN ZELLEN AUF DEM ADVERSE OUTCOME PATHWAY (AOP) FÜR DIE SENSIBILISIERUNG DER HAUT

ALLGEMEINE EINLEITUNG

Prüfmethode auf der Grundlage des Schlüsselvorgangs der Aktivierung von dendritischen Zellen

1. Ein Hautallergen ist gemäß Definition des Globalen Harmonisierten Systems zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien (GHS) der Vereinten Nationen (UN-GHS) (1) und der Verordnung (EU) Nr. 1272/2008 der Europäischen Union über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (CLP) ([1]) ein Stoff, der bei Hautkontakt eine allergische Reaktion auslöst. Über die biologischen Schlüsselvorgänge, die der Sensibilisierung der Haut zugrunde liegen, besteht allgemeines Einvernehmen. Das derzeitige Wissen über die chemischen und biologischen Mechanismen im Zusammenhang mit der Hautsensibilisierung wurde in Form eines Adverse Outcome Pathway (AOP) unter dem OECD-AOP-Programm (2), ausgehend von dem auslösenden molekularen Ereignis über die Zwischenvorgänge bis hin zur schädlichen Auswirkung auf die Gesundheit, nämlich die allergische Kontaktdermatitis, zusammengefasst. In diesem Fall ist das auslösende molekulare Ereignis (d. h. der erste Schlüsselvorgang) die kovalente Bindung von elektrophilen Stoffen an nukleophile Zentren in Hautproteinen. Der zweite Schlüsselvorgang in diesem AOP findet in den Keratinozyten statt und umfasst entzündliche Reaktionen sowie Änderungen der Genexpression in Verbindung mit spezifischen Zellsignalketten wie beispielsweise ARE (Antioxidant/Electrophile Response Element)-abhängigen Ketten. Der dritte Schlüsselvorgang ist die Aktivierung von dendritischen Zellen (DC), die normalerweise durch Expression von spezifischen Zelloberflächenmarkern, Chemokinen und Cytokinen bewertet werden. Der vierte Schlüsselvorgang ist die T–Zellaktivierung und -proliferation, die indirekt im Lokalen Lymphknotentest (LLNA) an der Maus (3) bewertet wird.

2. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 442E (2017). Sie beschreibt die In-vitro-Tests in Bezug auf Mechanismen im Rahmen des Schlüsselvorgangs der Aktivierung von dendritischen Zellen des AOP für die Sensibilisierung der Haut (2). Die Testmethode umfasst Tests, die zur Unterstützung der Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren gemäß UN-GHS und CLP durchgeführt werden.

   Die in dieser Prüfmethode beschriebenen Tests umfassen:

   — Aktivierungstest mit humanen Zelllinien (h-CLAT)

   — U937 Aktivierungstest mit Zelllinien (U-SENS™)

   — Interleukin-8 Reportergen-Test (IL-8 Luc-Test)

3. Die Tests in dieser Prüfmethode und die entsprechenden OECD-TG können sich in Bezug auf das Verfahren zur Erzeugung der Daten und der gemessenen Werte unterscheiden, können aber gleichermaßen verwendet werden, um die länderspezifischen Anforderungen an die Prüfergebnisse des Schlüsselvorgangs zur Aktivierung dendritischer Zellen des AOP für die Hautsensibilisierung zu erfüllen; zugleich findet die gegenseitige Anerkennung der Daten gemäß dem OECD-Übereinkommen auf sie Anwendung.

([1]) Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

Hintergrund und Prinzipien der Tests, die in der auf den Schlüsselvorgang gestützten Prüfmethode enthalten sind

4. Die Bewertung der Hautsensibilisierung erfolgte normalerweise an Labortieren. Bei den klassischen Methoden an Meerschweinchen, dem Maximierungstest an Meerschweinchen (Guinea Pig Maximisation Test, GPMT) nach Magnusson/Kligman und dem Bühler-Test (Prüfmethode B.6) (4), werden die Induktions- und die Auslösephase der Hautsensibilisierung bewertet. Ein Test an der Maus, der Lokale Lymphknotentest (LLNA, Prüfmethode B.42) (3) und die beiden nicht radioaktiven Abwandlungen dieser Tests, LLNA: DelR (Prüfmethode B.50) (5) und LLNA: BrdU-ELISA (Prüfmethode B.51) (6), bei denen jeweils nur die Induktionsreaktion bewertet wird, haben ebenfalls an Akzeptanz gewonnen, da sie sowohl in Bezug auf den Tierschutz als auch die objektive Messung der Induktionsphase der Hautsensibilisierung Vorteile gegenüber Tests am Meerschweinchen bieten.

5. Kürzlich wurden mechanistisch basierte In-chemico- und In-vitro-Prüfmethoden in Bezug auf den ersten Schlüsselvorgang (Prüfmethode B.59; Direkt-Peptidreaktivitätstest (7)) und den zweiten Schlüsselvorgang (Prüfmethode B.60; ARE-Nrf2 Luciferase-Prüfmethode (8)) des Hautsensibilisierungs-AOP als Beitrag zur Bewertung des Gefahrenpotenzials für die Hautsensibilisierung von Chemikalien eingeführt.

6. Die in dieser Prüfmethode beschriebenen Tests quantifizieren entweder die Änderung der Expression von Zelloberflächenmarkern im Zusammenhang mit dem Aktivierungsprozess von Monozyten und dendritischen Zellen (DC) nach Exposition gegenüber Allergenen (z. B. CD54, CD86) oder die Änderungen der IL-8-Expression, einem Zytokin in Verbindung mit der Aktivierung von DC. Es wurde berichtet, dass Hautallergene die Expression von Zellmembranmarkern wie CD40, CD54, CD80, CD83 und CD86 zusätzlich zur Induktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1β und TNF-α und mehreren Chemokine wie IL-8 (CXCL8) und CCL3 (9) (10) (11) (12) im Zusammenhang mit der DC-Aktivierung induzieren (2).

7. Da die DC-Aktivierung jedoch nur einen einzigen Schlüsselvorgang des Hautsensibilisierungs-AOP darstellt (2) (13), reichen Informationen, die mit Tests erzeugt werden, die nur Marker der DC-Aktivierung messen, möglicherweise nicht aus, um auf das Vorhandensein oder Fehlen eines Hautsensibilisierungspotenzials von Chemikalien zu schließen. Daher sollten die mit dieser Prüfmethode ermittelten Daten zur Unterstützung der Unterscheidung zwischen Hautallergenen (d. h. UN-GHS/CLP Kategorie 1) und Nichtsensibilisatoren im Rahmen integrierter Ansätze (IATA) eingesetzt und mit anderen ergänzenden Informationen, die beispielsweise aus In-vitro-Tests in Bezug auf andere Schlüsselvorgänge des Hautsensibilisierungs-AOP abgeleitet werden, sowie mit anderen Nicht-Prüfmethoden, einschließlich der Übertragung von Informationen (read across) zu chemischen Analoga (13), kombiniert werden. Beispiele zur Verwendung von Daten, die mit diesen Tests im Rahmen definierter Ansätze erzeugt wurden, d. h. standardisierter Ansätze sowohl in Bezug auf den Satz der verwendeten Informationsquellen als auch in Bezug auf das Verfahren zur Ableitung von Vorhersagen, wurden veröffentlicht (13) und können innerhalb des IATA als nützliche Elemente verwendet werden.

8. Die in dieser Prüfmethode beschriebenen Tests können alleine weder zur Einstufung von Hautallergenen in die Unterkategorien 1A und 1B gemäß Definition in UN-GHS/CLP (für Behörden, die diese zwei optionalen Unterkategorien einführen), noch zur Vorhersage des Potenzials im Rahmen von Sicherheitsbewertungsentscheidungen verwendet werden. Jedoch können mithilfe dieser Methoden erzeugte positive Ergebnisse je nach Rechtsrahmen alleine zur Einstufung einer Chemikalie in die UN-GHS/CLP-Kategorie 1 herangezogen werden.

9. Der Begriff „Prüfchemikalie" bezeichnet bei dieser Prüfmethode das, was getestet ([1]) wird, und bezieht sich nicht auf die Anwendbarkeit der Tests zur Prüfung von einkomponentigen Stoffen, mehrkomponentigen Stoffen und/oder Gemischen. Gegenwärtig stehen nur begrenzte Informationen über die Anwendbarkeit der Tests für mehrkomponentige Stoffe/Gemische zur Verfügung (14) (15). Die Tests sind dennoch für die Prüfung von mehrkomponentigen Stoffen und Gemischen technisch geeignet. Bevor diese Prüfmethode jedoch an einem Gemisch für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regulierungszweck verwendet wird, sollte geprüft werden, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefert, und wenn dem so ist, warum. ([2]) Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs gesetzlich vorgeschrieben ist. Zudem sollte bei mehrkomponentigen Stoffen oder Gemischen die mögliche Interferenz der zytotoxischen Komponenten mit den beobachteten Reaktionen beachtet werden.

([1]) Im Juni 2013 einigte sich die Gemeinsame Tagung der OECD darauf, dass nach Möglichkeit eine einheitlichere Verwendung des Begriffs „Prüfchemikalie" – der beschreibt, was geprüft wird – in neuen und aktualisierten OECD-Prüfleitlinien verwendet werden sollte.

([2]) Dieser Satz wurde in der April 2014 WNT-Sitzung vorgeschlagen und vereinbart.

LITERATURHINWEISE

(1) Vereinte Nationen (UN) (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sechste überarbeitete Auflage. New York und Genf: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Verfügbar unter: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. Verfügbar unter:http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En.

(3) Kapitel B.42 in diesem Anhang: Lokaler Lymphknotentest.

(4) Kapitel B.6 in diesem Anhang: Sensibilisierung der Haut.

(5) Kapitel B.50 in diesem Anhang: Sensibilisierung der Haut: Lokaler Lymphknotentest: DA.

(6) Kapitel B.51 in diesem Anhang: Sensibilisierung der Haut: Lokaler Lymphknotentest: BrdU-ELISA.

(7) Kapitel B.59 in diesem Anhang: In-chemico-Hautsensibilisierung: Direkt-Peptidreaktivitätstest (DPRA).

(8) Kapitel B.60 in diesem Anhang: In-vitro-Hautsensibilisierung: ARE-Nrf2 Luciferase-Prüfmethode.

(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. und 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. und 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. und Tagami, H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and DNCB. J Invest Dermatol 120:390–8.

(13) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Verfügbar unter: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.

Anlage 1

IN-VITRO-HAUTSENSIBILISIERUNG: AKTIVIERUNGSTEST MIT HUMANEN ZELLLINIEN (H-CLAT)

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

1. Der h-CLAT quantifiziert die Änderungen der Expression von Zelloberflächenmarkern in Zusammenhang mit dem Aktivierungsprozess von Monozyten und dendritischen Zellen (DC) (d. h. CD86 und CD54) in der humanen monozytischen Leukämie-Zelllinie THP-1 nach Exposition gegenüber Allergenen (1)(2). Die gemessenen Expressionswerte der Zelloberflächenmarker CD86 und CD54 werden dann zur Unterstützung der Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren verwendet.

2. Der h-CLAT wurde in einer Validierungsstudie unter der Leitung eines Europäischen Referenzlabors für Alternativen zu Tierversuchen (EURL ECVAM) und in einer anschließenden unabhängigen Peer-Review des Wissenschaftlich Beratenden Ausschusses (ESAC) des EURL ECVAM bewertet. Unter Berücksichtigung sämtlicher verfügbarer Nachweise und Informationen von Regulierungsbehörden und Interessengruppen wurde der h-CLAT von EURL ECVAM (3) empfohlen, um im Rahmen eines IATA die Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilatoren im Hinblick auf die Gefahreneinstufung und -kennzeichnung zu unterstützen. Beispiele für die Verwendung von h-CLAT-Daten in Kombination mit anderen Informationen werden in der Literatur beschrieben (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).

3. Der h-CLAT erwies sich als übertragbar auf Labore mit Erfahrung auf dem Gebiet der Zellkulturtechniken und der Flusszytometrieanalyse. Der Grad der Reproduzierbarkeit, der bei den Tests erwartet werden kann, liegt in der Größenordnung von 80 % innerhalb von und zwischen Labors (3)(12). Die in der Validierungsstudie (13) und anderen veröffentlichten Studien (14) erzeugten Ergebnisse deuten insgesamt darauf hin, dass die Genauigkeit bei der Unterscheidung zwischen Hautallergenen (d. h. UN-GHS/CLP Kat.1) und Nichtsensibilisatoren im Vergleich zu den LLNA-Ergebnissen bei 85 % (N = 142) mit einer Empfindlichkeit von 93 % (94/101) und einer Spezifität von 66 % (27/41) liegt (gestützt auf eine erneute Analyse durch EURL ECVAM (12), wobei alle bestehenden Daten berücksichtigt und alle negativen Ergebnisse für Chemikalien mit log KOW von mehr als 3,5 wie in Abschnitt 4 beschrieben nicht berücksichtigt wurden). Bei falsch-negativen Vorhersagen mit dem h-CLAT ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass Chemikalien mit geringer bis mittlerer Hautsensibilisierungspotenz betroffen sind (d. h. UN-GHS/CLP-Unterkategorie 1B), als Chemikalien mit hoher Hautsensibilisierungspotenz (d. h. UN-GHS/CLP-Unterkategorie 1A) (4)(13)(15). Insgesamt deuten diese Informationen auf die Zweckmäßigkeit der h-CLAT-Methode für die Erkennung der Gefahr einer Hautsensibilisierung hin. Jedoch sind die Genauigkeitswerte, die hier für den h-CLAT als eigenständiger Tests angegeben werden, lediglich als Anhaltspunkte zu betrachten, da der Test in Kombination mit anderen Informationsquellen im Rahmen eines IATA sowie gemäß den Bestimmungen unter Nummer 7 und 8 der Allgemeinen Einleitung betrachtet werden sollte. Darüber hinaus sollte bei der Bewertung von Prüfmethoden zur Hautsensibilisierung ohne Tierversuche beachtet werden, dass der LLNA-Test sowie andere Tierversuche die Situation bei Menschen nicht vollständig widerspiegeln.

4. Auf der Grundlage der gegenwärtig verfügbaren Daten über die h-CLAT-Methode wurde nachgewiesen, dass der Test bei Prüfchemikalien, die eine Vielzahl an organischen Funktionsgruppen, Reaktionsmechanismen, Hautsensibilisierungspotenzialen (wie in In-vivo-Studien festgestellt) und physikalisch-chemischen Eigenschaften abdecken, anwendbar ist (3)(14)(15). Die h-CLAT-Methode ist anwendbar bei Prüfchemikalien, die löslich sind oder eine stabile Dispersion (d. h. ein Kolloid oder eine Suspension, in denen die Prüfchemikalie sich nicht absetzt oder sich vom Lösungsmittel/Vehikel in verschiedene Phasen trennt) in einem geeigneten Lösungsmittel/Vehikel bilden (siehe Abschnitt 14). Prüfchemikalien mit einem log Kow von mehr als 3,5 tendieren dazu, falsch negative Ergebnisse hervorzurufen (14). Deshalb sollten negative Ergebnisse bei Prüfchemikalien mit einem log Kow von mehr als 3,5 nicht berücksichtigt werden. Positive Ergebnisse für Prüfchemikalien mit einem log Kow von mehr als 3,5 könnten jedoch noch verwendet werden, um die Identifizierung der Prüfchemikalie als Hautallergen zu unterstützen. Außerdem können Prohaptene (d. h. Stoffe, die beispielsweise über P450-Enzyme aktiviert werden müssen) und Prähaptene (d. h. Stoffe, die durch Oxidation aktiviert werden) aufgrund der begrenzten Stoffwechselfähigkeit der verwendeten Zelllinie (16) sowie der Versuchsbedingungen, insbesondere bei geringer Oxidationsgeschwindigkeit, zu negativen Ergebnissen des h-CLAT (15) führen. Fluoreszierende Prüfchemikalien können mit h-CLAT (17) bewertet werden; dennoch beeinträchtigen stark fluoreszierende Prüfchemikalien, die mit derselben Wellenlänge ausstrahlen wie Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) oder Propidiumjodid (PI), den Nachweis mittels Durchflusszytometrie und können daher nicht korrekt mithilfe von mit FITC-konjugierten Antikörpern oder PI bewertet werden. In einem solchen Fall können andere mit Fluorochrom markierte Antikörper bzw. andere Zytotoxizitätsmarker verwendet werden, solange aufgezeigt werden kann, dass sie ähnliche Ergebnisse liefern wie die mit FITC markierten Antikörper (siehe Abschnitt 24) oder PI (siehe Abschnitt 18), z. B. durch Testen der Leistungsstoffe in Anlage 1–2. Angesichts der vorstehenden Ausführungen sollten negative Ergebnisse im Kontext der angegebenen Grenzen und in Verbindung mit anderen Informationsquellen im Rahmen von IATA interpretiert werden. In Fällen, in denen die Nichtanwendbarkeit der h-CLAT-Methode bei anderen spezifischen Kategorien von Prüfchemikalien nachgewiesen wird, sollte sie bei diesen spezifischen Kategorien nicht verwendet werden.

5. Die h-CLAT-Methode unterstützt, wie bereits oben erwähnt, die Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren. Er kann jedoch bei Verwendung im Rahmen von integrierten Ansätzen wie IATA möglicherweise auch zur Bewertung der Sensibilisierungspotenz beitragen (4)(5)(9). Es sind dennoch weitere Untersuchungen erforderlich, vorzugsweise auf der Grundlage von Humandaten, um herauszufinden, inwieweit die Ergebnisse des h-CLAT möglicherweise zur Potenzbewertung herangezogen werden können.

6. Definitionen sind Anlage 1.1 zu entnehmen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

7. Die h-CLAT-Methode ist ein In-vitro-Test, der Änderungen der Expression von Zelloberflächenmarkern (d. h. CD86 und CD54) auf einer humanen monozytischen Leukämiezelllinie, THP-1-Zellen, nach einer 24-stündigen Exposition gegenüber der Prüfchemikalie quantifiziert. Diese Oberflächenmoleküle sind typische Marker der monotypischen THP-1-Aktivierung und können die DC-Aktivierung eventuell nachahmen, die eine kritische Rolle bei der T-Zellenvorbehandlung spielt. Die Änderungen der Expression von Oberflächenmarkern werden mittels Durchflusszytometrie nach Zellfärbung mit Antikörpern, die mit Fluorochrom markiert wurden, gemessen. Die Zytotoxizitätsmessung wird ebenfalls zur gleichen Zeit durchgeführt, um zu beurteilen, ob die Hochregulierung der Expression von Oberflächenmarkern bei Konzentrationen unterhalb des zytotoxischen Werts auftritt. Die relative Fluoreszenzintensität der Oberflächenmarker im Vergleich zur Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle wird berechnet und im Vorhersagemodell verwendet (siehe 26), um die Unterscheidung zwischen Allergenen und Nichtsensibilisatoren zu unterstützen.

NACHWEIS DER KOMPETENZ

8. Vor der routinemäßigen Verwendung des unter dieser Anlage zur Prüfmethode B.71 beschriebenen Tests sollten Laboratorien ihre technische Kompetenz anhand der zehn in Anlage 1.2 aufgeführten Leistungsstoffe nachweisen. Darüber hinaus sollten Prüfungsnutzer eine historische Datenbank der mit den Reaktivitätsprüfungen (siehe Abschnitt 11) und mit den positiven sowie Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen (siehe Abschnitte 20–22) erzeugten Daten pflegen und diese Daten nutzen, um zu bestätigen, dass die Reproduzierbarkeit der Prüfung in ihrem Labor im Lauf der Zeit aufrechterhalten wird.

VERFAHREN

9. Diese Prüfmethode basiert auf dem h-CLAT-DataBase-Dienst für alternative Methoden zur Durchführung von Tierversuchen (DB-ALM) Protokoll Nr. 158 (18), das für die vom EURL ECVAM koordinierte Validierungsstudie verwendet wurde. Es wird empfohlen, dieses Protokoll bei der Durchführung und Anwendung der h-CLAT-Methode im Labor zugrunde zu legen. Nachfolgend werden die wichtigsten Komponenten und Verfahren der h-CLAT-Methode beschrieben, die zwei Schritte umfasst: *Test zur Dosisfindung* und *CD86/CD54-Expressionsmessung*.

Vorbereitung der Zellen

10. Bei Ausführung der h-CLAT-Methode sollte die humane monozytische Leukämie-Zelllinie THP-1 verwendet werden. Es wird empfohlen, dass Zellen (TIB-202™) aus einer gut qualifizierten Zellbank wie der American Type Culture Collection entnommen werden.

11. THP-1-Zellen werden bei 37°C unter 5 % CO_2 und einer befeuchteten Atmosphären in einem mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS), 0,05 mM 2-Mercaptoethanol, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin angereicherten RPMI-1640-Medium kultiviert. Die Verwendung von Penicillin und Streptomycin im Kulturmedium kann vermieden werden. In einem solchen Fall sollten Benutzer jedoch verifizieren, dass das Nichtvorhandensein von Antibiotika im Kulturmedium keinen Einfluss auf die Ergebnisse hat, beispielsweise durch Testen der in Anlage 1.2 aufgeführten Leistungsstoffe. Um das Kontaminationsrisiko zu minimieren, sollten bewährte Zellkulturpraktiken auf jeden Fall unabhängig vom Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von Antibiotika im Zellkulturmedium befolgt werden. THP-1-Zellen werden regelmäßig alle 2–3 Tage bei einer Dichte von 0,1 bis 0,2 × 10^6 Zellen/ml ausgesät. Es sollten Zelldichten von 0,1 bis 1,0 × 10^6 Zellen/ml gewahrt werden. Vor ihrer Verwendung zu Testzwecken sollten die Zellen qualifiziert werden, indem ein Reaktivitätstest durchgeführt wird. Der Reaktivitätstest der Zellen sollte mithilfe der positiven Kontrollen, 2,4-Dinitrochlorbenzol (DNCB) (CAS Nr. 97-00-7, ≥99 % Reinheit) und Nickelsulfat ($NiSO_4$) (CAS Nr. 10101-97-0, ≥99 % Reinheit) und der negativen Kontrolle, Milchsäure (LA) (CAS Nr. 50-21-5, ≥85 % Reinheit) zwei Wochen nach dem Auftauen durchgeführt werden. DNCB und $NiSO_4$ sollten eine positive Reaktion auf CD86- und CD54-Zelloberflächenmarker ergeben und LA sollte eine negative Reaktion auf CD86- und CD54-Zelloberflächenmarker ergeben. Nur die Zellen, welche den Reaktivitätstest bestanden haben, dürfen für den Test verwendet werden. Zellen können bis zu zwei Monate nach dem Auftauen gewonnen werden. Die Passagenanzahl sollte 30 nicht übersteigen. Der Reaktivitätstest sollte gemäß den in den Abschnitten 20–24 beschriebenen Verfahren durchgeführt werden.

12. Zur Prüfung werden die THP-1-Zellen bei einer Dichte von entweder 0,1 × 10^6 Zellen/ml oder 0,2 × 10^6 Zellen/ml ausgesät und in Kulturkolben 72 bzw. 48 Stunden lang vorgezüchtet. Es ist wichtig, dass die Zelldichte im Kulturkolben direkt nach dem Vorkulturzeitraum bei jedem Versuch so konstant wie möglich ist (indem eine der zwei oben beschriebenen Vorkulturbedingungen angewandt wird), da die Zelldichte im Kulturkolben direkt nach der Vorkultur die von Allergenen induzierte CD86/CD54-Expression beeinträchtigen könnte (19). Am Tag des Tests werden die Zellen, die aus dem Kulturkolben geerntet wurden, mit einem frischen Kulturmedium mit 2 × 10^6 Zellen/ml neu angesetzt. Dann werden die Zellen in eine flache Platte mit 24 Mulden (500 µl, 1 × 10^6 Zellen/Mulde) oder eine flache Platte mit 96 Mulden (80 µl, 1,6 × 10^5 Zellen/Mulde) verteilt.

Test zur Dosisfindung

13. Ein *Test zur Dosisfindung* wird durchgeführt, um CV75 zu bestimmen. Dies ist die Prüfchemikalienkonzentration, die im Vergleich zur Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle zu einer Zellviabilität (CV) von 75 % führt. Der CV75-Wert wird verwendet, um die Konzentration der Prüfchemikalien für die *CD86/CD54*-Expressionsmessung zu bestimmen (siehe Abschnitte 20–24).

Vorbereitung der Prüfchemikalien und Kontrollstoffe

14. Die Prüfchemikalien sowie die Kontrollstoffe werden am Tag des Tests vorbereitet. Bei der h-CLAT-Method werden die Prüfchemikalien in Kochsalzlösung oder einem Medium, als erste Lösungsmittel-/Vehikeloptionen, oder Dimethylsulfoxid (DMSO,≥ 99 % Reinheit), als zweite Lösungsmittel-/Vehikeloption, aufgelöst oder stabil verteilt (siehe auch Abschnitt 4), falls die Prüfchemikalie in den zwei zuvor genannten Lösungsmitteln/Vehikeln mit endgültigen Konzentrationen von 100 mg/ml (in Kochsalzlösung oder Medium) oder 500 mg/ml (in DMSO) nicht löslich ist oder keine stabile Verteilung ausbildet. Andere als die oben beschriebenen Lösungsmittel/Vehikel können verwendet werden, wenn eine ausreichende wissenschaftliche Begründung gegeben wird. Die Stabilität der Prüfchemikalie im endgültigen Lösungsmittel/Vehikel sollte berücksichtigt werden.

15. Ausgehend von den 100 mg/ml- (in Kochsalzlösung oder Medium) oder 500 mg/ml- (in DMSO) Stammlösungen der Prüfchemikalien sollten die folgenden Verdünnungsschritte durchgeführt werden:

— Für Kochsalzlösung oder Medium als Lösungsmittel/Vehikel: Acht Stammlösungen (acht Konzentrationen) werden nach zweifachen seriellen Verdünnungen mithilfe des entsprechenden Lösungsmittels/Vehikels vorbereitet. Diese Stammlösungen werden dann im Kulturmedium 50-fach weiter verdünnt (Arbeitslösungen). Wenn die obere endgültige Konzentration in der Platte von 1 000 µg/ml nicht toxisch ist, sollte die maximale Konzentration erneut bestimmt werden, indem eine neue Zytotoxizitätsprüfung durchgeführt wird. Die endgültige Konzentration in der Platte sollte 5 000 µg/ml für Prüfchemikalien, die in Kochsalzlösung oder einem Medium gelöst oder stabil verteilt wurden, nicht überschreiten.

— Für DMSO als Lösungsmittel/Vehikel: Acht Stammlösungen (acht Konzentrationen) werden nach zweifachen seriellen Verdünnungen mithilfe des entsprechenden Lösungsmittels/Vehikels vorbereitet. Diese Stammlösungen werden dann im Kulturmedium 250-fach weiter verdünnt (Arbeitslösungen). Die endgültige Konzentration in der Platte sollte 1 000 µg/ml nicht überschreiten, auch wenn die Konzentration nicht toxisch ist.

Die Arbeitslösungen werden schließlich zur Exposition verwendet, indem eine gleiche Menge an Arbeitslösung zum Volumen der THP-1-Zellsuspension in der Platte hinzugefügt wird (siehe auch Abschnitt 17), um eine weitere zweifache Verdünnung zu erhalten (normalerweise beträgt der endgültige Bereich an Konzentrationen in der Platte 7,81–1 000 µg/ml).

16. Die bei der h-CLAT-Methode verwendete Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle ist das Kulturmedium (für mit Medium oder Kochsalzlösung löslich gemachte oder stabil verteilte (siehe Abschnitt 4) Prüfchemikalien) oder DMSO (für in DMSO löslich gemachte oder stabil verteilte Prüfchemikalien), die bei einer einzigen endgültigen Konzentration in der Platte von 0,2 % geprüft wurden. Hier wird dasselbe Verdünnungsverfahren verwendet, das für Arbeitslösungen in Abschnitt 15 beschrieben wird.

Applikation der Prüfchemikalien und Kontrollstoffe

17. Das Kulturmedium oder die Arbeitslösungen, die in den Abschnitten 15 und 16 beschrieben werden, werden 1:1 (v/v) mit den in der flachen Platte mit 24 oder 96 Mulden vorbereiteten Zellsuspensionen gemischt (siehe Abschnitt 12). Die behandelten Platten werden dann 24 ± 0,5 Stunden bei 37°C unter 5 % CO_2 inkubiert. Es ist darauf zu achten, dass eine Verdunstung der flüchtigen Prüfchemikalien sowie eine Kreuzkontamination zwischen Mulden durch die Prüfchemikalien vermieden werden, indem die Platte beispielsweise vor der Inkubation mit den Prüfchemikalien versiegelt wird (20).

Färben mit Propidiumjodid (PI)

18. Nach einer Expositionszeit von 24 ± 0,5 Stunden werden die Zellen in Probenröhrchen übertragen und durch Zentrifugierung gesammelt. Die Überstände werden entsorgt und die verbleibenden Zellen werden mit 200 µl (im Falle von 96 Mulden) oder 600 µl (im Falle von 24 Mulden) einer mit Phosphat gepufferten Kochsalzlösung mit 0,1 % Rinderserum-Albumin (Färbepuffer) resuspensiert. 200 µl der Zellsuspension werden in eine Platte mit gewölbtem Boden und 96 Mulden (im Falle von 96 Mulden) oder ein Mikroröhrchen (im Falle von 24 Mulden) gegeben und zweimal mit 200 µl (im Falle von 96 Mulden) oder 600 µl (im Falle von 24 Mulden) Färbepuffer gewaschen. Schließlich werden die Zellen in Färbepuffer (z. B. 400 µl) resuspensiert und es wird PI-Lösung (z. B. 20 µl) hinzugefügt (zum Beispiel ist die endgültige Konzentration von PI 0,625 µg/ml). Andere Zytotoxizitätsmarker wie 7-Aminoactinomycin D (7-AAD), Trypan blau oder andere können verwendet werden, wenn gezeigt werden kann, dass die alternativen Farbstoffe ähnliche Ergebnisse liefern wie PI, zum Beispiel durch Testen der Leistungsstoffe in Anlage 1.2.

Zytotoxizitätsmessung anhand von Durchflusszytometrie und Schätzung von CV75-Wert

19. Die PI-Aufnahme wird anhand der Durchflusszytometrie mit dem Aufnahmekanal FL-3 analysiert. Es werden insgesamt 10 000 lebende Zellen (PI negativ) aufgenommen. Die Zellviabilität kann anhand der folgenden Gleichung über das Zytometeranalyseprogramm berechnet werden. Wenn die Zellviabilität gering ist, sollten bis zu 30 000 Zellen einschließlich toter Zellen aufgenommen werden. Alternativ können die Daten eine Minute nach der Einleitung der Analyse aufgenommen werden.

$$Zellviabilität = \frac{Anzahl\ der\ lebenden\ Zellen}{Gesamtzahl\ der\ aufgenommenen\ Zellen} \times 100$$

Der CV75-Wert (siehe Abschnitt 13), d. h. eine Konzentration, die 75 % des THP-1-Zellüberlebens (25 % Zytotoxizität) zeigt, wird anhand der log-linearen Interpolation mit der folgenden Gleichung berechnet:

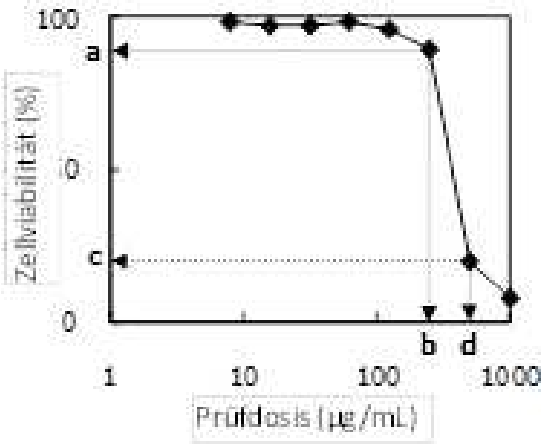
$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

Dabei gilt:

a ist der Mindestwert der Zellviabilität über 75 %

c ist der Höchstwert der Zellviabilität unter 75 %

b und d sind die Konzentrationen, die den Wert der Zellviabilität a bzw. c zeigen



Weitere Ansätze zur Ableitung von CV75 können angewandt werden, solange demonstriert wird, dass dies keinen Einfluss auf die Ergebnisse hat (z. B. durch Testen der Leistungsstoffe).

CD86/CD54-Expressionsmessung

Vorbereitung der Prüfchemikalien und Kontrollstoffe

20. Das geeignete Lösungsmittel/Vehikel (Kochsalzlösung, Medium oder DMSO; siehe Abschnitt 14) wird verwendet, um die Prüfchemikalien zu lösen oder stabil zu verteilen. Die Prüfchemikalien werden zuerst auf die Konzentration verdünnt, die dem 100-fachen (für Kochsalzlösung oder Medium) oder 500-fachen (für DMSO) von 1,2 × CV75 entspricht, der im *Test zur Dosisfindung* bestimmt wurde (siehe Abschnitt 19). Wenn der CV75 nicht bestimmt werden kann (d. h. wenn keine ausreichende Zytotoxizität im *Test zur Dosisfindung* beobachtet werden kann), sollte die höchste lösliche oder stabil verteilte Konzentration der Prüfchemikalie, die mit jedem Lösungsmittel/Vehikel vorbereitet wird, als Ausgangskonzentration verwendet werden. Bitte beachten Sie, dass die endgültige Konzentration in der Platte 5 000 µg/ml (im Falle von Kochsalzlösung oder Medium) oder 1 000 µg/ml (im Falle von DMSO) nicht überschreiten sollte. Dann werden 1,2-fache serielle Verdünnungen mit dem entsprechenden Lösungsmittel/Vehikel hergestellt, um die Stammlösungen zu erhalten (acht Konzentrationen von 100 × 1,2 × CV75 bis 100 × 0,335 × CV75 (für Kochsalzlösung oder Medium) oder von 500 × 1,2 × CV75 bis 500 × 0,335 × CV75 (für DMSO)), die in der h-CLAT-Methode geprüft werden sollen (siehe DB-ALM-Protokoll Nr. 158 für ein Beispiel eines Dosierungsschemas). Die Stammlösungen werden dann im Kulturmedium 50-fach (für Kochsalzlösung oder Medium) oder 250-fach (für DMSO) weiter verdünnt (Arbeitslösungen). Diese Arbeitslösungen werden schließlich für die Exposition mit einem weiteren endgültigen zweifachen Verdünnungsfaktor in der Platte verwendet. Wenn die Ergebnisse die in den Abschnitten 29 und 30 beschriebenen Akzeptanzkriterien zur Zellviabilität nicht erfüllen, kann der *Test zur Dosisfindung* wiederholt werden, um einen präziseren CV75 zu bestimmen. Bitte beachten Sie, dass nur Platten mit 24 Mulden für die CD86/CD54-Expressionsmessung verwendet werden können.

21. Die Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle wird wie in Abschnitt 16 beschrieben vorbereitet. Die bei der h-CLAT-Methode verwendete Positivkontrolle ist DNCB (siehe Abschnitt 11), für die Stammlösungen in DMSO vorbereitet und wie für die Stammlösungen in Abschnitt 20 beschrieben verdünnt werden. DNCB sollte als Positivkontrolle für die *CD86/CD54-Expressionsmessung* mit einer endgültigen Konzentration in der Platte verwendet werden (normalerweise 4,0 µg/ml). Um eine Konzentration von 4,0 µg/ml DNCB in der Platte zu erhalten, wird eine Stammlösung von 2 mg/ml DNCB in DMSO vorbereitet und weiter 250-fach mit dem Kulturmedium in eine Arbeitslösung von 8 µg/ml verdünnt. Alternativ könnte auch der CV75 von DNCB, der in jeder Prüfeinrichtung bestimmt wird, als Positivkontrollkonzentration verwendet werden. Andere geeignete Positivkontrollen können verwendet werden, sofern historische Daten für die Ableitung vergleichbarer Akzeptanzkriterien für einen Testdurchlauf zur Verfügung stehen. Bei Positivkontrollen sollte die endgültige Einzelkonzentration in der Platte 5 000 µg/ml (im Falle von Kochsalzlösung oder Medium) oder 1 000 µg/ml (im Falle von DMSO) nicht überschreiten. Die Durchlaufakzeptanzkriterien entsprechen denen, die für die Prüfchemikalien beschrieben werden (siehe Abschnitt 29), ausgenommen für das letzte Akzeptanzkriterium, da die Positivkontrolle mit einer einzelnen Konzentration geprüft wird.

Applikation der Prüfchemikalien und Kontrollstoffe

22. Für jede Prüfchemikalie und jeden Kontrollstoff ist ein Experiment erforderlich, um eine Vorhersage zu ermitteln. Jedes Experiment besteht aus mindestens zwei unabhängigen Durchläufen für die *CD86/CD54-Expressionsmessung* (siehe Abschnitte 26–28). Jeder unabhängige Durchlauf wird an einem anderen Tag bzw. am selben Tag durchgeführt, vorausgesetzt, dass für jeden Durchlauf: a) unabhängige frische Stammlösungen und Arbeitslösungen der Prüfchemikalie und Antikörperlösungen vorbereitet werden und b) unabhängig geerntete Zellen verwendet werden (d. h. Zellen, die aus verschiedenen Kulturkolben entnommen werden); Zellen können jedoch aus derselben Passage stammen. Prüfchemikalien und Kontrollstoffe, die als Arbeitslösungen (500 µl) vorbereitet wurden, werden mit 500 µl der suspensierten Zellen (1×10^6 Zellen) im Verhältnis von 1:1 gemischt und die Zellen werden 24 ± 0,5 Stunden wie in den Abschnitten 20 und 21 beschrieben inkubiert. In jedem Durchlauf reicht ein einziges Replikat für jede Konzentration der Prüfchemikalie und des Kontrollstoffs aus, da eine Vorhersage in mindestens zwei unabhängigen Durchläufen ermittelt wird.

Zellfärbung und Analyse

23. Nach einer Expositionsdauer von mindestens 24 ± 0,5 Stunden werden die Zellen von einer Platte mit 24 Mulden in Probenröhrchen gegeben, mithilfe von Zentrifugierung gesammelt und dann zweimal mit 1 ml Färbepuffer gewaschen (wenn erforderlich können zusätzliche Waschschritte durchgeführt werden). Nach dem Waschen werden die Zellen mit 600 µl Blockierungslösung blockiert (Färbepuffer mit 0,01 % (w/v) Globulin (Cohn-Fraktion II, III, human; SIGMA, #G2388-10G oder ähnliches)) und bei 4°C 15 Minuten lang inkubiert. Nach der Blockierung werden die Zellen in drei Aliquote von je 180 µl in eine Platte mit gewölbtem Boden und 96 Mulden oder ein Mikroröhrchen aufgeteilt.

24. Nach der Zentrifugierung werden die Zellen mit 50 µl der mit FITC markierten anti-CD86-, anti-CD54- oder Maus-IgG1-Antikörper (Isotyp) bei 4°C 30 Minuten lang gefärbt. Die im h-CLAT DB-ALM Protokoll Nr. 158 (18) beschriebenen Antikörper sollten verwendet werden, indem sie 3:25 v/v (für CD86 (BD-PharMingen, #555657; Klon: Fun-1)) oder 3:50 v/v (für CD54 (DAKO, #F7143; Klon: 6.5B5) und IgG1 (DAKO, #X0927)) mit Färbepuffer verdünnt werden.Diese Antikörperverdünnungsfaktoren wurden von den Entwicklern des Tests als diejenigen definiert, die den besten Rauschabstand bieten. Nach Erfahrung der Testentwickler ist die Fluoreszenzintensität der

Antikörper normalerweise zwischen verschiedenen Chargen konsistent. Benutzer können jedoch erwägen, die Antikörper unter den Bedingungen im eigenen Labor zu titrieren, um die besten Gebrauchskonzentrationen zu definieren. Andere mit Fluorochrom markierte anti-CD86- und/oder anti-CD54-Antikörper können verwendet werden, wenn gezeigt werden kann, dass sie ähnliche Ergebnisse wie mit FITC konjugierte Antikörper liefern, beispielsweise durch Testen der Leistungsstoffe in Anlage 1.2.Anzumerken ist, dass die Änderung des Klons oder des Lieferanten der Antikörper, wie dies im h-CLAT DB-ALM Protokoll Nr. 158 (18) beschrieben wird, die Ergebnisse beeinträchtigen kann. Nach dem zwei- oder mehrfachen Waschen mit 150 µl Färbepuffer werden die Zellen in Färbepuffer resuspensiert (z. B. 400 µl) und die PI-Lösung (z. B. 20 µl, um eine endgültige Konzentration von 0,625 µg/ml zu erhalten) oder eine andere Zytotoxizitätsmarkerlösung (siehe Abschnitt 18) wird hinzugefügt. Die Expressionswerte von CD86 und CD54 sowie die Zellviabilität werden mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Datenauswertung

25. Die Expression von CD86 und CD54 wird mithilfe der Durchflusszytometrie mit dem Aufnahmekanal FL-1 analysiert. Auf der Grundlage der geometrischen mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) werden die relative Fluoreszenzintensität (RFI) von CD86 und CD54 für Positivkontrollzellen (ctrl) und chemisch behandelte Zellen nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$RFI = \frac{(MFI\ chemisch\ behandelte\ Zelle - MFI\ chemisch\ behandelte\ Isotypkontrollzellen)}{(MFI\ mit\ Lösungsm./Vehikel\ beh.\ Kontrollz. - MFI\ mit\ Lösungsm. - Vehikel\ beh./Isotypkontrollz.)} \times 100$$

Die Zellviabilität aus den Isotypkontrollzellen (ctrl) (die mit Maus-IgG1-Antikörpern (Isotyp) gefärbt werden) wird ebenfalls nach der in Abschnitt 19 beschriebenen Gleichung berechnet.

Vorhersagemodell

26. Bei der *CD86/CD54*-Expressionsmessung wird jede Prüfchemikalie in mindestens zwei unabhängigen Durchläufen geprüft, um eine einzige Vorhersage abzuleiten (POSITIV oder NEGATIV). Eine h-CLAT-Vorhersage gilt als POSITIV, wenn mindestens eine der folgenden Bedingungen in 2 von 2 oder in mindestens 2 von 3 unabhängigen Durchläufen erfüllt ist, andernfalls wird die h-CLAT-Vorhersage als NEGATIV angesehen (Abbildung 1):

— Die RFI von CD86 ist bei jeder geprüften Konzentration gleich oder größer als 150 % (mit einer Zellviabilität ≥50 %);

— die RFI von CD54 ist bei jeder geprüften Konzentration gleich oder größer als 200 % (mit einer Zellviabilität ≥50 %).

27. Auf dieser Grundlage ist die h-CLAT-Vorhersage als POSITIV anzusehen, wenn die ersten zwei Durchläufe positiv für CD86 und/oder positiv für CD54 waren; ein dritter Durchlauf ist dann nicht mehr erforderlich. Analog ist die h-CLAT-Vorhersage als NEGATIV anzusehen (unter angemessener Berücksichtigung der Bestimmungen in Abschnitt 30), wenn die ersten zwei Durchläufe für beide Marker negativ sind; ein dritter Durchlauf ist dann nicht mehr erforderlich. Wenn die ersten zwei Durchläufe jedoch für mindestens einen der Marker nicht konkordant ist (CD54 oder CD86), dann ist ein dritter Durchlauf erforderlich und die endgültige Vorhersage basiert auf dem Mehrheitsergebnis der drei individuellen Durchläufe (d. h. 2 von 3). In dieser Hinsicht ist zu beachten, dass ein dritter Durchlauf erforderlich ist, wenn zwei unabhängige Durchläufe durchgeführt werden und einer nur für CD86 (nachfolgend „P_1“ genannt) und der andere nur für CD54 (nachfolgend „P_2“ genannt) positiv ist. Wenn dieser dritte Durchlauf für beide Marker negativ ist (nachfolgend „N“ genannt), dann wird die h-CLAT-Vorhersage als NEGATIV angesehen. Wenn der dritte Durchlauf andererseits für einen der Marker (P_1 oder P_2) oder für beide Marker (nachfolgend „P_{12}“ genannt) positiv ist, dann ist die h-CLAT-Vorhersage als POSITIV anzusehen.

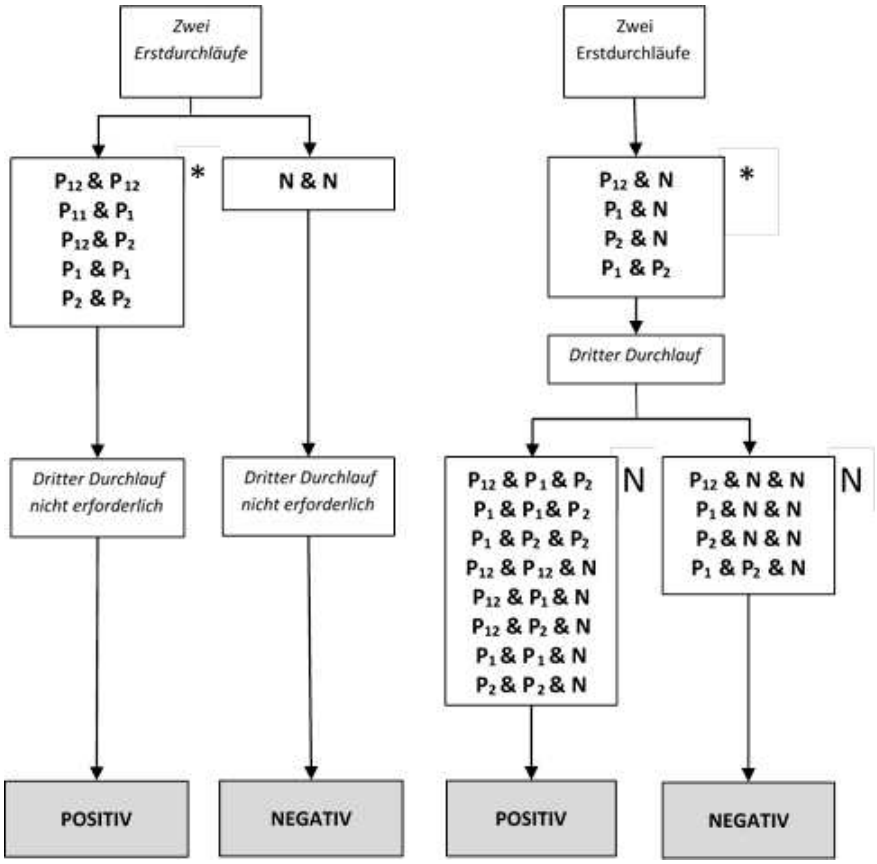


Abb. 1: Bei der h-CLAT-Methode verwendetes Vorhersagemodell. Eine h-CLAT-Vorhersage sollte im Rahmen eines IATA sowie gemäß den Nummern 7 und 8 der Allgemeinen Einleitung in Betracht gezogen werden.

P_1: Durchlauf mit nur CD86 positiv; P_2; Durchlauf mit nur CD54 positiv; P_{12}: Durchlauf mit CD86 und CD54 positiv; N: Durchlauf mit weder CD86 noch CD54 positiv.

*Die Kästchen zeigen die relevanten Kombinationen der Ergebnisse aus den ersten beiden Durchläufen unabhängig von der Reihenfolge, in der sie ermittelt wurden.

#Die Kästchen zeigen die relevanten Kombinationen der Ergebnisse aus den drei Durchläufen auf der Grundlage der Ergebnisse aus den ersten zwei Durchläufen, wie im obigen Kästchen dargestellt, aber spiegeln nicht die Reihenfolge wider, in der sie ermittelt wurden.

28. Für die Prüfchemikalien, die mit h-CLAT als POSITIV vorhergesehen wurden, können optional zwei effektive Konzentrationswerte (EC) bestimmt werden, EC150 für CD86 und EC200 für CD54, d. h. die Konzentration, bei der die Prüfchemikalien eine RFI von 150 bzw. 200 induzierten. Diese EC-Werte können jedoch bei Verwendung im Rahmen von integrierten Ansätzen wie IATA (4) (5) (6) (7) (8) möglicherweise auch zur Bewertung der Sensibilisierungspotenz beitragen (9). Sie können mithilfe der folgenden Gleichungen berechnet werden:

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

$$EC\ 200\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

Dabei gilt:

A_{conc} ist die niedrigste Konzentration in µg/ml mit RFI > 150 (CD86) oder 200 (CD54)

B_{conc} ist die höchste Konzentration in µg/ml mit RFI < 150 (CD86) oder 200 (CD54)

A_{RFI} ist die RFI bei der niedrigsten Konzentration mit RFI > 150 (CD86) oder 200 (CD54)

B_{RFI} ist die RFI bei der höchsten Konzentration mit RFI > 150 (CD86) oder 200 (CD54)

Zum Zwecke der präziseren Ableitung der EC150- und EC200-Werte können drei unabhängige Durchläufe für die *CD86/CD54-Expressionsmessung* erforderlich sein. Die endgültigen EC150- und EC200-Werte werden dann als Mittelwert der aus den drei unabhängigen Durchläufen berechneten ECs bestimmt. Wenn nur zwei der drei unabhängigen Durchläufe die Kriterien für Positivität (siehe Abschnitte 26–27) erfüllen, wird der höhere EC150 oder EC200 der zwei berechneten Werte übernommen.

Akzeptanzkriterien

29. Bei der Verwendung der h-CLAT-Methode (22) (27) sollten die folgenden Akzeptanzkriterien erfüllt werden.

— Die Zellviabilitäten der Medium- und Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen sollten höher als 90 % sein.

— Bei der Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle sollten die RFI-Werte von CD86 und CD54 die positiven Kriterien nicht überschreiten (CD86 RFI ≥ 150 % und CD54 RFI ≥ 200 %). Die RFI-Werte der Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle werden berechnet, indem die in Abschnitt 25 beschriebene Formel verwendet wird („MFI der Chemikalie" sollte durch „MFI des Lösungsmittels/Vehikels" ersetzt werden und „MFI des Lösungsmittels/Vehikels" sollte durch „MFI der (Medium-)Kontrolle" ersetzt werden).

— Bei den Medium- und Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen sollte das MFI-Verhältnis von CD86 und CD54 zur Isotypkontrolle >105 % betragen.

— Bei der Positivkontrolle (DNCB) sollten die RFI-Werte von CD86 und CD54 die Positivkriterien (CD86 RFI ≥ 150 und CD54 RFI ≥ 200) erfüllen und die Zellviabilität sollte mehr als 50 % betragen.

— Für die Prüfchemikalie sollte die Zellviabilität in mindestens vier geprüften Konzentrationen in jedem Durchlauf mehr als 50 % betragen.

30. Negative Ergebnisse sind nur für Prüfchemikalien mit einer Zellviabilität von weniger als 90 % bei der höchsten geprüften Konzentration zulässig (d. h. 1,2 × CV75 gemäß dem in Abschnitt 20 beschriebenen seriellen Verdünnungsschema). Wenn die Zellviabilität bei 1,2 × CV75 90 % oder mehr beträgt, sollte das negative Ergebnis verworfen werden. In einem solchen Fall wird empfohlen, die Dosiswahl durch Wiederholung der CV75-Bestimmung zu präzisieren. Es sollte beachtet werden, dass bei der Verwendung von 5 000 µg/ml in Kochsalzlösung (oder Medium oder anderen Lösungsmitteln/Vehikeln), 1 000 µg/ml in DMSO oder der höchsten löslichen Konzentration als maximale Prüfkonzentration einer Prüfchemikalie ein negatives Ergebnis auch dann akzeptabel ist, wenn die Zellviabilität über 90 % liegt.

Prüfbericht

31. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten.

Prüfchemikalie

Einkomponentiger Stoff:

— Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;

— physikalisches Erscheinungsbild, log Kow, Löslichkeit in Wasser, Löslichkeit in DMSO, Molekulargewicht und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, sofern verfügbar;

— Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;

— Behandlung vor dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);

— geprüfte Konzentration(en);

— Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;

— Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels für jede Prüfchemikalie.

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoff und Gemisch

— Charakterisierung, so weit wie möglich, z. B. durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), Reinheit, das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften (siehe oben) der einzelnen Komponenten, soweit verfügbar;

— physikalisches Erscheinungsbild, Löslichkeit in Wasser, Löslichkeit in DMSO und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, sofern verfügbar;

— Molekulargewicht oder scheinbares Molekulargewicht im Fall von Gemischen/Polymeren mit bekannter Zusammensetzung oder andere für die Durchführung der Studie relevante Informationen;

— Behandlung vor dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);

— geprüfte Konzentration(en);

— Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;

— Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels für jede Prüfchemikalie.

Kontrollen

Positivkontrolle

— Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;

— physikalisches Erscheinungsbild, log K_{ow}, Löslichkeit in Wasser, Löslichkeit in DMSO, Molekulargewicht und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, sofern verfügbar und falls zutreffend;

— Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;

— Behandlung vor dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);

— geprüfte Konzentration(en);

— Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;

— ggf. Verweis auf historische Ergebnisse von Positivkontrollen, die geeignete Akzeptanzkriterien für einen Testdurchlauf dokumentieren.

Negativ- und Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle:

— Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;

— Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;

— Aussehen, Molekulargewicht und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, sofern andere Kontroll-Lösungsmittel/Vehikel als die in der Prüfrichtlinie genannten verwendet werden und soweit verfügbar;

— Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;

— Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels für jede Prüfchemikalie.

Prüfbedingungen:

— Name und Anschrift des Auftraggebers, der Prüfanstalt und des Studienleiters;

— Beschreibung des verwendeten Tests;

— verwendete Zelllinie, zugehörige Lagerbedingungen und Quelle (z. B. Einrichtung, von der sie gewonnen wurden);

— die verwendete Durchflusszytometrie (z. B. Modell), einschließlich der Geräteeinstellungen, Globulin, Antikörper und verwendeten Zytotoxizitätsmarker;

— das angewandte Verfahren zum Nachweis der Kompetenz des Labors bei der Durchführung des Tests durch Prüfen der Leistungsstoffe) und das angewandte Verfahren zum Nachweis der reproduzierbaren Leistung des Tests im Zeitverlauf, z. B. historische Kontrolldaten und/oder Daten zu historischen Reaktivitätstests.

Validitätskriterien

— Zellviabilität, MFI- und RFI-Werte aus der Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle im Vergleich zu den Validitätsbereichen;

— Zellviabilität und RFI-Werte aus der Positivkontrolle im Vergleich zu den Validitätsbereichen;

— Zellviabilität aller geprüften Konzentrationen der geprüften Chemikalie.

Prüfverfahren

— Anzahl der vorgenommenen Durchläufe;

— Konzentrationen der Prüfchemikalie, Applikationen und angewandte Expositionsdauer (falls von den Empfehlungen abweichend)

— Beschreibung der angewandten Bewertungs- und Entscheidungskriterien;

— Beschreibung etwaiger Änderungen am Prüfverfahren.

Ergebnisse

— Tabellierung der Daten, einschließlich CV75 (falls anwendbar), individueller geometrischer MFI, RFI, Zellviabilitätswerte, EC150/EC200-Werte (falls anwendbar) für die Prüfchemikalie und für die Positivkontrolle in jedem Durchlauf und eine Anzeige der Einstufung der Prüfchemikalie gemäß dem Vorhersagemodell;

— Beschreibung etwaiger sonstiger relevanter Beobachtungen, falls zutreffend.

Erörterung der Ergebnisse

— Erörterung der anhand der h-CLAT-Methode erhaltenen Ergebnisse;

— Analyse der Prüfergebnisse im Rahmen eines IATA, sofern sonstige relevante Informationen vorliegen.

Schlussfolgerungen

LITERATURHINWEISE

(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. Verfügbar unter:https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. J Appl Toxicol. 35, 1318–1332.

(5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. J Appl Toxicol. 35, 1333–1347.

(6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potencials. Regul Toxicol Parmacol. 63, 489–504.

(7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol. 69, 371–379.

(8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Parmacol. 71, 337–351.

(9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. Arch Toxicol. 89, 2355–2383.

(10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. J Appl Toxicol. DOI 10.1002/jat.3281.

(11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. Toxicol. *In Vitro* 26, 1150–60.

(12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Verfügbar unter: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. Verfügbar unter:https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. J. Toxicol. Sci. 38, 599–609.

(15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275–284.

(16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch Toxicol 87, 1683–1969.

(17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6^{th} report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81–88.

(18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23ff. Verfügbar unter:http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

(19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamato K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70–82.

(20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89–96.

(21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, Frankreich, 2005, 96 ff.

(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. Verfügbar unter: 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). Fünfte überarbeitete Fassung. New York und Genf: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Verfügbar unter: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.

Anlage 1.1

DEFINITIONEN

Genauigkeit: Grad der Übereinstimmung zwischen Prüfergebnissen und anerkannten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der „Relevanz". Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung" verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (21).

AOP (Adverse Outcome Pathway): Abfolge von Vorgängen, ausgehend von der chemischen Struktur einer Zielchemikalie oder Zielgruppe ähnlicher Chemikalien, über den molekularen auslösenden Vorgang bis hin zu einem In-vivo-Ergebnis von Interesse (22).

Chemikalie: Stoff oder Gemisch.

CV75: Die geschätzte Konzentration, die 75 % Zellviabilität zeigt.

EC150: die Konzentrationen, die die RFI-Werte von 150 in der CD86-Expression zeigen

EC200: die Konzentrationen, die die RFI-Werte von 200 in der CD54-Expression zeigen

Durchflusszytometrie: eine zytometrische Technik, bei der Zellen, die in einem Fluid suspendiert sind, einzeln durch eine Lichtstrahl fließen, das in für die Zellen und ihre Komponenten typischen Muster gestreut ist; Zellen werden häufig mit fluoreszierenden Markern gekennzeichnet, damit das Licht zuerst absorbiert und dann in geänderten Frequenzen ausgestrahlt wird.

Gefahr: Inhärente Eigenschaft eines Stoffes oder einer Situation, potenziell schädigende Auswirkungen zu haben, wenn ein Organismus, ein System oder eine (Teil-)Population diesem Stoff ausgesetzt ist.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): Ein strukturierter Ansatz zur Gefahrenidentifizierung (Potenzial), Gefahrencharakterisierung (Potenz) und/oder Sicherheitsbeurteilung (Potenzial/Potenz und Exposition) einer Chemikalie oder Gruppe von Chemikalien, der strategisch sämtliche relevanten Daten für eine informierte regulatorische Entscheidung hinsichtlich potenziellen Gefahren und/oder Risiken und/oder des Bedürfnisses weiterer gezielter und somit minimaler Tests integriert und abwägt.

Mediumkontrolle: Ein unbehandeltes Replikat, das alle Komponenten eines Prüfsystems enthält. Diese Probe wird mit prüfchemikalienbehandelten Proben und anderen Kontrollproben mitgeführt, um festzustellen, ob das Lösungsmittel/Vehikel mit dem Prüfsystem interagiert.

Gemisch: Ein Gemisch oder eine Lösung, die aus zwei oder mehreren Stoffen besteht.

Einkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens 80 % w/w vorhanden ist.

Mehrkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens ≥ 10 % w/w und < 80 % w/w vorhanden sind. Ein mehrkomponentiger Stoff ist das Ergebnis eines Herstellungsprozesses. Der Unterschied zwischen einem Gemisch und einem mehrkomponentigen Stoff besteht darin, dass ein Gemisch durch die Mischung von zwei oder mehr Stoffen ohne chemische Reaktion entsteht. Ein mehrkomponentiger Stoff wird durch eine chemische Reaktion gebildet.

Positivkontrolle: Ein Replikat, das alle Komponenten eines Prüfsystems enthält und mit einem Stoff behandelt wird, der bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Um sicherzustellen, dass Abweichungen bei der Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

Prähaptene: Chemikalien, die erst nach einer abiotischen Umwandlung zu Sensibilisatoren werden

Prohaptene: Chemikalien, die ihr Hautsensibilisierungspotenzial erst durch eine enzymatische Bioaktivierung erlangen

Relative Fluoreszenzintensität (RFI): Relative Werte der geometrischen mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in chemisch behandelten Zellen im Vergleich zu MFI in mit Lösungsmittel/Vehikel behandelten Zellen.

Relevanz: Beschreibung der Beziehung zwischen dem Test und der untersuchten Wirkung und ob der Test aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Die Relevanz gibt an, inwieweit der Test die untersuchte biologische Wirkung richtig misst oder vorhersagt. Sie berücksichtigt auch die Genauigkeit (Übereinstimmung) einer Prüfmethode (21).

Zuverlässigkeit: Maß der Reproduzierbarkeit einer Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien über einen längeren Zeitraum und bei einheitlichem Protokoll. Die Zuverlässigkeit wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit und Intralabor-Wiederholbarkeit bewertet (21).

Durchlauf: Ein Durchlauf besteht aus einer oder mehreren hintereinander getesteten Prüfchemikalien mit einer Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle und mit einer Positivkontrolle.

Sensitivität: Der Anteil aller positiven/wirkungsvollen Chemikalien, die durch den Test korrekt eingestuft werden. Sie ist ein Maß der Genauigkeit eines Tests mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (21).

Färbepuffer: Eine mit Phosphat gepufferte Kochsalzlösung mit 0,1 % Rinderserumalbumin.

Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle: Eine unbehandelte Probe, die sämtliche Komponenten eines Prüfsystems enthält, außer der Prüfchemikalie, aber einschließlich des verwendeten Lösungsmittels/Vehikels. Sie wird verwendet, um die Referenzreaktion für die mit der Prüfchemikalie behandelten Proben, die im selben Lösungsmittel oder Vehikel aufgelöst oder stabil verteilt wurden, zu bestimmen. Wenn mit einer simultanen Medienkontrolle geprüft wird, zeigt diese Probe außerdem, ob das Lösungsmittel oder Vehikel mit dem Prüfsystem interagiert.

Spezifität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft werden. Dies ist ein Maß der Genauigkeit für eine Prüfmethode, die zu kategorischen Ergebnissen führt, und ein wichtiger Aspekt bei der Beurteilung der Relevanz einer Prüfmethode (21).

Stoff: Ein chemisches Element und seine Verbindungen im natürlichen Zustand oder durch ein Produktionsverfahren, die einen Zusatzstoff induzieren, der zur Erhaltung seiner Stabilität erforderlich ist, sowie Verunreinigungen, die aus dem verwendeten Prozess stammen, aber mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die getrennt sein können, ohne die Stabilität des Stoffes zu beeinträchtigen oder seine Zusammensetzung zu ändern.

Prüfchemikalie: Stoffe oder Gemische, die mit dieser Methode geprüft wurden.

Globales Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (UN-GHS): Ein System, das die Einstufung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) gemäß normierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und Umweltgefahren vorschlägt und entsprechende Kommunikationselemente wie Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenberichte, Berichte zu Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitsdatenblätter anspricht, damit Informationen zu Nebenwirkungen mit Blick auf den Schutz von Menschen (einschließlich Mitarbeitern, Arbeitern, Logistikern, Verbrauchern und Ersthelfern) und der Umwelt zu übermitteln (23).

UVCB: Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Gültiger Test: Ein Test, von der angenommen wird, dass sie über ein ausreichendes Maß an Relevanz und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck verfügt und die auf wissenschaftlich bewährten Prinzipien basieren. Ein Test ist niemals in einem absoluten Sinn gültig, sondern nur im Verhältnis zu einem definierten Zweck (21).

Anlage 1.2

LEISTUNGSSTOFFE

Vor der routinemäßigen Anwendung des in dieser Anlage zur Prüfmethode B.71 beschriebenen Tests sollten Labors ihre technische Leistungsfähigkeit demonstrieren, indem sie die erwartete h-CLAT-Vorhersage für die in Tabelle 1 empfohlenen 10 Leistungsstoffe korrekt ermitteln und die CV75-, EC150- und EC200-Werte, die in den betreffenden Referenzbereich fallen, bei mindestens 8 der 10 Leistungsstoffe bestimmen. Diese Leistungsstoffe wurden so ausgewählt, dass sie die Bandbreite von Reaktionen im Hinblick auf die Gefahr einer Hautsensibilisierung repräsentieren. Weitere Auswahlkriterien betrafen die Erhältlichkeit der Chemikalien im Handel, die Verfügbarkeit hochwertiger In-vivo-Referenzdaten und die Verfügbarkeit hochwertiger In-vitro-Daten aus der h-CLAT-Prüfmethode. Außerdem sind veröffentlichte Referenzdaten für die h-CLAT-Methode verfügbar (3) (14).

Tabelle 1

Empfohlene Stoffe zum Nachweis der technischen Leistungsfähigkeit mit der h-CLAT-Methode

Leistungsstoffe	**CAS-Nr.**	**Aggregat-zustand**	In-vivo-**Vorhersage** [1]	**CV75 Referenz Bereich in µg/ml** [2]	**h-CLAT-Ergebnisse für CD86 (EC150-Referenzbereich in µg/ml)** [2]	**h-CLAT-Ergebnisse für CD54 (EC200-Referenzbereich in µg/ml)** [2]
2,4-Dinitrochlorbenzol	97-00-7	fest	Sensibilisator (extrem)	2–12	positiv (0,5–10)	positiv (0,5–15)
4-Phenylenediamin	106-50-3	fest	Allergen (stark)	5–95	positiv (< 40)	negativ (> 1,5) [3]
Nickelsulfat	10101-97-0	fest	Allergen (mäßig)	30–500	positiv (< 100)	positiv (10–100)
2-Mercaptbenzothiazol	149-30-4	fest	Allergen (mäßig)	30–400	negativ (> 10) [3]	positiv (10–140)
R(+)-Limonen	5989-27-5	flüssig	Allergen (schwach)	> 20	negativ (> 5) [3]	positiv (< 250)
Imidazolidinylharnstoff	39236-46-9	fest	Sensibilisator (schwach)	25–100	positiv (20–90)	positiv (20–75)
Isopropanol	67-63-0	flüssig	Nichsensibilisa-tor	> 5 000	negativ (> 5 000)	negativ (> 5 000)
Glyzerin	56-81-5	flüssig	Nichtsensibilisa-tor	> 5 000	negativ (> 5 000)	negativ (> 5 000)
Milchsäure	50-21-5	flüssig	Nichsensibilisa-tor	1500–500-0	negativ (> 5000)	negativ (> 5000)
4-Aminobenzoesäure	150-13-0	fest	Nichsensibilisa-tor	> 1 000	negativ (> 1 000)	negativ (> 1000)

Abkürzungen: CAS-Nr. = Registernummer des Chemical Abstracts Service

[1] Die In-vivo-Gefahren- und (Potenz-)Vorhersagen basieren auf Daten des LLNA (3) (14). Die In-vivo-Potenz wird unter Anwendung der von ECETOC vorgeschlagenen Kriterien abgeleitet (24).

[2] Gestützt auf historische beobachtete Werte (13) (25).

[3] Historisch gesehen wurde eine Mehrzahl von negativen Ergebnissen für diesen Marker erhalten und deshalb ist ein negatives Ergebnis zu erwarten. Der vorgegebene Bereich wurde auf Basis der wenigen beobachteten historischen positiven Ergebnisse definiert. Falls ein positives Ergebnis ermittelt wird, sollte der EC-Wert innerhalb des eingetragenen Referenzbereichs liegen.

Anlage 2

IN-VITRO-HAUTSENSIBILISIERUNG: U937-AKTIVIERUNGSTEST MIT ZELLLINIEN (U-SENS™)

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

1. Der U-SENS™-Test quantifiziert die Änderungen der Expression von Zelloberflächenmarkern in Zusammenhang mit dem Aktivierungsprozess von Monozyten und dendritischen Zellen (DC) (d. h. CD86) in der humanen histiozytären Lymphom-Zelllinie U937 nach einer Exposition gegenüber Allergenen (1). Die gemessenen Expressionswerte des Zelloberflächenmarkers CD86 in der Zelllinie U937 werden dann zur Unterstützung der Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren verwendet.

2. Der U-SENS™-Test wurde in einer von L'Oreal koordinierten Validierungsstudie (2) und anschließend in einer unabhängigen Begutachtung durch den EURL ECVAM wissenschaftlichen beratenden Ausschuss (ESAC) (3) des Referenzlabors der europäischen Union für Alternativen zu Tierversuchen (EURL ECVAM) bewertet. Unter Berücksichtigung sämtlicher verfügbarer Nachweise und Informationen von Behörden und Interessenträgern wurde U-SENS™ von EURL ECVAM (4) empfohlen, um als Teil eines IATA verwendet zu werden, um die Unterscheidung zwischen Allergenen und Nichtsensibilisatoren zum Zweck der Gefahreneinstufung und Etikettierung zu unterstützen. In ihrem Leitfaden zur Berichterstattung strukturierter Ansätze zur Datenintegration und individuellen Informationsquellen, die innerhalb von IATA für die Hautsensibilisierung verwendet werden, diskutiert die OECD derzeit eine Anzahl an Fallstudien, die verschiedene Teststrategien und Vorhersagemodelle beschreiben. Einer der anders definierten Ansätze basiert auf dem U-SENS-Test (5). Beispiele für die Verwendung der U-SENS™-Daten in Kombination mit anderen Informationen, einschließlich historischer Daten und vorhandener gültiger menschlicher Daten (6), werden auch an anderer Stelle in der Literatur aufgeführt (4) (5) (7).

3. Der U-SENS™-Test erwies sich als übertragbar auf Labore mit Erfahrung auf dem Gebiet der Zellkulturtechniken und der Durchflusszytometrieanalyse haben. Der Grad der Reproduzierbarkeit, der bei der Prüfmethode erwartet werden kann, liegt in der Größenordnung von 90 % und 84 % innerhalb und zwischen Labors (8). Die Ergebnisse der Validierungsstudie (8) und veröffentlichter Studien (1) weisen insgesamt darauf hin, dass die Genauigkeit bei der Unterscheidung von Hautsensibilatoren (d. h. UN-GHS-/CLP-Kategorie 1) gegenüber Nichtsensibilisatoren 86 % (N = 166) bei einer Empfindlichkeit von 91 % (118/129) und einer Spezifität von 65 % (24/37) im Vergleich zu den Ergebnissen des LLNA beträgt. Verglichen mit menschlichen Ergebnissen beträgt die Genauigkeit bei der Unterscheidung von Hautallergenen (d. h. UN-GHS/CLP Kat.1) von Nichtsensibilisatoren 77 % (N = 101) mit einer Sensitivität von 100 % (58/58) und einer Spezifität von 47 % (20/43). Im Vergleich zu LLNA ist bei falsch negativen Vorhersagen mit dem U-SENS™ die Chance größer, dass Chemikalien mit geringer bis mittlerer Hautsensibilisierungspotenz betroffen sind (d. h. UN-GHS/CLP-Unterkategorie 1B), als Chemikalien mit hoher Hautsensibilisierungspotenz (d. h. UN-GHS/CLP-Unterkategorie 1A) (1) (8) (9). Zusammenfassend geben diese Informationen an, wie nützlich sich der U-SENS™-Test bei der Beteiligung an der Identifikation von Hautsensibilisierungsgefahren erweist. Jedoch sind die Genauigkeitswerte, die hier für U-SENS™ als eigenständiger Test angegeben werden, lediglich als Anhaltspunkte zu betrachten, da die Prüfmethode in Kombination mit anderen Informationsquellen im Rahmen eines IATA sowie gemäß den Bestimmungen unter Nummer 7 und 8 der allgemeinen Einleitung betrachtet werden sollte. Darüber hinaus sollte bei der Bewertung von Prüfmethoden zur Hautsensibilisierung ohne Tierversuche beachtet werden, dass der LLNA-Test sowie andere Tierversuche die Situation bei Menschen nicht vollständig widerspiegeln.

4. Auf der Basis der aktuell verfügbaren Daten wurde gezeigt, dass der U-SENS™-Test auf Prüfchemikalien angewandt werden kann (einschließlich Zutaten von Kosmetika, z. B. Konservierungsmittel, Tenside, Aktivstoffe, Farbstoffe), die eine Vielfalt an organischen Funktionsgruppen, physikalisch-chemischen Eigenschaften, Hautsensibilisierungspotenzial (wie in In-vivo-Studien festgelegt) und das Spektrum der Wirkmechanismen, das für seine Assoziation mit der Hautsensibilisierung bekannt ist, abdecken (d. h. Michael-Akzeptor, Schiff-Basisbildung, Acylübertragungsmittel, Substitution nukleophil bimolekular [SN2] oder nukleophile aromatische Substitution [SNAr]) (1) (8) (9) (10). Der U-SENS™-Test gilt für Prüfchemikalien, die löslich sind oder eine stabile Dispersion (d. h. ein Kolloid oder eine Suspension, in denen die Prüfchemikalie sich nicht absetzt oder vom Lösungsmittel/Vehikel in verschiedene Phasen trennt) in einem geeigneten Lösungsmittel/Vehikel bilden (siehe Abschnitt 13). Im Datensatz eingetragene Chemikalien, die Prähaptene (d. h. durch Oxidierung aktivierte Stoffe) oder Prohaptene (d. h. Stoffe, die eine enzymatische Aktivierung erfordern, wie beispielsweise über P450-Enzyme) sind, wurden von U-SENS™ korrekt vorhergesagt (1) (10).Membranschädigende

Stoffe können aufgrund einer nichtspezifischen Erhöhung der CD86-Expression zu falsch positiven Ergebnissen führen, da 3 von 7 falsch positiven Ergebnissen in Bezug auf die In-vivo-Referenzeinstufung Tenside waren (1). Solche positiven Ergebnisse mit Tensiden sollen mit Vorsicht betrachtet werden, während negative Ergebnisse mit Tensiden weiterhin genutzt werden können, um die Identifizierung der Prüfchemikalie als Nichtsensibilisator zu unterstützen. Fluoreszierende Prüfchemikalien können mit U-SENS™ (1) bewertet werden. Dennoch beeinträchtigen stark fluoreszierende Prüfchemikalien, die mit derselben Wellenlänge ausstrahlen wie Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) oder Propidiumjodid (PI) die durchflusszytometrische Erkennung und können daher nicht korrekt mithilfe von mit FITC-konjugierten Antikörpern (potenziell falsch negativ) oder PI (Viabilität nicht messbar) bewertet werden. In einem solchen Fall können andere mit Fluorochrom markierte Antikörper bzw. andere Zytotoxizitätsmarker verwendet werden, solange aufgezeigt werden kann, dass sie ähnliche Ergebnisse liefern wie die mit FITC markierten Antikörper oder PI (siehe Abschnitt 18), z. B. durch Testen der Leistungsstoffe in Anlage 2.2. Angesichts der vorstehenden Ausführungen sollten positive Ergebnisse mit Tensiden und negative Ergebnisse mit stark fluoreszierenden Prüfchemikalien im Kontext der angegebenen Grenzen und in Verbindung mit anderen Informationsquellen im Rahmen von IATA interpretiert werden. In Fällen, in denen die Nichtanwendbarkeit des U-SENS™-Tests bei anderen spezifischen Kategorien von Prüfchemikalien nachgewiesen wird, sollte sie bei diesen spezifischen Kategorien nicht verwendet werden.

5. Der U-SENS™-Test unterstützt, wie bereits oben erwähnt, die Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren. Er kann jedoch bei Verwendung im Rahmen von integrierten Ansätzen wie IATA möglicherweise auch zur Bewertung der Sensibilisierungspotenz beitragen. Es sind allerdings weitere Untersuchungen erforderlich, vorzugsweise auf der Grundlage von Humandaten, um herauszufinden, inwieweit die Ergebnisse von U-SENS™ möglicherweise zur Potenzbewertung herangezogen werden können.

6. Definitionen sind Anlage 2.1 zu entnehmen.

Prinzip Der Prüfmethode

7. Der U-SENS™-Test ist ein In-vitro-Test, der Änderungen der Expression von CD86-Zelloberflächenmarkern auf einer humanen histiozytären Lymphom-Zelllinie, U937-Zellen, nach einer Exposition von 45 ± 3 Stunden gegenüber der Prüfchemikalie quantifiziert. Der Oberflächenmarker CD86 ist ein typischer Marker der U937-Aktivierung. CD86 ist dafür bekannt, ein ko-stimulierendes Molekül zu sein, das eine monozytische Aktivierung nachahmen kann, die eine wichtige Rolle beim T-Zellen-Priming spielt. Die Änderungen der Expression von Oberflächenmarkern von CD86 werden anhand der Durchflusszytometrien nach einer Zellfärbung, die typischerweise mit Antikörpern erfolgt, die mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markiert wurden, gemessen. Die Zytotoxizitätsmessung wird ebenfalls zur gleichen Zeit durchgeführt (z. B. durch die Verwendung von PI), um zu beurteilen, ob die Hochregulierung der Expression von CD86-Zelloberflächenmarkern bei Konzentrationen unterhalb des zytotoxischen Werts auftritt. Der Stimulationsindex (S.I.) des CD86-Zelloberflächenmarkers im Vergleich zur Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle wird berechnet und im Vorhersagemodell verwendet (siehe Abschnitt 19), um die Unterscheidung zwischen Allergenen und Nichsensibilisatoren zu unterstützen.

Nachweis Der Kompetenz

8. Vor der routinemäßigen Verwendung des unter dieser Anlage zur Prüfmethode B.71 beschriebenen Tests sollten Laboratorien ihre technische Kompetenz anhand der zehn in Anlage 2.2 aufgeführten Leistungsstoffe in Übereinstimmung mit bewährten In-vitro-Verfahren nachweisen (11). Darüber hinaus sollten Testbenutzer eine historische Datenbank der mit den Reaktivitätstests (siehe Abschnitt 11) und mit den positiven and Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen (siehe Abschnitte 15-16) erzeugten Daten pflegen und diese Daten nutzen, um zu bestätigen, dass die Reproduzierbarkeit des Tests in ihrem Labor mit der Zeit aufrechterhalten wird.

Verfahren

9. Dieser Test basiert auf dem U-SENS™ DataBase-Dienst zu Alternativmethoden für Tierversuche (DB-ALM) Protokoll Nr. 183 (12). Die Standardarbeitsanweisungen (SOP) sollten bei der Umsetzung und Verwendung des U-SENS™-Tests im Labor angewandt werden. Es kann ein automatisiertes System zur Durchführung von U-SENS™ verwendet werden, wenn aufgezeigt werden kann, dass es ähnliche Ergebnisse liefert, beispielsweise durch Testen der Leistungsstoffe in Anlage 2.2. Nachfolgend werden die wichtigsten Komponenten und Verfahren für den U-SENS™-Test beschrieben.

Vorbereitung der Zellen

10. Die humane histiozytäre Lymphom-Zelllinie U937 (13) sollte zur Durchführung des U-SENS™-Tests verwendet werden. Zellen (Klon CRL1593.2) sollten aus einer gut qualifizierten Zellbank wie der American Type Culture Collection entnommen werden.

11. U937-Zellen werden bei 37 °C unter 5 % CO_2 und einer befeuchteten Atmosphären in einem mit 10 % fetales Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin angereicherten RPMI-1 640-Medium (vollständiges Medium) kultiviert. U937-Zellen werden regelmäßig alle 2–3 Tage bei einer Dichte von 1,5 bzw. 3×10^5 Zellen/ml passagiert. Die Zelldichte sollte 2×10^6 Zellen/ml nicht überschreiten und die Zellviabilität, die anhand des Trypanblau-Ausschlusses gemessen wird, sollte ≥ 90 % betragen (nach dem Auftauen nicht an der ersten Passage anwenden). Vor ihrer Verwendung zu Testzwecken sollte jede Charge von Zellen, FCS oder Antikörpern qualifiziert werden, indem ein Reaktivitätstest durchgeführt wird. Der Reaktivitätstest der Zellen sollte mithilfe der Positivkontrolle, Picrylsulfonsäure (2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure: TNBS) (CASRN 2 508-19-2, ≥ 99 % Reinheit) und der Negativkontrolle Milchsäure (LA) (CASRN 50-21-5, ≥ 85 % Reinheit) mindestens eine Woche nach dem Auftauen durchgeführt werden. Beim Reaktivitätstest sollten sechs endgültige Konzentrationen für jede der 2 Kontrollen geprüft werden (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 µg/ml und LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml). In vollständigem Medium gelöste TNBS sollte eine positive und von der Konzentration abhängige Wirkung auf CD86 zeigen (z. B. wenn auf eine positive Konzentration, CD86 S.I. ≥ 150, eine Konzentration mit steigendem CD86 S.I folgt), und in vollständigem Medium gelöste LA sollte eine negative Wirkung auf CD86 zeigen (siehe Abschnitt 21). Nur die Chargen von Zellen, welche den Reaktivitätstest zwei Mal bestanden haben, dürfen für den Test verwendet werden. Zellen können bis zu sieben Wochen nach dem Auftauen gewonnen werden. Die Anzahl an Passagen sollte 21 nicht übersteigen. Der Reaktivitätstest sollte gemäß den in den Abschnitten 18–22 beschriebenen Verfahren durchgeführt werden.

12. Zur Prüfung werden die U937-Zellen bei einer Dichte von entweder 3×10^5 Zellen/ml oder 6×10^5 Zellen/ml ausgesät und in Kulturkolben 2 bzw. 1 Tag lang vorgezüchtet. Andere vorgezüchtete Bedingungen als diejenigen, die oben beschrieben werden, können verwendet werden, wenn eine ausreichende wissenschaftliche Begründung vorliegt und wenn gezeigt werden kann, dass ähnliche Ergebnisse geliefert werden, beispielsweise durch Testen der Leistungsstoffe in Anlage 2.2. Am Testtag werden die Zellen, die aus dem Kulturkolben geerntet wurden, mit einem frischen Kulturmedium mit 5×10^5 Zellen/ml neu angesetzt. Dann werden die Zellen in einer flachen Platte mit 96 Mulden mit 100 µl verteilt (endgültige Zelldichte von $0{,}5 \times 10^5$ Zellen/Mulde).

Vorbereitung der Prüfchemikalien und Kontrollstoffe

13. Die Beurteilung der Löslichkeit wird vor dem Test vorgenommen. Zu diesem Zweck werden die Prüfchemikalien bei einer Konzentration von 50 mg/ml in vollständigem Medium als erste Lösungsmitteloption oder Dimethylsulfoxid (DMSO,≥ 99 % Reinheit) als zweite Lösungsmittel-/Vehikeloption gelöst oder stabil verteilt, wenn die Prüfchemikalie nicht im Lösungsmittel/Vehikel des vollständigen Mediums löslich ist. Beim Test wird die Prüfchemikalie auf eine endgültige Konzentration von 0,4 mg/ml im vollständigen Medium gelöst, wenn die Chemikalie in diesem Lösungsmittel/Vehikel löslich ist. Wenn die Chemikalie nur in DMSO löslich ist, wird die Chemikalie bei einer Konzentration von 50 mg/ml gelöst. Andere als die oben beschriebenen Lösungsmittel/Vehikel können verwendet werden, wenn eine ausreichende wissenschaftliche Begründung gegeben ist. Die Stabilität der Prüfchemikalie im endgültigen Lösungsmittel/Vehikel sollte berücksichtigt werden.

14. Die Prüfchemikalien sowie die Kontrollstoffe werden am Tag des Tests vorbereitet. Da kein Test zur Dosisfindung durchgeführt wird, sollten für den ersten Durchlauf 6 endgültige Konzentrationen (1, 10, 20, 50, 100 und 200 µg/ml) im entsprechenden Lösungsmittel/Vehikel entweder in vollständigem Medium oder in 0,4 % DMSO im Medium geprüft werden. Bei den nachfolgenden Durchläufen sollten, ausgehend von den 0,4 mg/ml im vollständigen Medium oder 50 mg/ml in DMSO-Lösungen der Prüfchemikalie, mindestens 4 Arbeitslösungen mithilfe des entsprechenden Lösungsmittels/Vehikels vorbereitet werden (d. h. mindestens 4 Konzentrationen). Die Arbeitslösungen werden schließlich für die Behandlung verwendet, indem eine gleiche Menge der U937-Zellsuspension (siehe Abschnitt 11 oben) zum Volumen der Arbeitslösung in der Platte hinzugefügt wird, um eine weitere zweifache Verdünnung zu erhalten (12). Die Konzentrationen (mindestens 4 Konzentrationen) für weitere Durchläufe werden auf der Grundlage der individuellen Ergebnisse sämtlicher vorheriger Durchläufe gewählt (8). Die nutzbaren endgültigen Konzentrationen sind 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 und 200 µg/ml. Die höchste endgültige Konzentration beträgt 200 µg/ml.Wenn ein CD86 positiver Wert

bei 1 µg/ml beobachtet wird, dann werden 0,1 µg/ml bewertet, um die Konzentration der Prüfchemikalie zu finden, die CD86 nicht über dem positiven Schwellenwert induziert. Bei jedem Durchlauf wird der EC150 (Konzentration, bei der eine Chemikalie den positiven Schwellenwert für CD86 von 150 % erreicht, siehe Abschnitt 19) berechnet, falls eine positive Konzentrationswirkung für CD86 beobachtet wird. Wo die Prüfchemikalie eine positive CD86-Wirkung induziert, die nicht von der Konzentration abhängig ist, ist eine Berechnung von EC150 eventuell nicht relevant, wie dies im U-SENS™ DB-ALM Protokoll Nr. 183 (12) beschrieben wird. Bei jedem Durchlauf wird CV70 (Konzentration, bei der eine Chemikalie die Zytotoxizitätsschwelle von 70 % erreicht, siehe Abschnitt 19) wo immer möglich berechnet (12). Um den Konzentrationswirkungseffekt der CD86-Steigung zu untersuchen sollten Konzentrationen aus den verwendbaren Konzentrationen gleichmäßig zwischen EC150 (oder der höchsten CD86 negativen, nicht zytotoxischen Konzentration) und CV70 (oder der höchsten zulässigen Konzentration, d. h. 200 µg/ml) verteilt gewählt werden. Es sollten pro Durchlauf mindestens 4 Konzentrationen geprüft werden, wobei zu Vergleichszwecken mindestens 2 Konzentrationen mit den vorherigen Durchläufen übereinstimmen sollten.

15. Die im U-SENS™-Test verwendete Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle ist ein vollständiges Medium (für gelöste oder stabil im vollständigen Medium verteilte Prüfchemikalien) (siehe Abschnitt 4) oder 0,4 % DMSO in vollständigem Medium (für in DMSO gelöste oder stabil verteilte Prüfchemikalien).

16. Die im U-SENS™-Test verwendete Positivkontrolle ist TNBS (siehe Abschnitt 11), die in vollständigem Medium vorbereitet wird. TNBS sollte als Positivkontrolle für die CD86-Expressionsmessung mit einer endgültigen einzelnen Konzentration in der Platte (50 µg/ml) verwendet werden, die > 70 % der Zellviabilität erbringt. Um eine Konzentration von 50 µg/ml TNBS in der Platte zu erhalten, wird eine Stammlösung von 1M (d. h. 293 mg/ml) TNBS im vollständigen Medium vorbereitet und 2 930-fach mit dem vollständigen Medium in einer Arbeitslösung von 100 µg/ml verdünnt. Milchsäure (LA, CAS 50-21-5) sollte bei 200 µg/ml in vollständigem Medium gelöst als Negativkontrolle verwendet werden (von einer Stammlösung von 0,4 mg/ml). In jeder Platte jedes Durchlaufs werden drei Replikate der unbehandelten Kontrolle, Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle, Positiv- und Negativkontrollen im vollständigen Medium vorbereitet (12). Andere geeignete Positivkontrollen können verwendet werden, sofern historische Daten für die Ableitung vergleichbarer Akzeptanzkriterien für einen Testdurchlauf zur Verfügung stehen. Die Akzeptanzkriterien des Durchlaufs entsprechen denen, die für die Prüfchemikalie beschrieben wurden (siehe Abschnitt 12).

Applikation der Prüfchemikalien und Kontrollstoffe

17. Die Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle oder die Arbeitslösungen, die in den Abschnitten 14–16 beschrieben werden, werden 1:1 (v/v) mit den in der flachen Platte mit 96 Mulden vorbereiteten Zellsuspensionen gemischt (siehe Abschnitt 12). Die behandelten Platten werden dann 45 ± 3 Stunden bei 37 °C unter 5 % CO_2 inkubiert. Vor der Inkubation werden die Platten mit einer semipermeablen Membran versiegelt, um eine Verdampfung von flüchtigen Prüfchemikalien und eine Kreuzkontaminierung zwischen den mit den Prüfchemikalien behandelten Zellen zu vermeiden (12).

Zellfärbung

18. Nach einer Expositionszeit von 45 ± 3 Stunden werden die Zellen in eine V-förmige Mikrotiterplatte übertragen und durch Zentrifugierung gesammelt. Die Löslichkeitsinterferenz ist definiert als Kristalle oder Tropfen, die 45 ± 3 Stunden nach der Behandlung (vor der Zellfärbung) unter dem Mikroskop beobachtet werden. Die Tenside werden entsorgt und die verbleibenden Zellen werden einmal mit 100 µl eiskalter mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) mit 5 % fetalem Kälberserum (Färbepuffer) gewaschen. Nach der Zentrifugierung werden die Zellen mit 100 µl Färbepuffer resuspensiert und mit 5 µl (z. B. 0,25 µg) mit FITC markierten anti-CD86- oder Maus-IgG1-Antikörpern (Isotyp) bei 4 °C 30 Minuten lang vor Licht geschützt. Die im U-SENS™ DB-ALM Protokoll Nr. 183 (12) beschriebenen Antikörper sollten verwendet werden (für CD86: BD-PharMingen #5556 57 Klon: Fun-1, oder Caltag/Invitrogen # MHCD8601 Klon: BU63; und für IgG1: BD-PharMingen #5557 48, oder Caltag/Invitrogen # GM4992). Nach Erfahrung der Testentwickler ist die Fluoreszenzintensität der Antikörper normalerweise zwischen verschiedenen Chargen konsistent. Andere Klone oder Lieferanten der Antikörper, welche den Reaktivitätstest bestanden haben, können für den Test verwendet werden (siehe Abschnitt 11). Benutzer können jedoch erwägen, die Antikörper unter den Bedingungen im eigenen Labor zu titrieren, um die beste Gebrauchskonzentration zu definieren. Andere Erkennungssystem, z. B.mit Fluorochrom markierte anti-CD86-Antikörper, können verwendet werden, wenn gezeigt

werden kann, dass sie ähnliche Ergebnisse wie mit FITC konjugierte Antikörper liefern, beispielsweise durch Testen der Leistungsstoffe in Anlage 2.2. Die Zellen werden zweimal mit 100 µl Färbepuffer und einmal mit 100 µl einer eiskalten PBS gewaschen und anschließend in eiskalter PBS resuspensiert (z. B. 125 µl für Proben, die manuell Röhrchen für Röhrchen analysiert werden, oder 50 µl mithilfe einer Autosampler-Platte) und PI-Lösung wird hinzugefügt (endgültige Konzentration von 3 µg/ml). Andere Zytotoxizitätsmarker wie 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) oder Trypanblau können verwendet werden, wenn gezeigt werden kann, dass die alternativen Farbstoffe ähnliche Ergebnisse liefern wie PI, zum Beispiel durch Testen der Leistungsstoffe in Anlage 2.2.

Durchflusszytometrieanalyse

19. Die Expressionswerte von CD86 und die Zellviabilität werden mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Zellen werden in einem Größen- (FSC) und Granularitäts- (SSC) Dot-Plot angezeigt, der auf eine log-Skala eingestellt ist, um die Population eindeutig in einem ersten Gate R1 zu identifizieren und die Verschmutzung zu beseitigen. Für jede Mulde wird eine Sollgesamtmenge von 10 000 Zellen in Gate R1 aufgenommen. Zellen vom selben R1-Gate werden in einem FL3- oder FL4 / SSC-Dot-Plot angezeigt. Lebensfähige Zellen werden dargestellt, indem ein zweites Gate R2 platziert wird, das die Population von Propidiumjodid-negativen Zellen auswählt (FL3- oder FL4-Kanal). Die Zellviabilität kann anhand der folgenden Gleichung über das Zytometeranalyseprogramm berechnet werden. Wenn die Zellviabilität gering ist, könnten bis zu 20 000 Zellen einschließlich toter Zellen aufgenommen werden. Alternativ können die Daten eine Minute nach der Einleitung der Analyse aufgenommen werden.

$$Zellviabilität = \frac{Anzahl\ der\ lebenden\ Zellen}{Gesamtzahl\ der\ aufgenommenen\ Zellen} \times 100$$

Die Prozentzahl der FL1-positiven Zellen wird dann unter diesen lebensfähigen Zellen gemessen, die in R2 eingeschlossen sind (innerhalb von R1). Die Zelloberflächenexpression von CD86 wird in einem FL1- / SSC-Dot-Plot analysiert, das auf lebensfähigen Zellen eingeschlossen ist (R2).

Bei den vollständiges Medium/IgG1-Mulden befindet sich der Analysemarker in der Nähe der Hauptpopulation, sodass die Kontrollen des vollständigen Mediums einen IgG1 im Sollbereich von 0,6 bis 0,9 % aufweisen.

Die Farbinterferenz wird definiert als eine Verlagerung des mit FITC markierten IgG1-Dot-Plots (IgG1 FL1 geo. Mittelw. S.I. ≥ 150 %).

Der Stimulationsindex (S.I.) von CD86 für Kontrollzellen (unbehandelt oder in 0,4 % DMSO) und chemisch behandelte Zellen wird gemäß der folgenden Gleichung berechnet:

$$S.I. = \frac{\%\ von\ CD86^{+} behandelte\ Zellen - \%\ von\ IgG1^{+} behandelte\ Zellen}{\%\ von\ CD86^{+} Kontrollzellen - \%\ von\ IgG1^{+} Kontrollzellen} \times 100$$

% von $IgG1^{+}$ unbehandelte Kontrollzellen: bezeichnet als Prozentzahl der FL1-positiven IgG1-Zellen, die mit dem Analysemarker (zulässiger Bereich von ≥ 0,6 % und < 1,5 %, siehe Abschnitt 22) unter den lebensfähigen unbehandelten Zellen definiert wurden.

% von $IgG1^{+}/CD86^{+}$ Kontrolle/behandelte Zellen: bezeichnet als Prozentzahl von FL1-positiven IgG1/CD86-Zellen, die ohne Verlagerung des Analysemarkers unter den lebensfähigen Kontroll-/behandelten Zellen gemessen werden.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Datenauswertung

20. Die folgenden Parameter werden im U-SENS™-Test berechnet: CV70-Wert, d. h. eine Konzentration, die 70 % des U937-Zellüberlebens (30 % Zytotoxizität) zeigt, und der EC150-Wert, d. h. die Konzentration, bei der die Prüfchemikalien einen CD86-Stimulationsindex (S.I.) von 150 % induzierten.

CV70 wird anhand der log-linearen Interpolation mithilfe der folgenden Gleichung berechnet:

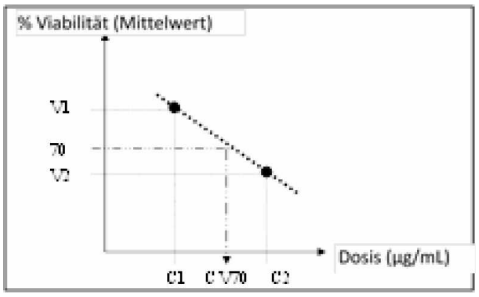
CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 – V2) * (C2 – C1)]

Dabei gilt:

V1 ist der Mindestwert der Zellviabilität über 70 %

V2 ist der Höchstwert der Zellviabilität unter 70 %

C1 und C2 sind die Konzentrationen, die den Wert der Zellviabilität V1 bzw. V2 zeigen.



Weitere Ansätze zur Ableitung von CV70 können angewandt werden, solange demonstriert wird, dass dies keinen Einfluss auf die Ergebnisse hat (z. B. durch Testen der Leistungsstoffe).

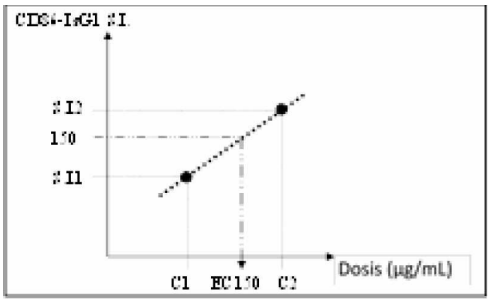
EC150 wird anhand der log-linearen Interpolation mithilfe der folgenden Gleichung berechnet:

EC150 = C1 + [(150 – S.I.1) / (S.I.2 – S.I.1) * (C2 – C1)]

Dabei gilt:

C1 ist die höchste Konzentration in µg/ml mit einem CD86 S.I. < 150 % (S.I. 1)

C2 ist die niedrigste Konzentration in µg/ml mit einem CD86 S.I. ≥ 150 % (S.I. 2)



Die EC150- und CV70-Werte wurden für jeden

— Durchlauf berechnet: die individuellen EC150- und CV70-Werte wurden als Werkzeuge zur Untersuchung des Konzentrationswirkungseffekts der CD86-Steigung verwendet (siehe Abschnitt 14),

— gestützt auf die durchschnittlichen Lebensfähigkeiten wird der CV70-Gesamtwert bestimmt (12),

— gestützt auf die durchschnittlichen S.I. der CD86-Werte wird der EC150-Gesamtwert für die mit U-SENS™ als POSITIV vorhergesagte Prüfchemikalie bestimmt (siehe Abschnitt 21) (12).

Vorhersagemodell

21. Bei der CD86-Expressionsmessung wird jede Prüfchemikalie in mindestens vier Konzentrationen und in mindestens zwei unabhängigen Durchläufen geprüft (an unterschiedlichen Tagen durchgeführt), um eine einzelne Vorhersage abzuleiten (NEGATIV oder POSITIV).

— Die individuelle Schlussfolgerung eines U-SENS™-Durchlaufs wird als Negativ (nachfolgend als „N" bezeichnet) angesehen, wenn der S.I. von CD86 bei allen nicht-zytotoxischen Konzentrationen weniger als 150 % beträgt (Zellviabilität ≥ 70 %) und wenn keine Beeinträchtigung beobachtet wird (Zytotoxizität, Löslichkeit: siehe Abschnitt 18 oder Farbe: siehe Abschnitt 19 unabhängig der nicht-zytotoxischen Konzentrationen, bei denen die Beeinträchtigung erkannt wird). In allen anderen Fällen: S.I. von CD86 höher als oder gleich 150 % und/oder Beeinträchtigungen beobachtet, dann wird die individuelle Schlussfolgerung eines U-SENS™-Durchlaufs als Positiv (nachfolgend als „P" bezeichnet) angesehen.

— Eine U-SENS™-Vorhersage wird als NEGATIV angesehen, wenn mindestens zwei unabhängige Durchläufe negativ (N) sind (Abbildung 1). Wenn die ersten zwei Durchläufe beide negativ (N) sind, dann wird die U-SENS™-Vorhersage als NEGATIV angesehen und ein dritter Durchlauf ist nicht erforderlich.

— Eine U-SENS™-Vorhersage wird als POSITIV angesehen, wenn mindestens zwei unabhängige Durchläufe positiv (P) sind (Abbildung 1). Wenn die ersten zwei Durchläufe beide positiv (P) sind, dann wird die U-SENS™-Vorhersage als POSITIV angesehen und ein dritter Durchlauf ist nicht erforderlich.

— Da kein Test zur Dosisfindung durchgeführt wird, gibt es eine Ausnahme, wenn der S.I. von CD86 im ersten Durchlauf höher als oder gleich 150 % bei ausschließlich der höchsten, nicht-zytotoxischen Konzentration ist. Der Durchlauf wird dann als NICHT SCHLÜSSIG angesehen und zusätzliche Konzentrationen (zwischen der höchsten nicht-zytotoxischen Konzentration und der niedrigsten nicht-zytotoxischen Konzentration – siehe Abschnitt 20) sollten in zusätzlichen Durchläufen geprüft werden. Wenn ein Durchlauf als nicht schlüssig identifiziert wird, sollten mindestens 2 zusätzliche Durchläufe vorgenommen werden; ein vierter Durchlauf ist erforderlich, falls die Durchläufe 2 und 3 nicht konkordant sind (N und/oder P unabhängig voneinander) (Abbildung 1). Folgedurchläufe werden auch dann als positiv angesehen, wenn nur eine nicht-zytotoxische Konzentration ein CD86 von 150 % oder mehr ergibt, da die Konzentrationseinstellung für die spezifische Prüfchemikalie angepasst wurde. Die endgültige Vorhersage basiert auf dem Mehrheitsergebnis der drei oder vier individuellen Durchläufe (d. h. 2 von 3 oder 2 von 4) (Abbildung 1).

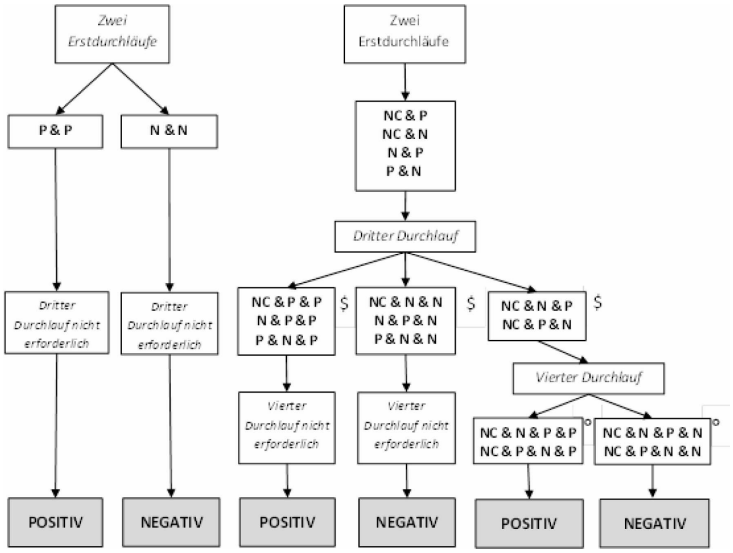


Abb. 1: Beim U-SENS™-Test verwendetes Vorhersagemodell. Eine U-SENS™-Vorhersage sollte im Rahmen eines IATA sowie gemäß den Bestimmungen der Nummer 4 sowie der Nummern 7, 8 und 9 der allgemeinen Einleitung in Betracht gezogen werden

N: Durchlauf ohne Feststellung von CD86 als positiv oder mit Interferenz;

P: Durchlauf mit Feststellung von CD86 als positiv und/oder mit Interferenz(en);

NC: Nicht schlüssig. Erster Durchlauf als nicht schlüssig, wenn CD86 nur bei der höchsten nicht-zytotoxischen Konzentration positiv ist;

#: Eine nicht schlüssige individuelle Schlussfolgerung, die ausschließlich dem ersten Durchlauf zugeschrieben wird, führt automatisch zum Erfordernis eines dritten Durchlaufs, um eine Mehrheit von entweder Positiven (P) oder Negativen (N) Schlussfolgerungen in mindestens 2 von 3 unabhängigen Durchläufen zu erzielen.

$: Die Kästchen zeigen die relevanten Kombinationen der Ergebnisse aus den drei Durchläufen auf der Grundlage der Ergebnisse aus den ersten zwei Durchläufen, die im obigen Kästchen dargestellt sind.

°: Die Kästchen zeigen die relevanten Kombinationen der Ergebnisse aus den vier Durchläufen auf der Grundlage der Ergebnisse aus den ersten drei Durchläufen, die im obigen Kästchen dargestellt sind.

Akzeptanzkriterien

22. Bei der Verwendung des U-SENS™-Tests sollten die folgenden Akzeptanzkriterien erfüllt werden (12).

— Am Ende des Expositionszeitraums von 45 ± 3 Stunden musste die Hauptviabilität der dreifach ausgefertigten unbehandelten U937-Zellen > 90 % sein und es wurde keine Verschiebung der CD86-Expression beobachtet. Die basale CD86-Expression unbehandelter U937-Zellen musste im Bereich von ≥ 2 % und ≤ 25 % liegen.

— Wenn DMSO als ein Lösungsmittel verwendet wird, dann wird die Gültigkeit der DMSO-Vehikelkontrolle durch die Berechnung eines DMSO S.I. im Vergleich zu unbehandelten Zellen bewertet und die Viabilität der dreifach ausgeführten Zellen musste > 90 % liegen. Die DMSO-Vehikelkontrolle ist gültig, wenn der Mittelwert des dreifach ausgeführten CD86 S.I. kleiner als 250 % des Mittelwerts des dreifach ausgeführten CD86 S.I. von unbehandelten U937-Zellen war.

— Die Durchläufe werden als gültig angesehen, wenn mindestens zwei von drei IgG1-Werte von unbehandelten U937-Zellen in den Bereich von ≥ 0,6 % und < 1,5 % gefallen sind.

— Die gleichzeitig geprüfte Negativkontrolle (Milchsäure) wird als gültig angesehen, wenn mindestens zwei der drei Replikate negativ (CD86 S.I. < 150 %) und nicht-zytotoxisch waren (Zellviabilität ≥ 70 %).

— Die Positivkontrolle (TNBS) wurde als gültig angesehen, wenn mindestens zwei der drei Replikate positiv (CD86 S.I. ≥ 150 %) und nicht-zytotoxisch waren (Zellviabilität ≥ 70 %).

Prüfbericht

23. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten.

Prüfchemikalie

Einkomponentiger Stoff:

— Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;

— physikalisches Erscheinungsbild, Löslichkeit in Wasser, Löslichkeit in DMSO, Molekulargewicht und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, im verfügbaren Umfang;

— Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;

— Behandlung vor dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);

— geprüfte Konzentration(en);

— Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;

— Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels für jede Prüfchemikalie.

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoff und Gemisch:

— Charakterisierung, so weit wie möglich, z. B. durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), Reinheit, das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften (siehe oben) der einzelnen Komponenten, soweit verfügbar;

— physikalisches Erscheinungsbild, Löslichkeit in Wasser, Löslichkeit in DMSO und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, im verfügbaren Umfang;

— Molekulargewicht oder scheinbares Molekulargewicht im Fall von Gemischen/Polymeren mit bekannter Zusammensetzung oder andere für die Durchführung der Studie relevante Informationen;

— Behandlung vor dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);

— geprüfte Konzentration(en);

— Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;

— Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels für jede Prüfchemikalie.

Kontrollen

Positivkontrolle

— Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;

— physikalisches Erscheinungsbild, Löslichkeit in DMSO, Molekulargewicht und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, sofern verfügbar und falls zutreffend;

— Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;

— Behandlung vor dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);

— geprüfte Konzentration(en);

— Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;

— ggf. Verweis auf historische Ergebnisse von Positivkontrollen, die geeignete Akzeptanzkriterien für einen Testdurchlauf dokumentieren.

Negativ- und Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle:

— Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;

— Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;

— Aussehen, Molekulargewicht und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, sofern andere Kontroll-Lösungsmittel/Vehikel als die in der Prüfrichtlinie genannten verwendet werden und soweit verfügbar;

— Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;

— Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels für jede Prüfchemikalie.

Prüfbedingungen

— Name und Anschrift des Auftraggebers, der Prüfanstalt und des Studienleiters;

— Beschreibung des verwendeten Prüfprotokolls;

— verwendete Zelllinie, zugehörige Lagerbedingungen und Quelle (z. B. Einrichtung, von der sie gewonnen wurden);

— die verwendete Durchflusszytometrie (z. B. Modell), einschließlich der Geräteeinstellungen, Antikörper und verwendeten Zytotoxizitätsmarker;

— das angewandte Verfahren zum Nachweis der Kompetenz des Labors bei der Durchführung des Tests durch Prüfen der Leistungsstoffe) und das angewandte Verfahren zum Nachweis der reproduzierbaren Leistung des Tests im Zeitverlauf, z. B. historische Kontrolldaten und/oder Daten zu historischen Reaktivitätstests.

Validitätskriterien

— Zellviabilität und CD86 S.I.-Werte aus der Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle im Vergleich zu den Validitätsbereichen;

— Zellviabilität und S.I.-Werte aus der Positivkontrolle im Vergleich zu den Validitätsbereichen;

— Zellviabilität aller geprüften Konzentrationen der geprüften Chemikalie.

Prüfverfahren

— Anzahl der vorgenommenen Durchläufe;

— Konzentrationen der Prüfchemikalie, Applikationen und angewandte Expositionsdauer (falls von den Empfehlungen abweichend)

— Expositionsdauer;

— Beschreibung der angewandten Bewertungs- und Entscheidungskriterien;

— Beschreibung etwaiger Änderungen am Prüfverfahren.

Ergebnisse

— Tabellierung der Daten, einschließlich CV70 (falls anwendbar), S.I., Zellviabilitätswerte, EC150-Werte (falls anwendbar) für die Prüfchemikalie und für die Positivkontrolle in jedem Durchlauf und eine Anzeige der Einstufung der Prüfchemikalie gemäß dem Vorhersagemodell;

— Beschreibung etwaiger sonstiger relevanter Beobachtungen, falls zutreffend.

Erörterung der Ergebnisse

— Erörterung der anhand des U-SENS™-Tests erhaltenen Ergebnisse;

— Analyse der Prüfergebnisse im Rahmen eines IATA, sofern sonstige relevante Informationen vorliegen.

Schlussfolgerungen

LITERATURHINWEISE

(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. Verfügbar unter:http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations

(3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EN; doi 10.2 787/8157 37. Verfügbar unter: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].

(4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2 760/5889 55. Verfügbar unter: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. Verfügbar unter: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337–351.

(8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.

(9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259–270.

(10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1 683–1 696.

(11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Verfügbar unter: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™), 33ff. Verfügbar unter: [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. Verfügbar unter:http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(15) Vereinte Nationen (UN) (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sechste überarbeitete Fassung, New York und Genf: United Nations Publications. Verfügbar unter: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. Verfügbar unter: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. Verfügbar unter:https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Anlage 2.1

DEFINITIONEN

Genauigkeit: Grad der Übereinstimmung zwischen Prüfergebnissen und anerkannten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der „Relevanz". Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung" verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse eines Tests (14).

AOP (Adverse Outcome Pathway): Abfolge von Vorgängen, ausgehend von der chemischen Struktur einer Zielchemikalie oder Zielgruppe ähnlicher Chemikalien, über den molekularen auslösenden Vorgang bis hin zu einem In-vivo-Ergebnis von Interesse (15).

CD86-Konzentrationswirkung: Es liegt eine Konzentrationsabhängigkeit (oder Konzentrationswirkung) vor, wenn auf eine positive Konzentration (CD86 S.I. ≥ 150) eine Konzentration mit einem steigenden CD86 S.I. folgt.

Chemikalie: Stoff oder Gemisch.

CV70: Die geschätzte Konzentration, die 70 % Zellviabilität zeigt.

Verschiebung: Eine Verschiebung wird definiert durch i) den korrigierten %$CD86^+$-Wert des unbehandelten Kontrollreplikats 3 beträgt weniger als 50 % des Mittelwerts des korrigierten %$CD86^+$ Werts der unbehandelten Kontrollreplikate 1 und 2; und ii) der korrigierte %$CD86^+$-Wert des Negativkontrollreplikats 3 beträgt weniger als 50 % des Mittelwerts des korrigierten %$CD86^+$ Werts der Negativkontrollreplikate 1 und 2.

EC150: die geschätzten Konzentrationen, die 150 % S.I. der CD86-Expression aufzeigen.

Durchflusszytometrie: eine zytometrische Technik, bei der Zellen, die in einem Fluid suspendiert sind, einzeln durch eine Lichtstrahl fließen, das in für die Zellen und ihre Komponenten typischen Muster gestreut ist; Zellen werden häufig mit fluoreszierenden Markern gekennzeichnet, damit das Licht zuerst absorbiert und dann in geänderten Frequenzen ausgestrahlt wird.

Gefahr: Inhärente Eigenschaft eines Stoffes oder einer Situation, potenziell schädigende Auswirkungen zu haben, wenn ein Organismus, ein System oder eine (Teil-)Population diesem Stoff ausgesetzt ist.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): Ein strukturierter Ansatz zur Gefahrenidentifizierung (Potenzial), Gefahrencharakterisierung (Potenz) und/oder Sicherheitsbeurteilung (Potenzial/Potenz und Exposition) einer Chemikalie oder Gruppe von Chemikalien, der strategisch sämtliche relevanten Daten für eine informierte regulatorische Entscheidung hinsichtlich potenziellen Gefahren und/oder Risiken und/oder des Bedürfnisses weiterer gezielter und somit minimaler Tests integriert und abwägt.

Gemisch: Ein Gemisch oder eine Lösung, die aus zwei oder mehreren Stoffen besteht.

Einkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens 80 % w/w vorhanden ist.

Mehrkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens ≥ 10 % w/w und < 80 % w/w vorhanden sind. Ein mehrkomponentiger Stoff ist das Ergebnis eines Herstellungsprozesses. Der Unterschied zwischen einem Gemisch und einem mehrkomponentigen Stoff besteht darin, dass ein Gemisch durch die Mischung von zwei oder mehr Stoffen ohne chemische Reaktion entsteht. Ein mehrkomponentiger Stoff wird durch eine chemische Reaktion gebildet.

Positivkontrolle: Ein Replikat, das alle Komponenten eines Prüfsystems enthält und mit einem Stoff behandelt wird, der bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Um sicherzustellen, dass Abweichungen bei der Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

Prähaptene: Chemikalien, die durch abiotische Transformation zu Allergenen werden, z. B. durch Oxidierung.

Prohaptene: Chemikalien, die eine enzymatische Aktivierung erfordern, um ihr Hautsensibilisierungspotenzial auszuschöpfen.

Relevanz: Beschreibung der Beziehung zwischen dem Test und der untersuchten Wirkung und ob der Test aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Die Relevanz gibt an, inwieweit der Test die untersuchte biologische Wirkung richtig misst oder vorhersagt. Die Relevanz umfasst die Einbeziehung der Genauigkeit (Übereinstimmung) eines Tests (14).

Zuverlässigkeit: Maß der Reproduzierbarkeit einer Prüfmethode innerhalb von und zwischen Labors über einen längeren Zeitraum und bei einheitlichem Protokoll. Die Zuverlässigkeit wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit und Intralabor-Wiederholbarkeit bewertet (14).

Durchlauf: Ein Durchlauf besteht aus einer oder mehreren hintereinander getesteten Prüfchemikalien mit einer Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle und mit einer Positivkontrolle.

Sensitivität: Der Anteil aller positiven/wirkungsvollen Chemikalien, die durch den Test korrekt eingestuft werden. Die Sensitivität ist ein Maß der Genauigkeit eines Tests mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (14).

S.I.: Stimulationsindex. Relative Werte der geometrischen mittleren Fluoreszenzintensität in chemisch behandelten Zellen im Vergleich zu mit Lösungsmittel behandelten Zellen.

Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle: Eine unbehandelte Probe, die sämtliche Komponenten eines Prüfsystems enthält, außer der Prüfchemikalie, aber einschließlich des verwendeten Lösungsmittels/Vehikels. Sie wird verwendet, um die Referenzreaktion für die mit der Prüfchemikalie behandelten Proben, die im selben Lösungsmittel oder Vehikel aufgelöst oder stabil verteilt wurden, zu bestimmen. Wenn mit einer simultanen Medienkontrolle geprüft wird, zeigt diese Probe außerdem, ob das Lösungsmittel oder Vehikel mit dem Prüfsystem interagiert.

Spezifität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit eines Tests mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (14).

Färbepuffer: Eine mit Phosphat gepufferte Kochsalzlösung mit 5 % fetalem Kälberserum.

Stoff: Ein chemisches Element und seine Verbindungen im natürlichen Zustand oder durch ein Produktionsverfahren, die einen Zusatzstoff induzieren, der zur Erhaltung seiner Stabilität erforderlich ist, sowie Verunreinigungen, die aus dem verwendeten Prozess stammen, aber mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die getrennt sein können, ohne die Stabilität des Stoffes zu beeinträchtigen oder seine Zusammensetzung zu ändern.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der bzw. das nach dieser Prüfmethode getestet wird.

Globales Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (UN-GHS): Ein System, das die Einstufung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) gemäß normierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und Umweltgefahren vorschlägt und entsprechende Kommunikationselemente wie Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenberichte, Berichte zu Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitsdatenblätter anspricht, damit Informationen zu Nebenwirkungen mit Blick auf den Schutz von Menschen (einschließlich Mitarbeitern, Arbeitern, Logistikern, Verbrauchern und Ersthelfern) und der Umwelt zu übermitteln (16).

UVCB: Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Gültiger Test: Ein Test, von der angenommen wird, dass sie über ein ausreichendes Maß an Relevanz und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck verfügt und die auf wissenschaftlich bewährten Prinzipien basieren. Ein Test ist niemals in einem absoluten Sinn gültig, sondern im Verhältnis zu einem definierten Zweck (14).

Anlage 2.2

LEISTUNGSSTOFFE

Vor der routinemäßigen Anwendung des in dieser Anlage zu Prüfmethode B.71 beschriebenen Tests sollten Labors ihre technische Leistungsfähigkeit demonstrieren, indem sie die erwartete U-SENS™-Vorhersage für die in Tabelle 1 empfohlenen 10 Stoffe korrekt ermitteln und die CV70- und EC150-Werte, die in den betreffenden Referenzbereich fallen, bei mindestens 8 der 10 Leistungsstoffe bestimmen. Diese Leistungsstoffe wurden so ausgewählt, dass sie die Bandbreite von Reaktionen im Hinblick auf die Gefahr einer Hautsensibilisierung repräsentieren. Weitere Auswahlkriterien betrafen die Erhältlichkeit der Stoffe im Handel, und dass qualitativ hochwertige In-vivo-Referenzdaten sowie qualitativ hochwertige In-vitro-Daten aus dem U-SENS™-Test verfügbar sind. Außerdem sind veröffentlichte Referenzdaten für den U-SENS™-Test verfügbar (1) (8).

Tabelle 1

Empfohlene Stoffe zum Nachweis der technischen Leistungsfähigkeit beim U-SENS™-Test

Leistungsstoffe	**CAS-Nr.**	**Aggregat-zustand**	In-vivo-**Vorhersage** (1)	**U-SENS Lö-sungs-mittel/ Vehikel**	**U-SENS CV70 Re-ferenz Bereich in µg/ml** (2)	**U-SENS EC150 Referenz Bereich in µg/ml** (2)
4-Phenylenediamin	106-50-3	fest	Allergen (stark)	Vollständiges Medium (3)	< 30	positiv (≤ 10)
Picrylschwefelsäure	2508-19-2	flüssig	Allergen (stark)	Vollständiges Medium	> 50	positiv (≤ 50)
Diethylmaleat	141-05-9	flüssig	Allergen (mäßig)	DMSO	10–100	positiv (≤ 20)
Resorcin	108-46-3	fest	Allergen (mäßig)	Vollständiges Medium	> 100	positiv (≤ 50)
Zimtalkohol	104-54-1	fest	Allergen (schwach)	DMSO	> 100	positiv (10–100)
4-Allylanisol	140-67-0	flüssig	Sensibilisator (schwach)	DMSO	> 100	positiv (< 200)
Saccharin	81-07-2	fest	Nichtsensibili-sator	DMSO	> 200	negativ (> 200)
Glyzerin	56-81-5	flüssig	Nichtaensibili-sator	Vollständiges Medium	> 200	negativ (> 200)
Milchsäure	50-21-5	flüssig	Nichtsensibili-sator	Vollständiges Medium	> 200	negativ (> 200)
Salicylsäure	69-72-7	fest	Nichtsensibili-sator	DMSO	> 200	negativ (> 200)

Abkürzungen: CAS-Nr. = Registernummer des Chemical Abstracts Service

(1) Die Vorhersagen der In-vivo-Gefahr (und Potenz) basieren auf LLNA-Daten (1) (8). Die In-vivo-Potenz wird unter Anwendung der von ECETOC vorgeschlagenen Kriterien abgeleitet (17).

(2) Basierend auf den historischen beobachteten Werten (1) (8).

(3) Vollständiges Medium RPMI-1640-Medium, ergänzt durch 10 % fetales Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (8).

Anlage 3

IN-VITRO-HAUTSENSIBILISIERUNG: IL-8 LUC-TEST

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

1. Im Gegensatz zu Tests, die die Expression von Zelloberflächenmarkern analysieren, quantifiziert der IL8-Luc-Test die Änderungen des IL-8-Expressions, ein Zytokin im Zusammenhang mit der Aktivierung dendritischer Zellen (DC). In der von THP-1 abgeleiteten IL-8-Reporter-Zelllinie (THP-G8, etabliert aus der humanen akuten monozytischen Leukämiezelllinie THP-1) wird die IL-8-Expression nach der Exposition gegenüber Allergenen gemessen (1). Die Expression der Luciferase wird dann verwendet, um bei der Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren zu helfen.

2. Der IL-8-Luc-Test wurde in einer Validierungsstudie (2), das vom Japanischen Zentrum für die Validierung von Alternativmethoden (JaCVAM), dem **Ministerium für Wirtschaft, Handel und Industrie** (METI) und der Japanischen Gesellschaft **für Alternativen zu Tierversuchen (JSAAE**) durchgeführt wurde, bewertet und anschließend einer unabhängigen Begutachtung (3) unter der Aufsicht des JaCVAM und des Ministeriums für Gesundheit, Arbeit und Wohlstand (MHLW) mit Unterstützung der **Internationalen Kooperation für alternative** Prüfmethoden (ICATM) unterzogen. Unter Berücksichtigung sämtlicher verfügbarer Nachweise und Informationen von Behörden und Interessenträgern wurde der IL-8-Luc-Test als Teil eines IATA als nützlich angesehen, zwischen Allergenen und Nichtsensibilisatoren zum Zweck der Gefahreneinstufung und Etikettierung zu unterscheiden. Beispiele für die Verwendung von IL-8-Luc-Test-Daten in Kombination mit anderen Informationen werden in der Literatur beschrieben (4) (5) (6).

3. Der IL-8-Luc-Test stellte sich als übertragbar auf Labore heraus, die mit Zellkulturen und Luciferasemessungen Erfahrung haben. Laborreproduzierbarkeiten lagen zwischen 87,7 % bzw. 87,5 % (2). Daten, die in der Validierungsstudie (2) und anderen veröffentlichten Arbeiten (1) (6) erzeugt wurden, zeigen, dass der IL-8-Luc-Test im Vergleich zu LLNA 118 von 143 Chemikalien als positiv oder negativ und 25 Chemikalien als nicht schlüssig eingestuft hat und die Genauigkeit des IL-8-Luc-Tests bei der Unterscheidung von Hautallergenen (UN-GHS/CLP Kat. 1) von Nichtsensibilisatoren (UN-GHS/CLP Nr. Kat.) beträgt 86 % (101/118) mit einer Sensitivität von 96 % (92/96) und einer Spezifität von 41 % (9/22). Außer den unten beschriebenen Stoffen außerhalb des Anwendungsbereichs (Abschnitt 5) stufte der IL-8-Luc-Test 113 von 136 Chemikalien als positiv oder negativ und 23 Chemikalien als nicht schlüssig ein und die Genauigkeit des IL-8-Luc-Tests liegt bei 89 % (101/113) mit einer Sensitivität von 96 % (92/96) und einer Spezifität von 53 % (9/17). Unter Anwendung der in Urbisch et al. zitierten Humandaten (7) stufte der IL-8-Luc-Test 76 von 90 Chemikalien als positiv oder negativ und 14 Chemikalien als nicht schlüssig ein und die Genauigkeit liegt bei 80 % (61/76), die Sensitivität bei 93 % (54/58) und die Spezifität bei 39 % (7/18). Außer den Stoffen außerhalb des Anwendungsbereichs stufte der IL-8-Luc-Test 71 von 84 Chemikalien als positiv oder negativ und 13 Chemikalien als nicht schlüssig ein und die Genauigkeit liegt bei 86 % (61/71 mit einer Sensitivität von 93 % (54/58) und einer Spezifität von 54 % (7/13). Falsch negative Vorhersagen mit dem IL-8-Luc-Test treten wahrscheinlicher bei Chemikalien auf, die eine niedrige/mittlere Hautsensibilisierungspotenz (UN-GHS/CLP Unterkategorie 1B) aufweisen als bei denjenigen mit einer hohen Potenz (UN-GHS/CLP Unterkategorie 1A) (6). Zusammen unterstützen die Informationen die Zweckdienlichkeit des IL-8-Luc-Tests bei der Identifizierung von Hautsensibilisierungsgefahren. Jedoch sollte die Genauigkeit, die hier für den IL-8-Luc-Test als eigenständiger Test angegeben wird, in Kombination mit anderen Informationsquellen im Rahmen eines IATA sowie gemäß den Bestimmungen unter Nummer 7 und 8 oben in der Allgemeinen Einleitung betrachtet werden. Darüber hinaus sollte bei der Bewertung von Tests zur Hautsensibilisierung ohne Tierversuche beachtet werden, dass der LLNA sowie andere Tierversuche die Situation bei Menschen nicht vollständig widerspiegeln.

4. Auf der Grundlage der gegenwärtig verfügbaren Daten über den IL-8-Luc-Test wurde nachgewiesen, dass er bei Prüfchemikalien, die eine Vielzahl an organischen Funktionsgruppen, Reaktionsmechanismen, Hautsensibilisierungspotenzial (wie in In-vivo-Studien festgestellt) und physikalisch-chemischen Eigenschaften abdecken, anwendbar ist (2) (6).

5. Obwohl der IL-8-Luc-Test X-VIVO™ 15 als Lösungsmittel verwendet, bewertete es Chemikalien mit einem Log K_{ow} > 3,5 und diejenigen mit einer Wasserlöslichkeit von ungefähr 100 µg/ ml wie von der EPI Suite™ berechnet korrekt und seine Leistung bei der Erkennung von Allergenen mit schlechter Wasserlöslichkeit ist besser als die des IL-8-Luc-Tests, das Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel verwendet (2). Negative Ergebnisse für Prüfchemikalien, die nicht bei 20 mg/ml gelöst werden, können falsch negative Ergebnisse hervorrufen, da sie nicht in X-VIVO™ 15 löslich sind. Deshalb sollten negative Ergebnisse für diese Chemikalien nicht berücksichtigt werden. Bei der Validierungsstudie gab es eine hohe Falsch-Negativ-Rate für Anhydride. Darüber hinaus können Prohaptene (Stoffe, die eine Stoffwechselaktivierung erfordern) und Prähaptene (Stoffe, die durch Oxidation aktiviert werden) aufgrund der eingeschränkten Stoffwechselfähigkeit der Zelllinie (8) und der Versuchsbedingungen falsch negative Ergebnisse hervorrufen. Obwohl negative Ergebnisse für mutmaßliche Prä-/Prohaptene jedoch mit Vorsicht interpretiert werden sollten, hat der IL-8-Luc-Test 11 von 11 Prähaptene, 6/6 Prohaptene und 6/8 Prä-/Prohaptene im IL-8-Luc-Test-Datensatz korrekt eingestuft (2). Auf der Grundlage der kürzlichen umfassenden Begutachtung von drei Tests ohne Tierversuche (DPRA, KeratinoSens™ und h-CLAT) zur Erkennung von Prä- und Prohaptenen (9) und basierend auf der Tatsache, dass THP-G8-Zellen im IL-8-Luc-Test verwendet werden, wird eine Zelllinie von THP-1 abgeleitet, die in h-CLAT verwendet wird; der IL-8-Luc-Test kann auch dazu beitragen, die Sensitivität von Tests ohne Tierversuche zur Erkennung von Prä- und Prohaptenen in der Kombination anderer Tests zu steigern. Bisher geprüfte Tenside führten unabhängig von ihrem Typ (z. B. kationisch, anionisch oder nichtionisch) zu (falsch) positiven Ergebnissen. Schließlich können Chemikalien, die mit Luciferase interferieren, die Aktivität/Messung durcheinander bringen, was zu einer offensichtlichen Hemmung oder einer erhöhten Lumineszenz führt (10). Beispielweise wurde eingetragen, dass Phytoöstrogenkonzentrationen > 1 µM die Lumineszenzsignale in anderen auf Luciferase basierenden Reporter-Gen-Tests aufgrund der Überaktivierung des Luciferase-Reporter-Gens stören. Infolgedessen muss die Luciferase-Expression, die bei hohen Konzentrationen von Phytoöstrogenen oder Verbindungen, die vermutlich eine mit Phytoöstrogen vergleichbare Überaktivierung des Luciferase-Reporter-Gens bewirken, sorgfältig untersucht werden (11). Basierend auf den obigen Aussagen liegen Tenside, Anhydride und Chemikalien, die Luciferase beeinträchtigen, außerhalb des Anwendungsbereichs dieser Tests. In Fällen, in denen die Nichtanwendbarkeit des IL-8-Luc-Tests bei anderen spezifischen Kategorien von Prüfchemikalien nachgewiesen wird, sollte der Test bei diesen spezifischen Kategorien nicht verwendet werden.

6. Der IL-8-Luc-Test unterstützt, wie bereits oben erwähnt, die Unterscheidung von Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren. Weitere Arbeiten, vorzugsweise basierend auf menschlichen Daten, sind erforderlich, um zu bestimmen, ob die Ergebnisse von IL-8-Luc zur Potenzbewertung beitragen können, wenn sie in Kombination mit anderen Informationsquellen berücksichtigt werden.

7. Definitionen sind Anlage 3.1 zu entnehmen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

8. Der IL-8-Luc-Test nutzt eine humane monozytische Leukämie-Zelllinie THP-1, die von der American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) erhalten wurde. Mit dieser Zelllinie etablierte die Abteilung für Dermatologie der Tohoku University School of Medicine eine von THP-1 abgeleitete IL-8-Reporter-Zelllinie, THP-G8, die die Luciferase-Gene „Stable Luciferase Orange (SLO)" und „Stable Luciferase Red (SLR)" unter der Kontrolle von IL-8 bzw. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-Trägern beherbergt (1). Dies ermöglicht die quantitative Messung der Luciferase-Geninduktion durch Lumineszenzerkennung unter Verwendung von bekannten lichterzeugenden Luciferase-Substraten als Indikator für die Aktivität des IL-8 und GAPDH in Zellen nach Exposition gegenüber sensibilisierenden Chemikalien.

9. Das zweifarbige Prüfsystem besteht aus einer orange emittierenden Luciferase (SLO; λmax = 580 nm) (12) für die Genexpression des IL-8-Trägers sowie einer rot emittierenden Luciferase (SLR; λmax = 630 nm) (13) für die Genexpression des internen Kontrollträgers GAPDH. Die zwei Luciferasen strahlen bei der Reaktion mit Leuchtkäfer-d-Luciferin verschiedene Farben aus und ihre Lumineszenz wird gleichzeitig in einer einstufigen Reaktion gemessen, indem die Emission von der Testmischung mithilfe eines optischen Filters geteilt wird (14) (Anlage 3.2).

10. THP-G8-Zellen werden 16 Stunden lang mit der Prüfchemikalie behandelt und danach wird die SLO-Luciferase-Aktivität (SLO-LA) gemessen, die die IL-8-Trägeraktivität widerspiegelt, sowie die SLR-Luciferase-Aktivität (SLR-LA), die die GAPDH-Trägeraktivität widerspiegelt. Um die Abkürzungen leicht verständlich zu machen, wenden SLO-LA und SLR-LA als IL8LA bzw. GAPLA bezeichnet. Tabelle 1 bietet eine Beschreibung der Ausdrücke im Zusammenhang mit der Luciferase-Aktivität im IL-8-Luc-Test. Die gemessenen Werte werden verwendet, um das normalisierte IL8LA (nIL8LA) zu berechnen, das das Verhältnis von IL8LA zu GAPLA ist; die Induktion von nIL8LA (Ind-IL8LA), das das Verhältnis des arithmetischen Mittels der in vierfacher Ausfertigung gemessenen Wert des nIL8LA von mit einer Prüfchemikalie behandelten THP-G8-Zellen zu den Werten des nIL8LA der unbehandelten THP-G8-Zellen ist; und die Hemmung von GAPLA (Inh-GAPLA), das das Verhältnis des arithmetischen Mittels der in vierfacher Ausfertigung gemessenen Werte des GAPLA von mit einer Prüfchemikalie behandelten THP-G8-Zellen zu den Werten des GAPLA der unbehandelten THP-G8-Zellen ist und als Indikator für die Zytotoxizität verwendet wird.

Tabelle 1

Beschreibung der Ausdrücke im Zusammenhang mit der Luciferase-Aktivität im IL-8-Luc-Test

Abkürzungen	Definition
GAPLA	SLR-Luciferase-Aktivität, die die GAPDH-Trägeraktivität widerspiegelt
IL8LA	SLO-Luciferase-Aktivität, die die IL-8-Trägeraktivität widerspiegelt
nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA von mit Chemikalien behandelten THP-G8-Zellen / nIL8LA von unbehandelten Zellen
Inh-GAPLA	GAPLA von mit Chemikalien behandeltem THP-G8 / GAPLA von unbehandelten Zellen
CV05	Die niedrigste Konzentration der Chemikalie, bei der Inh-GAPLA < 0,05 wird.

11. Es stehen Leistungsnormen (15) zur Verfügung, die die Validierung geänderter In-vitro-IL-8-Luciferase-Tests ähnlich dem IL-8-Luc-Test sowie die rechtzeitige Anpassung der OECD-Prüfrichtlinie 442E für deren Einbeziehung ermöglichen. Die gegenseitige Anerkennung der Daten gemäß OECD wird nur für Tests garantiert, die gemäß diesen Leistungsnormen validiert wurden, sofern diese Tests von der OECD überprüft und in die Prüfrichtlinie 442E aufgenommen wurden (16).

NACHWEIS DER KOMPETENZ

12. Vor der routinemäßigen Verwendung des unter dieser Anlage zur Prüfmethode B.71 beschriebenen Tests sollten Laboratorien ihre technische Kompetenz anhand der zehn in Anlage 3.3 aufgeführten Leistungsstoffe in Übereinstimmung mit bewährten In-vitro-Verfahren nachweisen (17). Darüber hinaus sollten Testbenutzer eine historische Datenbank der mit den Reaktivitätstests (siehe Abschnitt 15) und mit den positiven and Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen (siehe Abschnitte 21–24) erzeugten Daten pflegen und diese Daten nutzen, um zu bestätigen, dass die Reproduzierbarkeit des Tests in ihrem Labor mit der Zeit aufrechterhalten wird.

VERFAHREN

13. Die Standardarbeitsanweisung (SOP) für den IL-8-Luc-Test ist verfügbar und sollte bei der Durchführung des Tests verwendet werden (18). Labore, die der Durchführung des Tests zugestimmt haben, können die rekombinante THP-G8-Zelllinie von

GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan, nach Unterzeichnung einer Materialübertragungsvereinbarung (MTA) in Übereinstimmung mit den Bedingungen der OECD-Vorlage erhalten. Nachfolgend werden die Hauptkomponenten und Verfahren des Tests beschrieben.

Vorbereitung der Zellen

14. Die THP-G8-Zelllinie vom GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan, sollte für die Durchführung des IL-8-Luc-Tests verwendet werden (siehe Abschnitte 8 und 13). Bei Erhalt werden die Zellen gewonnen (2 bis 4 Passagen) und als homogener Stamm eingefroren aufbewahrt. Zellen von diesem Stamm können bis zu einem Höchstwert von 12 Passagen oder maximal 6 Wochen gewonnen werden. Das für die Vermehrung verwendete Medium ist das RPMI-1640-Kulturmedium mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS), antibiotischer/antimyzotischer Lösung (100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin und 0,25 µg/ml Amphotericin B in 0,85 % Kochsalzlösung) (z. B. GIBCO Kat. Nr. 15240-062), 0,15 µg/ml Puromycin (z. B. CAS:58-58-2) und 300 µg/ml G418 (z. B. CAS:108321-42-2).

15. Vor ihrer Verwendung zu Testzwecken sollten die Zelle qualifiziert werden, indem ein Reaktivitätstest durchgeführt wird. Dieser Test sollte 1–2 Wochen oder 2–4 Passagen nach dem Auftauen mithilfe einer Positivkontrolle, 4-Nitrobenzylbromid (4-NBB) (CAS:100-11-8, ≥ 99 % Reinheit) und der Negativkontrolle Milchsäure (LA) (CAS:50-21-5, ≥ 85 % Reinheit) durchgeführt werden. 4-NBB sollte eine positive Wirkung auf Ind-IL8LA (≥ 1,4) hervorrufen, während LA eine negative Wirkung auf Ind-IL8LA (< 1,4) hervorrufen sollte. Nur Zellen, die den Reaktivitätstest bestehen, werden für den Test verwendet. Der Test sollte gemäß den in den Abschnitten 22–24 beschriebenen Verfahren durchgeführt werden.

16. Zu Testzwecken werden THP-G8-Zellen bei einer Dichte von 2 bis 5×10^5 Zellen/ml ausgesät und 48 bis 96 Stunden in Kulturkolben vorgezüchtet. Am Tag des Tests werden die vom Kulturkolben geernteten Zellen mit RPMI-1640 mit 10 % FBS ohne Antibiotika gewaschen und anschließend mit RPMI-1640 mit 10 % FBS ohne Antibiotika bei 1×10^6 Zellen/ml resuspensiert. Die Zellen werden dann in einer flachen schwarzen Platte mit 96 Mulden (z. B. Costar Kat. Nr. 3603) mit 50 µl (5×10^4 Zellen/well) verteilt.

Vorbereitung der Prüfchemikalie und Kontrollstoffe

17. Die Prüfchemikalie sowie die Kontrollstoffe werden am Tag des Tests vorbereitet. Bei dem IL-8-Luc-Test werden Prüfchemikalien in X-VIVO™ 15 gelöst, einem im Handel erhältlichen, serumfreien Medium (Lonza, 04-418Q), bis eine endgültige Konzentration von 20 mg/ml erreicht wurde. X-VIVO™ 15 wird in einem Mikrozentrifugenröhrchen zu 20 mg/ml der Prüfchemikalie hinzugefügt (unabhängig von der Löslichkeit der Chemikalie) und auf ein Volumen von 1 ml gebracht und dann kräftig geschüttelt und auf einem Rotor bei einer Höchstgeschwindigkeit von 8 U/min 30 Minuten lang bei einer Umgebungstemperatur von ungefähr 20 °C geschüttelt. Wenn feste Chemikalien noch immer nicht löslich sind, wird das Röhrchen darüber hinaus im Ultraschallbad behandelt, bis die Chemikalie sich komplett gelöst hat oder stabil verteilt wurde. Bei Prüfchemikalien, die in X-VIVO™ 15 löslich sind, wird die Lösung mit einem Faktor von 5 mit X-VIVO™ 15 verdünnt und dann als X-VIVO™ 15-Stammlösung der Prüfchemikalie verwendet (4 mg/ml). Bei Prüfchemikalien, die nicht in X-VIVO™ 15 löslich sind, wird das Gemisch erneut mindestens 30 Minuten lang rotiert und dann bei 15000 U/min (≈ 20000 *g*) 5 Minuten lang zentrifugiert; das sich daraus ergebende Tensid wird als X-VIVO™ 15-Stammlösung der Prüfchemikalie verwendet. Für den Einsatz anderer Lösungsmittel wie DMSO, Wasser oder Kulturmedium sollten ausreichende wissenschaftliche Gründe vorgelegt werden. Das detaillierte Verfahren zur Lösung von Chemikalien wird in Anlage 3.5 dargestellt. Die X-VIVO™ 15-Lösungen, die in den Abschnitten 18–23 beschrieben werden, werden 1:1 (v/v) mit den in der flachen Platte mit 96 Mulden vorbereiteten Zellsuspensionen gemischt (siehe Abschnitt 16).

18. Der erste Testdurchlauf zielt darauf ab, die zytotoxische Konzentration zu bestimmen und das Hautsensibilisierungspotenzial der Chemikalien zu untersuchen. Mithilfe von X-VIVO™ 15 werden serielle Verdünnungen der X-VIVO™ 15-Stammlösungen der Prüfchemikalien mit einem Verdünnungsfaktor von zwei (siehe Anlage 3.5) in einem Testblock mit 96 Mulden (z. B. Costar Kat. Nr. EW-01729-03) hergestellt. Dann werden 50 µl/Mulde verdünnte Lösung zu 50 µl der Zellsuspension in einer flachen schwarzen Platte mit 96 Mulden hinzugefügt. Damit reicht die endgültige Konzentration für Prüfchemikalien, die in X-VIVO™ 15 löslich sind, von 0,002 bis 2 mg/ml (Anlage 3.5). Bei Prüfchemikalien, die bei 20 mg/ml nicht in X-VIVO™ 15 löslich sind, werden nur die Verdünnungsfaktoren bestimmt, die von 2 bis 2^{10} reichen, obwohl die tatsächlichen endgültigen Konzentrationen der Prüfchemikalien unbestimmt bleiben und von der gesättigten Konzentration der Prüfchemikalien in der X-VIVO™ 15-Stammlösung abhängen.

19. In nachfolgenden Testdurchläufen (d. h. das zweite, dritte und vierte Replikat) wird die X-VIVO™ 15-Stammlösung im ersten Versuch bei einer Konzentration hergestellt, die 4 Mal höher ist als die Konzentration der Zellviabilität 05 (CV05; die niedrigste Konzentration, bei der Inh-GAPLA < 0,05 wird). Wenn Inh-GAPLA bei der höchsten Konzentration im ersten Durchlauf nicht unter 0,05 fällt, wird die X-VIVO™ 15-Stammlösung bei der höchsten Konzentration im ersten Durchlauf hergestellt. Die Konzentration von CV05 wird berechnet, indem die Konzentration der Stammlösung im ersten Durchlauf durch den Verdünnungsfaktor für CV05 (X) (Verdünnungsfaktor CV05 (X) geteilt wird; der Verdünnungsfaktor, der erforderlich ist, um die Stammlösung auf CV05 zu verdünnen) (siehe Anlage 3.5). Bei Prüfstoffen, die bei 20 mg/ml nicht in X-VIVO löslich sind, wird CV05 anhand der Konzentration der Stammlösung × 1/X bestimmt. Für die Durchläufe 2 bis 4 wird eine zweite Stammlösung wie 4 × CV05 vorbereitet (Anlage 3.5).

20. Serielle Verdünnungen der zweiten X-VIVO™ 15-Stammlösungen werden mit einem Verdünnungsfaktor von 1,5 mit einem Testblock mit 96 Mulden hergestellt. Dann werden 50 µl/Mulde verdünnte Lösung zu 50 µl der Zellsuspension in den Mulden einer flachen schwarzen Platte mit 96 Mulden hinzugefügt. Jede Konzentration jeder Prüfchemikalie sollte in 4 Mulden geprüft werden. Die Proben werden dann auf einem Platten-Schüttler gemischt und 16 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 gemischt und anschließend wird die Luciferase-Aktivität wie unten beschrieben gemessen.

21. Die Lösungsmittelkontrolle ist das Gemisch von 50 µl/Mulde von X-VIVO™ 15 und 50 µl/Mulde der Zellsuspension in RPMI-1640 mit 10 % FBS.

22. Die empfohlene Positivkontrolle ist 4-NBB. 20 mg von 4-NBB werden in einem 1,5-ml-Mikrofugenröhrchen vorbereitet, zu dem X-VIVO™ 15 bis auf 1 ml hinzugefügt wird. Das Röhrchen wird kräftig geschüttelt und auf einem Rotor bei einer Höchstgeschwindigkeit von 8 U/min mindestens 30 Minuten lang geschüttelt. Nach der Zentrifugierung bei 20000 g für 5 Minuten wird das Tensid mit einem Faktor von 4 mit X-VIVO™ 15 verdünnt und 500 µl des verdünnten Tensids werden in eine Mulde in einem Testblock mit 96 Mulden übertragen. Das verdünnte Tensid wird mit X-VIVO™ 15 mit Faktoren von 2 und 4 weiter verdünnt und 50 µl der Lösung wird zu 50 µl der THP-G8-Zellsuspension in den Mulden der flachen schwarzen Platte mit 96 Mulden hinzugefügt (Anlage 3.6). Jede Konzentration der Positivkontrolle sollte in 4 Mulden geprüft werden. Die Platte wird auf einem Platten-Schüttler geschüttelt und in einem CO_2-Inkubator 16 Stunden lang inkubiert (37 °C, 5 % CO_2), anschließend wird die Luciferase-Aktivität wie in Abschnitt 29 beschrieben gemessen.

23. Die empfohlene Negativkontrolle ist LA. 20 mg von LA werden in einem 1,5-ml-Mikrofugenröhrchen vorbereitet, zu dem X-VIVO™ 15 bis auf 1 ml hinzugefügt wird (20 mg/ml). 20 mg/ml der LA-Lösung werden um einen Faktor von 5 mit X-VIVO™ 15 verdünnt (4 mg/ml); 500 µl dieser 4 mg/ml-LA-Lösung werden in eine Mulde eines Testblocks mit 96 Mulden übertragen. Diese Lösung wird um einem Faktor von 2 mit X-VIVO™ 15 verdünnt und dann erneut um einen Faktor von 2 verdünnt, um 2 mg/ml- und 1 mg/ml-Lösungen herzustellen. 50 µl dieser 3 Lösungen und Vehikelkontrollen (X-VIVO™ 15) werden zu 50 µl der THP-G8-Zellsuspension in den Mulden der flachen schwarzen Platte mit 96 Mulden hinzugefügt. Jede Konzentration der Negativkontrolle wird in 4 Mulden geprüft. Die Platte wird auf einem Platten-Schüttler geschüttelt und in einem CO_2-Inkubator 16 Stunden lang inkubiert (37 °C, 5 % CO_2), anschließend wird die Luciferase-Aktivität wie in Abschnitt 29 beschrieben gemessen.

24. Andere geeignete Positiv- oder Negativkontrollen können verwendet werden, sofern historische Daten für die Ableitung vergleichbarer Akzeptanzkriterien für einen Testdurchlauf zur Verfügung stehen.

25. Es ist darauf zu achten, dass eine Verdunstung der flüchtigen Prüfchemikalien sowie eine Kreuzkontamination zwischen Mulden durch die Prüfchemikalien vermieden werden, indem die Platte beispielsweise vor der Inkubation mit den Prüfchemikalien versiegelt wird.

26. Bei den Prüfchemikalien und der Lösungsmittelkontrolle sind 2 bis 4 Durchläufe erforderlich, um eine positive oder negative Vorhersage ableiten zu können (siehe Tabelle 2). Jeder Durchlauf wird an einem anderen Tag mit einer frischen X-VIVO™ 15-Stammlösung der Prüfchemikalie und unabhängig voneinander gewonnenen Zellen vorgenommen. Die Zellen können aus derselben Passage stammen.

Messungen der Luciferase-Aktivität

27. Die Lumineszenz wird mithilfe eines Mikroplattenluminometers mit 96 Mulden gemessen, das mit optischen Filtern ausgestattet ist, z. B. Phelios (ATTO, Tokyo, Japan), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Deutschland) und die ARVO-Serie (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Das Luminometer muss für jeden Test kalibriert werden, um Reproduzierbarkeit zu gewähren (19). Rekombinante orange und rot emittierende Luciferasen sind für diese Kalibrierung verfügbar.

28. 100 µl des vorgewärmten Tripluc® Luciferase-Test-Reagenz (Tripluc) wird in jede Mulde der Platte übertragen, die die mit oder ohne Chemikalien behandelte Zellsuspension enthält. Die Platte wird 10 Minuten lang bei einer Umgebungstemperatur von ungefähr 20 °C geschüttelt. Die Platte wird auf dem Luminometer platziert, um die Luciferase-Aktivität zu messen. Die Biolumineszenz wird jeweils 3 Sekunden lang in der Abwesenheit (F0) und Anwesenheit (F1) des optischen Filters gemessen. Bei Verwendung anderer Einstellungen, z. B. je nach verwendetem Luminometermodell, sollten diese begründet werden.

29. Parameter für jede Konzentration werden aus den gemessenen Werten berechnet, z. B. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, die mittlere ±SD von IL8LA, die mittlere ±SD von GAPLA, die mittlere ±SD von nIL8LA, die mittlere ±SD von Ind-IL8LA, die mittlere ±SD von Inh-GAPLA und das 95 % Konfidenzintervall von Ind-IL8LA. Definitionen der in diesem Abschnitt verwendeten Parameter werden in den Anlagen 3.1 bzw. 3.4 bereitgestellt.

30. Vor der Messung wird die Farbunterscheidung in mehrfarbigen Reporter-Tests allgemein durch die Verwendung von Detektoren erzielt (Luminometer und Plattenleser), die mit optischen Filtern ausgestattet sind, wie beispielsweise Short-Cut-Filtern (Langpass oder Kurzpass) oder Bandpassfiltern. Die Übertragungskoeffizienten der Filter für jede Biolumineszenzsignalfarbe sollte vor dem Test gemäß Anlage 3.2 kalibriert werden.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Datenauswertung

31. Kriterien für eine positive/negative Entscheidung erfordern, dass in jedem Durchlauf:

— eine IL-8-Luc-Test-Vorhersage als positiv eingestuft wird, wenn eine Prüfchemikalie über einen Ind-IL8LA ≥ von 1,4 verfügt und die untere Grenze des 95 %-Konfidenzintervalls von Ind-IL8LA ≥ 1,0 beträgt

— eine IL-8-Luc-Test-Vorhersage als negativ eingestuft wird, wenn eine Prüfchemikalie über einen Ind-IL8LA < 1,4 verfügt und/oder die untere Grenze des 95 %-Konfidenzintervalls von Ind-IL8LA < 1,0 beträgt

Vorhersagemodell

32. Prüfchemikalien, die zwei positive Ergebnisse in den 1., 2., 3. oder 4. Durchläufen liefern, werden als positiv identifiziert, während diejenigen, die drei negative Ergebnisse in den 1., 2., 3. oder 4. Durchläufen liefern, als vermeintlich negativ identifiziert werden (Tabelle 2). Unter den vermeintlich negativen Chemikalien werden Chemikalien, die bei 20 mg/ml von X-VIVO™ 15 gelöst werden, als negativ eingestuft, während Chemikalien, die nicht bei 20 mg/ml von X-VIVO™ 15 gelöst werden, nicht berücksichtigt werden sollten (Abbildung 1).

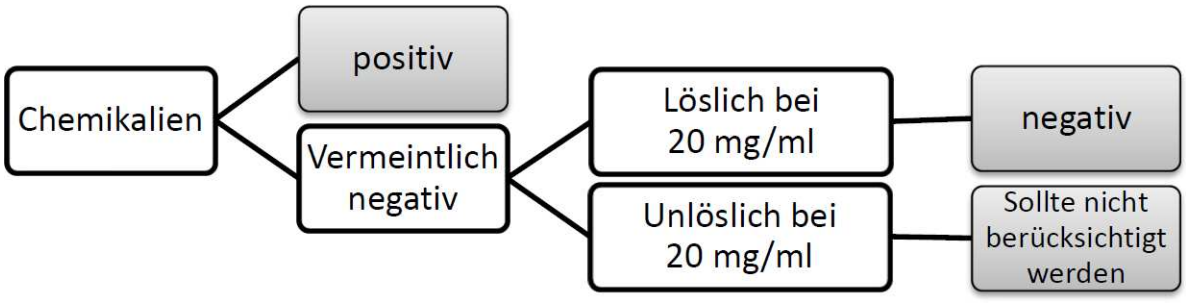
Tabelle 2

Kriterien zur Identifizierung von positiv und vermeintlich negativ

1. Durchlauf	2. Durchlauf	3. Durchlauf	4. Durchlauf	Endgültige Vorhersage
positiv	positiv	–	–	positiv
	negativ	positiv	–	positiv
		negativ	positiv	positiv
			negativ	Vermeintlich negativ
negativ	positiv	positiv	–	positiv
		negativ	positiv	positiv
			negativ	Vermeintlich negativ
	negativ	positiv	positiv	positiv
			negativ	Vermeintlich negativ
		negativ	–	Vermeintlich negativ

Abb. 1

Vorhersagemodell für endgültiges Urteil



Akzeptanzkriterien

33. Bei der Verwendung des IL-8-Luc-Tests sollten die folgenden Akzeptanzkriterien erfüllt werden:

— Ind-IL8LA sollte in mindestens einer Konzentration der Positivkontrolle, 4-NBB, in jedem Durchlauf mehr als 5,0 betragen.

— Ind-IL8LA sollte in jeder Konzentration der Negativkontrolle, Milchsäure, in jedem Durchlauf weniger als 1,4 betragen.

— Daten aus Platten, für die die GAPLA der Kontrollmulden mit Zellen und Tripluc aber ohne Chemikalien weniger als 5 Mal des Wertes der Mulde, die nur das Prüfmedium enthält (50 µl/Mulde von RPMI-1640 mit 10 % FBS und 50 µl/Mulde von X-VIVO™ 15), beträgt, sollten abgelehnt werden.

— Daten aus Platten, für die die Inh-GAPLA aller Konzentrationen des Tests oder Kontrollchemikalien weniger als 0,05 beträgt, sollten abgelehnt werden. In diesem Fall sollte der erste Test wiederholt werden, damit die höchste endgültige Konzentration des wiederholten Tests die niedrigste endgültige Konzentration des vorherigen Tests ist.

Prüfbericht

34. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalien

Einkomponentiger Stoff:

— Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;

— Aussehen, Wasserlöslichkeit, Molekulargewicht und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, soweit verfügbar;

— Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;

— Behandlung vor dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);

— Löslichkeit in X-VIVO™ 15. Bei Chemikalien, die in X-VIVO™ 15 nicht löslich sind, ob ein Niederschlag oder ein Aufschwemmen nach der Zentrifugierung beobachtet wird;

— geprüfte Konzentration(en);

— Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;

— Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels für jede Prüfchemikalie, wenn X-VIVO™ 15 nicht verwendet wurde.

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoff und Gemisch:

— Charakterisierung, so weit wie möglich, z. B. durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), Reinheit, das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften (siehe oben) der einzelnen Komponenten, soweit verfügbar;

— Physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, soweit verfügbar;

— Molekulargewicht oder scheinbares Molekulargewicht im Fall von Gemischen/Polymeren mit bekannter Zusammensetzung oder andere für die Durchführung der Studie relevante Informationen;

— Behandlung vor dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);

— Löslichkeit in X-VIVO™ 15. Bei Chemikalien, die in X-VIVO™ 15 nicht löslich sind, ob ein Niederschlag oder ein Aufschwemmen nach der Zentrifugierung beobachtet wird;

— geprüfte Konzentration(en);

— Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar.

— Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels für jede Prüfchemikalie, wenn X-VIVO™ 15 nicht verwendet wurde.

Kontrollen

Positivkontrolle:

— Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;

— physikalisches Erscheinungsbild, Löslichkeit in Wasser, Molekulargewicht und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, sofern verfügbar und falls zutreffend;

— Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;

— Behandlung vor dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);

— geprüfte Konzentration(en);

— Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;

— ggf. Verweis auf historische Ergebnisse von Positivkontrollen, die geeignete Akzeptanzkriterien dokumentieren.

Negativkontrolle:

— Chemische Kennung, wie beispielsweise IUPAC- oder CAS-Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n) und/oder sonstige Kennungen;

— Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;

— physikalisches Erscheinungsbild, Molekulargewicht und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, falls andere als die in der Prüfrichtlinie genannten Negativkontrollen verwendet werden, und sofern verfügbar;

— Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;

— Begründung der Auswahl des Lösungsmittels für jede Prüfchemikalie.

Prüfbedingungen

— Name und Anschrift des Auftraggebers, der Prüfanstalt und des Studienleiters;

— Beschreibung des verwendeten Prüfprotokolls;

— verwendete Zelllinie, zugehörige Lagerbedingungen und Quelle (z. B. Einrichtung, von der sie gewonnen wurde);

— Chargennummer und Herkunft von FBS, Lieferantenname, Chargennummer der flachen schwarzen Platte mit 96 Mulden und Chargennummer des Tripluc-Reagenz;

— Passagenanzahl und Zelldichte für den Test;

— angewandte Zellzählungsmethode bei der Beimpfung vor dem Test und ergriffene Maßnahmen zur Gewährleistung einer homogenen quantitativen Verteilung der Zellen;

— verwendetes Luminometer (z. B. Modell), einschließlich Geräteeinstellungen, verwendetes Luciferase-Substrat und Nachweis geeigneter Lumineszenzmessungen basierend auf der in Anlage 3.2 beschriebenen Kontrollprüfung;

— angewandtes Verfahren zum Nachweis der Leistungsfähigkeit des Labors hinsichtlich der Durchführung des Tests (z. B. durch Prüfen von Leistungsstoffen) oder zum Nachweis der reproduzierbaren Durchführung des Tests im Zeitverlauf.

Prüfverfahren

— Anzahl an Replikaten und ausgeführten Durchläufen;

— Konzentrationen der Prüfchemikalie, Applikationsverfahren und Expositionsdauer (falls von den Empfehlungen abweichend);

— Beschreibung der angewandten Bewertungs- und Entscheidungskriterien;

— Beschreibung der angewandten Studienakzeptanzkriterien;

— Beschreibung etwaiger Änderungen am Prüfverfahren.

Ergebnisse

— Messungen von IL8LA und GAPLA;

— Berechnungen für nIL8LA, Ind-IL8LA und Inh-GAPLA;

— das 95 %ige Konfidenzintervall von Ind-IL8LA;

— Diagramm zur Darstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven für die Induktion der Luciferase-Aktivität und Viabilität;

— Beschreibung etwaiger sonstiger relevanter Beobachtungen, falls zutreffend.

Erörterung der Ergebnisse

— Erörterung der anhand des IL-8-Luc-Tests erhaltenen Ergebnisse;

— Erörterung der Test-Ergebnisse im Rahmen eines IATA, sofern andere sachdienliche Informationen verfügbar sind.

Schlussfolgerung

LITERATURHINWEISE

(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 Aasay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Verfügbar unter: 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. Verfügbar unter: 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. Verfügbar unter: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol 69:371–9.

(6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. Toxicol *In Vitro* 29:1816–30.

(7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol 71:337–51.

(8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275–84.

(9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147–155.

(10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646–57.

(11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en.

(12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286–91.

(13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271–9.

(14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891–4.

(15) OECD (2017). To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, Frankreich

(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, Frankreich.

(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. Verfügbar unter: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Verfügbar unter. http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

(19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046–9.

(20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OECD, Paris, Frankreich.

(21) Vereinte Nationen (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sechste überarbeitete Fassung. New York und Genf: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Verfügbar unter: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

Anlage 3.1

DEFINITIONEN

Genauigkeit: Grad der Übereinstimmung zwischen Prüfergebnissen und anerkannten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der „Relevanz". Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung" verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse eines Tests (16).

AOP (Adverse Outcome Pathway): Abfolge von Vorgängen, ausgehend von der chemischen Struktur einer Zielchemikalie oder Zielgruppe ähnlicher Chemikalien, über den molekularen auslösenden Vorgang bis hin zu einem In-vivo-Ergebnis von Interesse (20).

Chemikalie: Stoff oder Gemisch.

CV05: Zellviabilität 05, d. h. die Mindestkonzentration, bei der die Chemikalien weniger als 0,05 von Inh-GAPLA aufweisen.

FInSLO-LA: Abkürzung, die im Validierungsbericht und in vorherigen Veröffentlichungen bezüglich des IL-8-Luc-Tests verwendet wurde, um sich auf Ind-IL8LA zu beziehen. Siehe Ind-IL8LA für eine Definition.

GAPLA: Luciferase-Aktivität der „Stable Luciferase Red (SLR)" (λmax = 630 nm), reguliert durch den GAPDH-Träger und zeigt die Zellviabilität und die Anzahl der lebensfähigen Zellen auf.

Gefahr: Inhärente Eigenschaft eines Stoffes oder einer Situation, potenziell schädigende Auswirkungen zu haben, wenn ein Organismus, ein System oder eine (Teil-)Population diesem Stoff ausgesetzt ist.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): Ein strukturierter Ansatz zur Gefahrenidentifizierung (Potenzial), Gefahrencharakterisierung (Potenz) und/oder Sicherheitsbeurteilung (Potenzial/Potenz und Exposition) einer Chemikalie oder Gruppe von Chemikalien, der strategisch sämtliche relevanten Daten für eine informierte regulatorische Entscheidung hinsichtlich potenziellen Gefahren und/oder Risiken und/oder des Bedürfnisses weiterer gezielter und somit minimaler Tests integriert und abwägt.

II-SLR-LA: Abkürzung, die im Validierungsbericht und in vorherigen Veröffentlichungen bezüglich des IL-8-Luc-Tests verwendet wurde, um sich auf Inh-GAPLA zu beziehen. Siehe Inh-GAPLA für eine Definition

IL-8 (Interleukin-8): Ein aus Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Makrophagen und Monozyten abgeleitetes Zytokin, das Chemotaxis von Neutrophilen und T-Zell-Lymphozyten verursacht.

IL8LA: Luciferase-Aktivität von „Stable Luciferase Orange (SLO)" (λmax = 580 nm), reguliert durch IL-8-Träger.

Ind-IL8LA: n-fache Induktion von nIL8LA. Der Wert wird erhalten, indem der nIL8LA der THP-G8-Zellen, die mit Chemikalien behandelt wurden, durch den der nicht stimulierten THP-G8-Zellen geteilt wird und die Induktion der IL-8-Trägeraktivität durch Chemikalien darstellt.

Inh-GAPLA: Hemmung von GAPLA. Der Wert wird erhalten, indem GAPLA des mit Chemikalien behandelten THP-G8 durch GAPLA des nicht behandelten THP-G8 geteilt wird und die Zytotoxizität der Chemikalien darstellt.

Minimaler Induktionsschwellenwert (MIT): die niedrigste Konzentration, bei der eine Chemikalie die positiven Kriterien erfüllt

Gemisch: Ein Gemisch oder eine Lösung, die aus zwei oder mehreren Stoffen besteht.

Einkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens 80 % w/w vorhanden ist.

Mehrkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von ≥ 10 % w/w und < 80 % w/w vorhanden sind. Ein mehrkomponentiger Stoff ist das Ergebnis eines Herstellungsprozesses. Der Unterschied zwischen einem Gemisch und einem mehrkomponentigen Stoff besteht darin, dass ein Gemisch durch die Mischung von zwei oder mehr Stoffen ohne chemische Reaktion entsteht. Ein mehrkomponentiger Stoff wird durch eine chemische Reaktion gebildet.

nIL8LA: Die SLO-Luciferase-Aktivität, die die IL-8-Trägeraktivität (IL8LA) widerspiegelt, die durch die SLR-Luciferase-Aktivität normalisiert wird, die die GAPDH-Trägeraktivität (GAPLA) widerspiegelt. Der Wert stellt die IL-8-Trägeraktivität nach Berücksichtigung der Zellviabilität oder der Zellanzahl dar.

nSLO-LA: Abkürzung, die im Validierungsbericht und in vorherigen Veröffentlichungen bezüglich des IL-8-Luc-Tests verwendet wurde, um sich auf nIL8LA zu beziehen. Siehe nIL8LA für eine Definition

Positivkontrolle: Ein Replikat, das alle Komponenten eines Prüfsystems enthält und mit einem Stoff behandelt wird, der bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Um sicherzustellen, dass Abweichungen bei der Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

Prähaptene: Chemikalien, die durch abiotische Transformation zu Allergenen werden.

Prohaptene: Chemikalien, die eine enzymatische Aktivierung erfordern, um ihr Hautsensibilisierungspotenzial auszuschöpfen.

Relevanz: Beschreibung der Beziehung zwischen dem Test und der untersuchten Wirkung und ob der Test aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Die Relevanz gibt an, inwieweit der Test die untersuchte biologische Wirkung richtig misst oder vorhersagt. Die Relevanz umfasst die Einbeziehung der Genauigkeit (Übereinstimmung) eines Tests (16).

Zuverlässigkeit: Maß der Reproduzierbarkeit einer Prüfmethode innerhalb von und zwischen Labors über einen längeren Zeitraum und bei einheitlichem Protokoll. Die Zuverlässigkeit wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit und Intralabor-Wiederholbarkeit bewertet (16).

Durchlauf: Ein Durchlauf besteht aus einer oder mehreren hintereinander getesteten Prüfchemikalien mit einer Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle und mit einer Positivkontrolle.

Sensitivität: Der Anteil aller positiven/wirkungsvollen Chemikalien, die durch den Test korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit eines Tests mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (16).

SLO-LA: Abkürzung, die im Validierungsbericht und in vorherigen Veröffentlichungen bezüglich des IL-8-Luc-Tests verwendet wurde, um sich auf IL8LA zu beziehen. Siehe IL8LA für eine Definition.

SLR-LA: Abkürzung, die im Validierungsbericht und in vorherigen Veröffentlichungen bezüglich des IL-8-Luc-Tests verwendet wurde, um sich auf GAPLA zu beziehen. Siehe GAPLA für eine Definition.

Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle: Eine unbehandelte Probe, die sämtliche Komponenten eines Prüfsystems enthält, außer der Prüfchemikalie, aber einschließlich des verwendeten Lösungsmittels/Vehikels. Sie wird verwendet, um die Referenzreaktion für die mit der Prüfchemikalie behandelten Proben, die im selben Lösungsmittel oder Vehikel aufgelöst oder stabil verteilt wurden, zu bestimmen. Wenn mit einer simultanen Medienkontrolle geprüft wird, zeigt diese Probe außerdem, ob das Lösungsmittel oder Vehikel mit dem Prüfsystem interagiert.

Spezifität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit eines Tests mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (16).

Stoff: Chemische Elemente und ihre Verbindungen in natürlicher Form oder durch ein Produktionsverfahren hergestellt, einschließlich der zur Wahrung der Produktstabilität erforderlichen Zusatzstoffe und der bei der Herstellung entstehenden Verunreinigungen, mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können.

Tensid: Dies eine Substanz, auch oberflächenaktives Mittel genannt, wie z. B. ein Waschmittel, die die Oberflächenspannung einer Flüssigkeit reduzieren und ihr somit ermöglichen kann, zu schäumen oder Feststoffe zu durchdringen; ein Tensid wird auch als Netzmittel bezeichnet. (TG437)

Prüfchemikalie: Stoffe oder Gemische, die mit dieser Methode geprüft wurden.

THP-G8: Eine IL-8-Reporter-Zelllinie, die im IL-8-Luc-Test verwendet wird. Die humane makrophagenähnliche Zelllinie THP-1 wurde unter der Kontrolle der IL-8- bzw. GAPDH-Träger mit den SLO- und SLR-Luciferasegenen transfiziert.

Globales Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (UN-GHS): Ein System, das die Einstufung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) gemäß normierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und Umweltgefahren vorschlägt und entsprechende Kommunikationselemente wie Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenberichte, Berichte zu Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitsdatenblätter anspricht, damit Informationen zu Nebenwirkungen mit Blick auf den Schutz von Menschen (einschließlich Mitarbeitern, Arbeitern, Logistikern, Verbrauchern und Ersthelfern) und der Umwelt zu übermitteln (21).

UVCB: Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Gültige Prüfmethode: Ein Test, von der angenommen wird, dass sie über ein ausreichendes Maß an Relevanz und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck verfügt und die auf wissenschaftlich bewährten Prinzipien basieren. Ein Test ist niemals in einem absoluten Sinn gültig, sondern im Verhältnis zu einem definierten Zweck.

Anlage 3.2

GRUNDSATZ DER MESSUNG DER LUCIFERASE-AKTIVITÄT UND BESTIMMUNG DER ÜBERTRAGUNGSKOEFFIZIENTEN DES OPTISCHEN FILTERS FÜR SLO UND SLR

Das MultiReporter-Prüfsystem -Tripluc- kann mit einem Luminometer des Typs Mikroplatte mit einem mehrfarbigen Erkennungssystem verwendet werden, das einen optischen Filter ausstatten kann (z. B. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Der bei Messungen verwendete optische Filter ist ein 600–620 nm Lang- oder Kurzpassfilter oder ein 600–700 nm Bandpassfilter.

Messung der zweifarbigen Luciferasen mit einem optischen Filter.

Dies ist ein Beispiel, das Phelios AB-2350 (ATTO) verwendet. Dieses Luminometer ist mit einem 600 nm Langpassfilter (R60 HOYA Co., 600 nm LP, Filter 1) zum Splitten der SLO- (λmax = 580 nm) und SLR-Lumineszenz (λmax = 630 nm) ausgestattet.

Um die Übertragungskoeffizienten des 600 nm LP zu bestimmen muss zuerst mit aufbereiteten SLO- und SLR-Luciferase-Enzymen i) die SLO- und SLR-Biolumineszenzintensität ohne Filter (F0), ii) die SLO- und SLR-Biolumineszenzintensität, die durch den 600 nm LP (Filter 1) passiert ist, gemessen werden und iii) die Übertragungskoeffizienten des 600 nm LP für die unten aufgeführten SLO und SLR berechnet werden.

Übertragungskoeffizienten		Abkürzung	Definition
SLO	Filter 1 Übertragungs-koeffizient	κO_{R60}	Definition Übertragungskoeffiziet des Filters für die SLO
SLR	Filter 1 Übertragungs-koeffizient	κR_{R60}	Definition Übertragungskoeffiziet des Filters für die SLR

Wenn die Intensität von SLO und SLR in Prüfproben als O bzw. R definiert ist, werden i) die Intensität des Lichts ohne Filter (alle optisch) F0 und ii) die Intensität des Lichts, das durch den 600 nm LP (Filter 1) F1 geschickt wird, wie unten beschrieben.

$F0 = O + R$

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

Diese Formeln können wie folgt umformuliert werden:

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

Dann können anhand der berechneten Transmissionsfaktoren (κO_{R60} und κR_{R60}) der gemessenen F0 and F1 die O- und R-Werte wie folgt berechnet werden:

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

Materialien und Methoden zur Bestimmung des Transmissionsfaktors

(1) *Reagenzien*

Einzelne aufbereitete Luciferase-Enzyme:

Lyophilisiertes aufbereitetes SLO-Enzym

Lyophilisiertes aufbereitetes SLR-Enzym

(die für die Validierungsarbeiten von GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan mit THP-G8-Zelllinie erhalten wurden)

Test-Reagenz:

Tripluc® Luciferase-Test-Reagenz (zum Beispiel aus TOYOBO Kat. Nr. MRA-301)

Medium: für Luciferase-Test (30 ml, gelagert bei 2–8°C)

Reagenz	Konz.	Finale Konz. in Medium	Erforder-liche Menge
RPMI-1640	—	—	27 ml
FBS	—	10 %	3 ml

(2) *Herstellung der Enzymlösung*

Das lyophilisierte, aufbereitete Luciferase-Enzym im Röhrchen lösen, indem 200 µl 10 ~ 100 mM Tris/HCl oder Hepes/HCl (pH 7,5 ~ 8,0) mit 10 % (w/v) Glycerol hinzugefügt werden, die Enzymlösung in 10 µl Aliquoten in Einwegröhrchen mit einem Volumen von 1,5 ml aufgeteilt wird und diese bei -80 °C in einem Gefrierschrank gelagert werden. Die gefrorene Enzymlösung kann bis zu 6 Monate verwendet werden. Wenn es verwendet wird, dann 1 ml des Mediums für den Luciferase-Test (RPMI-1640 mit 10 % FBS) zu jedem Röhrchen mit den Enzymlösungen (verdünnte Enzymlösung) hinzufügen und diese auf Eis halten, um eine Deaktivierung zu verhindern.

(3) *Messung der Biolumineszenz*

Tripluc®-Luciferase-Test-Reagenz (Tripluc) auftauen und bei Raumtemperatur entweder in einem Wasserbad oder bei Umgebungslufttemperatur aufbewahren. Das Luminometer 30 Minuten vor Beginn der Messungen einschalten, damit sich der Fotovervielfacher stabilisieren kann. 100 µl der verdünnten Enzymlösung in eine schwarze Platte mit 96 Mulden übertragen (flache Unterseite) (die SLO-Referenzprobe zu #B1, #B2, #B3, die SLR-Referenzprobe zu #D1, #D2, #D3). Anschließend 100 µl vorgewärmtes Tripluc mithilfe eines Pipetman in jede Mulde der Platte geben, die die verdünnte Enzymlösung enthält. Die Platte 10 Minuten lang bei Raumtemperatur (ca. 25 °C) mit einem Platten-Schüttler schütteln. Die Luftblasen aus den Lösungen in den Mulden entfernen, wenn diese erscheinen. Die Platte im Luminometer platzieren, um die Luciferase-Aktivität zu messen. Die Biolumineszenz wird jeweils 3 Sekunden lang in der Abwesenheit (F0) und Anwesenheit (F1) des optischen Filters gemessen.

Der Übertragungskoeffizient des optischen Filters wurde wie folgt berechnet:

Übertragungskoeffizient (SLO (κO_{R60}))= (Anz. B1 von F1+ Anz. B2 von F1+ Anz. B3 von F1) / (Anz. B1 von F0+ Anz. B2 von F0+ Anz. B3 von F0)

Übertragungskoeffizient (SLR (κR_{R60}))= (Anz. D1 von F1+ Anz. D2 von F1+ Anz. D3 von F1) / (Anz. D1 von F0+ Anz. D2 von F0+ Anz. D3 von F0)

Die berechneten Transmissionsfaktoren werden für alle Messungen verwendet, die mit demselben Luminometer durchgeführt werden.

Qualitätskontrolle der Ausrüstung

Es sollten die im IL-8-Luc-Protokoll beschriebenen Verfahren verwendet werden (18).

Anlage 3.3

LEISTUNGSSTOFFE

Vor der routinemäßigen Anwendung des in dieser Anlage zu Prüfmethode B.71 beschriebenen Tests sollten Labors ihre technische Leistungsfähigkeit demonstrieren, indem sie die erwartete IL-8-Luc-Vorhersage für die in Tabelle 1 empfohlenen 9 Stoffe ermitteln und die Werte, die in den betreffenden Referenzbereich fallen, bei mindestens 8 der 9 Leistungsstoffe bestimmen (ausgewählt, um den Reaktionsbereich für Hautsensibilisierungsgefahren zu repräsentieren). Weitere Auswahlkriterien betrafen die Erhältlichkeit der Stoffe im Handel, und dass qualitativ hochwertige In-vivo-Referenzdaten sowie qualitativ hochwertige In-vitro-Daten aus dem IL-8-Luc-Test verfügbar sind. Außerdem sind veröffentlichte Referenzdaten für den IL-8-Luc-Test verfügbar (6) (1).

Tabelle 1

Empfohlene Stoffe zum Nachweis der technischen Leistungsfähigkeit beim IL-8-Luc-Test

Leistungsstoffe	CAS Nr.	Zustand	Löslichkeit in X-VIVO15 bei 20 mg/ml	In-vivo-Vorhersage (1)	IL-8 Luc-Vorhersage (2)	Referenzbereich (µg/ml) (3)	
						CV_{05} (4)	IL-8 Luc MIT (5)
2,4-Dinitrochlorbenzol	97-00-7	fest	unlöslich	Sensibilisator (extrem)	positiv	2,3–3,9	0,5–2,3
Formaldehyd	50-00-0	flüssig	löslich	Sensibilisator (stark)	positiv	9–30	4–9
2-Mercaptobenzothiazol	149-30-4	fest	unlöslich	Sensibilisator (mäßig)	positiv	250–290	60–250
Ethylendiamin	107-15-3	flüssig	löslich	Sensibilisator (mäßig)	positiv	500–700	0,1–0,4
Ethylenglykoldimethacrylat	97-90-5	flüssig	unlöslich	Sensibilisator (schwach)	positiv	> 2 000	0,04–0,1
4-Allylanisol (Estragol)	140-67-0	flüssig	unlöslich	Sensibilisator (schwach)	positiv	> 2 000	0,01–0,07
Streptomycinsulfat	3810-74-0	fest	löslich	Nichtsensibi-lisator	negativ	> 2 000	> 2 000
Glyzerin	56-81-5	flüssig	löslich	Nichtssensibi-lisator	negativ	> 2 000	> 2 000
Isopropanol	67-63-0	flüssig	löslich	Nichtsensibi-lisator	negativ	> 2 000	> 2 000

Abkürzungen: CAS-Nr. = Registernummer des Chemical Abstracts Service
(1) Die In-vivo-Potenz wird unter Anwendung der von ECETOC vorgeschlagenen Kriterien abgeleitet (19).
(2) Basierend auf den historischen beobachteten Werten (1) (6).
(3) CV_{05} und IL-8 Luc MIT wurden mithilfe der durch EPI Suite™ gegebenen Wasserlöslichkeit berechnet.
(4) CV_{05}: die Mindestkonzentration, bei der die Chemikalien weniger als 0,05 von Inh-GAPLA aufweisen.
(5) MIT: die niedrigsten Konzentrationen, bei denen eine Chemikalie die positiven Kriterien erfüllt.

Anlage 3.4

INDIZES UND URTEILSKRITERIEN

nIL8LA (nSLO-LA)

Die j. Wiederholung (j = 1–4) der i. Konzentration (i = 0–11) wird für IL8LA (SLO-LA) bzw. GAPLA (SLR-LA) gemessen. Die normalisierte IL8LA wird bezeichnet als nIL8LA (nSLO-LA) und definiert als:

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

Dies ist die Grundmaßeinheit in diesem Test.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Die vielfache Steigerung der gemittelten nIL8LA (nSLO-LA) für die Wiederholung auf der i. Konzentration im Vergleich zu ihr bei der 0-Konzentration, Ind-IL8LA, ist die primäre Messung dieser Tests. Das Verhältnis wird durch die folgende Formel bestimmt:

$$\text{Ind} - \text{IL8LA}_i = \left\{(1/4) \times \sum_j \text{nIL8LA}_{ij}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_j \text{nIL8LA}_{0j}\right\}$$

Das Hauptlabor hat vorgeschlagen, dass ein Wert von 1,4 einem positiven Ergebnis für die geprüfte Chemikalie entspricht. Dieser Wert basiert auf der Untersuchung der historischen Daten des Hauptlabors. Das Datenmanagement-Team nutzte diesen Wert dann in allen Phasen der Validierungsstudie. Das primäre Ergebnis, Ind-IL8LA, ist das Verhältnis von 2 arithmetischen Mitteln, wie sie in der Gleichung dargestellt werden.

95 % Konfidenzintervall (95 % CI)

Das auf dem Verhältnis basierende 95 % Konfidenzintervall (95 % CI) kann so eingeschätzt werden, dass es die Präzision dieser primären Ergebnismessung zeigt. Die untere Grenze des 95 % CI ≥ 1 zeigt an, dass die nIL8LA mit der i. Konzentration deutlich größer ist als die mit Lösungsmittelkontrolle. Es gibt verschiedene Arten, auf die das 95 % CI erstellt wird. Wir nutzten die Methode, die in dieser Studie als Fiellers Theorem bekannt ist. Das Theorem des 95 % Konfidenzintervalls wird aus der folgenden Formel erhalten:

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

Dabei gilt:

$$A = \overline{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \overline{x} \times \overline{y}$$

$C = \overline{y}_i^2 - t_{0.975(\nu)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}$, and $n_0 = 4$

$\overline{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}$

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

$n_{yi} = 4$

$\overline{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \overline{y}_i)^2$

$t_{0,975(\nu)}$ ist das 97,5te Perzentil der zentralen t-Verteilung mit dem ν des Freiheitsgrades, wobei

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Die Inh-GAPLA ist ein Verhältnis der gemittelten GAPLA (SLR-LA) für die Wiederholung der i. Konzentration im Vergleich zu der mit Lösungsmittelkontrolle und dies wird folgendermaßen bestimmt:

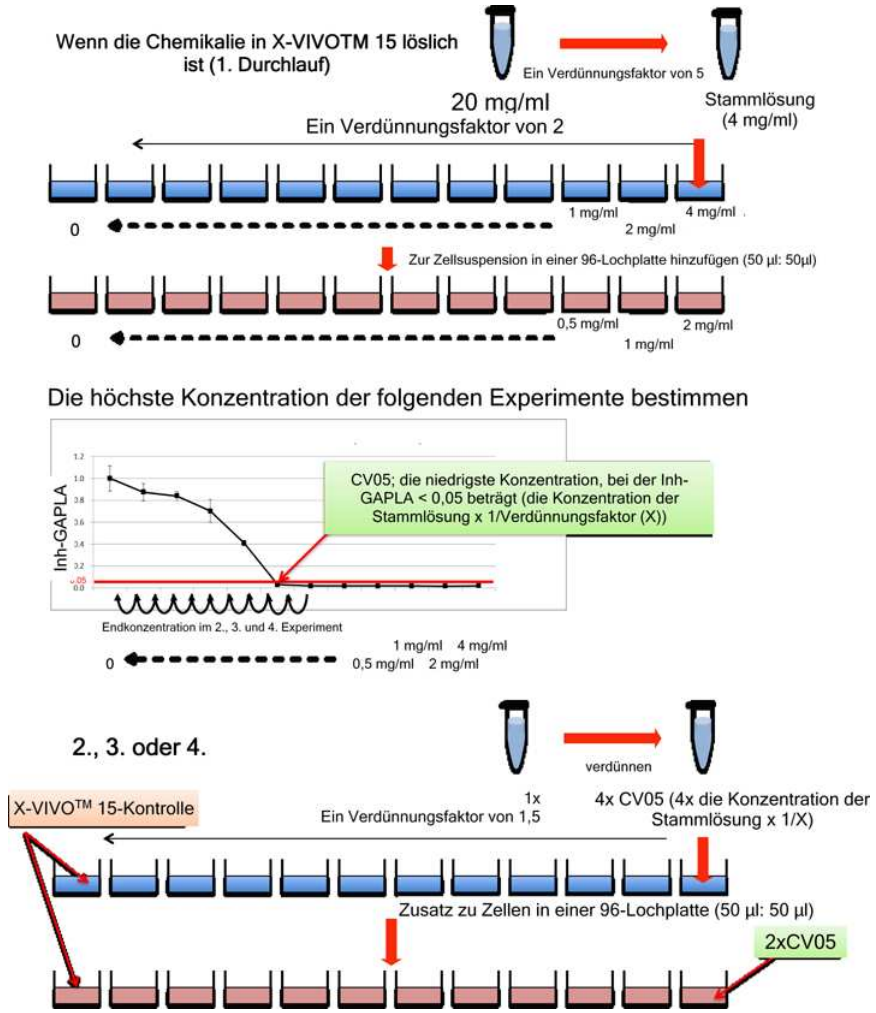
$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

Da die GAPLA der Nenner der nIL8LA ist, verursacht ein extrem kleiner Wert eine große Schwankung der nIL8LA. Deshalb können Ind-IL8LA-Werte mit einem extrem kleinen Wert von Inh-GAPLA (weniger als 0,05) als eine schlechte Präzision angesehen werden.

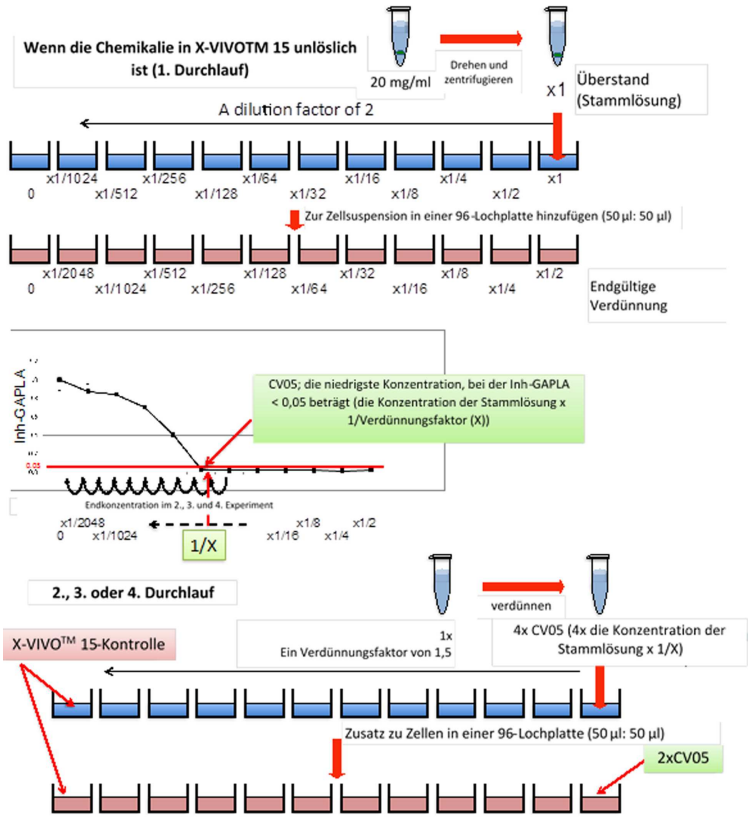
Anlage 3.5

DAS SCHEMA DER METHODEN ZUM LÖSEN VON CHEMIKALIEN FÜR DEN IL-8-LUC-TEST.

(a) Bei Chemikalien, die bei 20 mg/ml in X-VIVO™ 15 gelöst sind

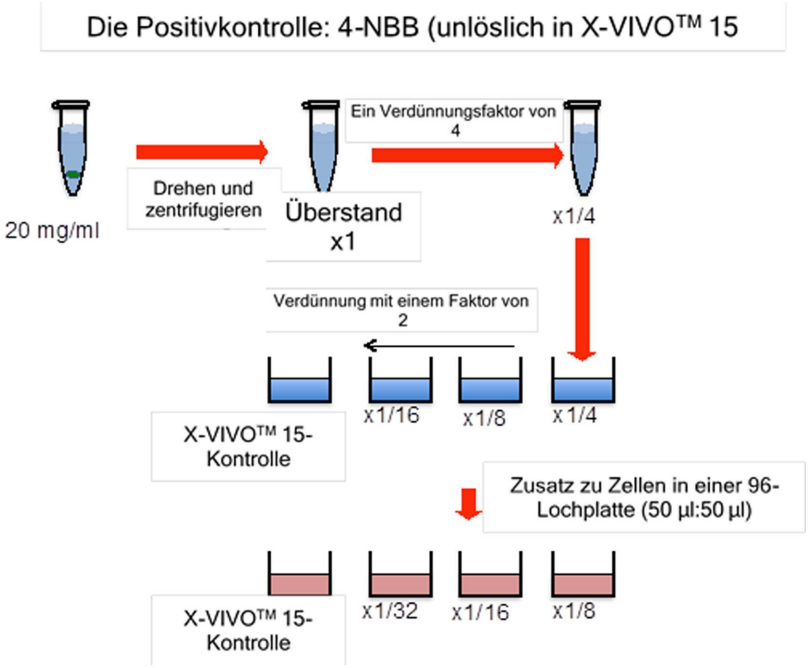


(b) Bei Chemikalien, die bei 20 mg/ml in X-VIVO™ 15 unlöslich sind



Anlage 3.6

DAS SCHEMA DER METHODE ZUM LÖSEN VON 4-NBB FÜR DIE POSITIVKONTROLLE DES IL-8-LUC-TESTS.



“

(9) In Teil C werden die folgenden Kapitel angefügt:

„C.52 **MEDAKA ERWEITERTE 1-GENERATIONEN-REPRODUKTIONSTEST (MEOGRT)**

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 240 (2015). Der Medaka Extended One Generation Test (MEOGRT) beschreibt eine umfassende Prüfmethode auf der Grundlage von Fischen, die über mehrere Generationen hinweg exponiert werden, um Daten für die ökologische Gefahren- und Risikobeurteilung von Chemikalien zu liefern, einschließlich von Chemikalien mit mutmaßlicher endokriner Wirkung (EDCs). Die Exposition während des MEOGRT wird bis zum Schlüpfen (bis zwei Wochen nach der Befruchtung, wpf) in der zweiten (F2) Generation fortgesetzt. Zusätzliche Untersuchungen wären erforderlich, um die Erweiterung der F2-Generation über das Schlüpfen hinaus zu rechtfertigen; zu diesem Zeitpunkt gibt es nicht genügend Informationen, um relevante Bedingungen oder Kriterien für die Berechtigung der Erweiterung der F2-Generation zu gewährleisten. Diese Prüfmethode kann jedoch regelmäßig aktualisiert werden, um neue Informationen und Daten zu berücksichtigen. Beispielsweise könnten Leitlinien zur Erweiterung der F2-Generation durch Reproduktion unter bestimmten Umständen potenziell hilfreich sein (z. B. Chemikalien mit einem hohen Biokonzentrationspotenzial oder Anzeichen von generationsübergreifenden Auswirkungen in anderen Taxa). Diese Prüfmethode kann verwendet werden, um die potenziellen chronischen Effekte von Chemikalien bei Fischen zu beurteilen, einschließlich von Chemikalien mit potenziell endokriner Wirkung. Diese Methode legt ihren primären Schwerpunkt auf die potenziell populationsrelevanten Effekte (nämlich negative Auswirkungen auf das Überleben, die Entwicklung, das Wachstum und die Reproduktion) für die Berechnung einer No Observed Effect Concentration (NOEC) oder einer Effect Concentration (ECx), obwohl angemerkt werden sollte, dass ECx-Ansätze sich selten für große Studien dieser Art eignen, bei denen die Steigerung der Prüfkonzentrationen zur Bestimmung der gewünschten ECx unpraktisch sein kann, was aufgrund der hohen Anzahl an untersuchten Tieren auch zu beträchtlichen Bedenken hinsichtlich des Wohlbefindens der Tiere führen kann. Bei Chemikalien, die keine Beurteilung über mehrere Generationen hinweg erfordern oder Chemikalien, die keine Chemikalien mit potenziell endokriner Wirkung sind, eignen sich andere Prüfmethoden eventuell eher (1). Der japanische Reiskärpfling ist aufgrund seines kurzen Lebenszyklus und der Möglichkeit, sein genetisches Geschlecht (2) zu bestimmen, was als kritische Komponente für diese Prüfmethode angesehen wird, die geeignete Spezies für diese Prüfmethode. Die spezifischen Methoden und Beobachtungsendpunkte, die in dieser Methode aufgeführt werden, gelten nur für den japanischen Reiskärpfling. Andere kleine Fischarten (z. B. Zebrafisch) können an ein ähnliches Prüfprotokoll angepasst werden.

2. Diese Prüfmethode misst verschiedene biologische Endpunkte. Der primäre Schwerpunkt liegt auf den potenziellen negativen Auswirkungen auf die populationsrelevanten Parameter, einschließlich Überleben, grobe Entwicklung, Wachstum und Reproduktion. Um mechanistische Informationen und eine Verbindung zwischen Ergebnissen anderer Arten von Feld- und Laborstudien bereitzustellen, bei denen es a posteriori Nachweise dafür gibt, dass eine Chemikalie potenziell die Aktivität eines endokrinen Disruptors aufweist (z. *B.* androgene oder östrogene Aktivitäten bei anderen Prüfungen und Tests), dann werden zweitrangig andere nützliche Informationen gewonnen, indem *Vitellogenin* (*vtg)* mRNA (oder Vitellogeninprotein, VTG), phänotypische sekundäre Geschlechtsmerkmale (SSC) in Bezug auf das genetische Geschlecht gemessen werden und die Histopathologie bewertet wird. Es sollte angemerkt werden, dass wenn von einer Prüfchemikalie oder ihren Stoffwechselprodukten nicht angenommen wird, dass sie EDCs sind, es eventuelle nicht erforderlich ist, diese sekundären Endpunkte zu messen und weniger ressourcen- und tierintensive Studien angemessener sein könnten (1). Die in dieser Prüfmethode verwendeten Begriffe sind in Anlage 1 definiert.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

3. Aufgrund der begrenzten Anzahl an geprüften Chemikalien und Laboren, die an der Validierung dieses eher komplexen Tests beteiligt sind, wird erwartet, dass die Prüfmethode überarbeitet und wenn erforderlich im Hinblick auf die gewonnene Erfahrung aktualisiert wird, wenn eine ausreichende Anzahl an Studien verfügbar ist, um den Einfluss dieses neuen Studiendesigns zu ermitteln. Die Daten können auf Stufe 5 des OECD-Rahmenkonzepts zur Prüfung und Bewertung der endokrinen Disruptoren verwendet werden (3). Die Prüfmethode beginnt damit, den adulten Fisch (die F0-Generation) in der Reproduktionsphase der Prüfchemikalie auszusetzen. Die Exposition wird über die Entwicklung und Reproduktion in der F1- und über das Schlüpfen in der F2-Generation fortgesetzt; daher ermöglicht der Test die Bewertung der strukturellen und aktivierenden endokrinen Pfade. Ein Konzept der Beweiskraft der Daten kann angewandt werden, wenn die auf Endokrine bezogenen Endpunkte interpretiert werden.

4. Der Test sollte eine ausreichende Anzahl an Individuen umfassen, um ausreichend Leistung für die Beurteilung der reproduktionsrelevanten Endpunkte (siehe Anlage 3) zu gewährleisten, während sichergestellt wird, dass die Anzahl der verwendeten Tiere aus Gründen des Wohlbefindens der Tiere minimal ist. Mit Blick auf die hohe Zahl der verwendeten Versuchstiere ist es wichtig, das Bedürfnis für den Test in Verbindung mit bestehenden Daten, die bereits relevante Informationen zu vielen der Endpunkte des MEOGRT enthalten könnten, sorgfältig abzuwägen. Hilfestellung zu dieser Angelegenheit kann dem OECD-Rahmen zur Toxizitätsprüfung an Fischen (1) entnommen werden.

5. Die Prüfmethode wurde primär entwickelt, um die Wirkungen eines einzelnen Stoffes zu unterscheiden. Wenn jedoch ein Test eines Gemischs erforderlich ist, sollte geprüft werden, ob sie für solche Zwecke geeignete Ergebnisse liefert.

6. Vor Beginn des Tests ist es wichtig, Informationen über die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfchemikalie zu haben, insbesondere, um die Herstellung stabiler chemischer Lösungen zu gewährleisten. Es ist zudem erforderlich, eine ausreichend sensitive Methode zur Verifizierung der Konzentrationen der Prüfchemikalie zu besitzen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

7. Der Test beginnt, indem geschlechtsreife männliche und weibliche Fische (mindestens 12 wpf) 3 Wochen lang in Brutpaaren gehalten werden. In dieser Zeit wird die Prüfchemikalie je nach ihrem toxikokinetischen Verhalten im Organismus der Elterngeneration (F0) verteilt. Die Eier werden so nahe wie möglich um den ersten Tag der vierten Woche herum gesammelt, um die F1-Generation zu starten. Während der Aufzucht der F1-Generation (insgesamt 15 Wochen) werden die Schlupffähigkeit und das Überleben bewertet. Zusätzlich dazu werden für Entwicklungsendpunkte Stichproben der Fische bei 9-10 wpf entnommen und das Laichen drei Wochen lang von 12 bis 14 wpf beurteilt. Eine F2-Generation wird nach der dritten Woche der Reproduktionsbewertung gestartet und aufgezogen, bis die Schlüpfphase abgeschlossen ist.

TESTVALIDITÄTSKRITERIEN

8. Es gelten die folgenden Kriterien für die Testvalidität:

— Die Konzentration des gelösten Sauerstoffs sollte während der gesamten Prüfdauer > 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts betragen;

— Die mittlere Wassertemperatur über die gesamte Dauer der Studie hinweg sollte zwischen 24 und 26 °C liegen. Kurze Abweichungen vom Mittelwert der einzelnen Aquarien sollten nicht mehr als 2 °C betragen;

— Die mittlere Fruchtbarkeit der Kontrollen in jeder Generation (F0 und F1) sollte mehr als 20 Eier pro Paar pro Tag betragen. Die Fertilität aller gelegten Eier sollte während der Beurteilung mehr als 80 % betragen. Zusätzlich dazu sollten 16 der empfohlenen 24 Kontrollbrutpaare (> 65 %) mehr als 20 Eier pro Paar pro Tag legen;

— Die Schlupffähigkeit der Eier sollte bei den Kontrollen ≥ 80 % (Durchschnitt) betragen (in jeder der F1- und F2-Generationen);

— Das Überleben nach dem Schlüpfen bis 3 wpf und ab 3 wpf bis zum Sterben der Generation F1 (d. h. 15 wpf) sollte bei den Kontrollen ≥ 80 % (Durchschnitt) und ≥ 90 % (Durchschnitt) betragen (F1);

— es muss belegt werden, dass die Konzentrationen der Prüfchemikalie in der Lösung mit einer Toleranz von ± 20 % bezogen auf die gemessenen Mittelwerte aufrechterhalten wurden;

Obwohl dies kein Validitätskriterium ist, sollten sich Replikate hinsichtlich der Wassertemperatur in einer Behandlung statistisch nicht voneinander unterscheiden und Behandlungsgruppen innerhalb des Tests sollten sich auch statistisch nicht voneinander unterscheiden (auf der Grundlage täglicher Temperaturmessungen und kurze Abweichungen ausgenommen).

9. Obwohl eine verringerte Reproduktion in den Gruppen mit einer höheren Exposition beobachtet werden kann, sollte es in mindestens der dritthöchsten Gruppe und allen niedrigeren Gruppen von F0 zu einer ausreichenden Reproduktion kommen, um die Schlüpfinkubatoren zu füllen. Zudem sollten genügend Embryos in den Gruppen mit der dritthöchsten und den niedrigeren Expositionen in F1 überleben, um eine Endpunktbeurteilung bei der Probenahme der fast ausgewachsenen Tiere zu ermöglichen (siehe Abschnitte 36 und 38 sowie Anlage 9). Zusätzlich sollte es in der F1-Gruppe mit der zweithöchsten Exposition mindestens eine minimale Überlebenschance nach dem Schlüpfen (~20 %) geben. Dies sind keine Validitätskriterien per se, sondern Empfehlungen, damit solide NOECs berechnet werden können.

10. Wird eine Abweichung von den Testvaliditätskriterien beobachtet, sollte geprüft werden, welche Folgen dies für die Zuverlässigkeit der Testergebnisse hat, und diese Abweichungen und Erwägungen sollten in den Prüfbericht aufgenommen werden.

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Apparatur

11. Übliche Laborausrüstung und insbesondere die folgenden Geräte:

(a) Sauerstoff- und pH-Messgeräte;

(b) Geräte zur Messung von Wasserhärte und Alkalität;

(c) geeignete Apparatur zur Temperaturregelung und einer möglichst kontinuierlichen Überwachung;

(d) Becken aus chemisch inertem Material und mit für das empfohlene Besatzverhältnis und die empfohlene Besatzdichte geeignetem Fassungsvermögen (siehe Anlage 3);

(e) Waage mit angemessener Genauigkeit (± 0,5 mg).

Wasser

12. Als Prüfwasser kann jedes beliebige Wasser verwendet werden, in dem die Prüfspezies über einen längeren Zeitraum überleben und wachsen können. Während der gesamten Prüfdauer sollte eine konstante Wasserqualität gewährleistet sein. Um sicherzustellen, dass das Verdünnungswasser das Prüfergebnis nicht übermäßig beeinflusst (beispielsweise durch Komplexierung der Prüfchemikalie) oder sich nachteilig auf die Leistung des Zuchtbestands auswirkt, sollten in Abständen Proben zur Analyse entnommen werden. Das Wasser ist auf Schwermetalle (z. B. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), dominante Anionen und Kationen (z. B. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, $SO_4{}^{2-}$), Pestizide, den gesamten organischen Kohlenstoff und suspendierte Feststoffe zu untersuchen (beispielsweise alle sechs Monate, wenn bekannt ist, dass das Wasser qualitativ gesehen relativ konstant ist). Einige chemische Merkmale akzeptablen Verdünnungswassers sind in Anlage 2 aufgeführt. Der pH-Wert des Wassers sollte im Bereich 6,5 bis 8,5 liegen und während des Tests nicht um mehr als ± 0,5 pH-Einheiten schwanken.

Expositionssystem

13. Das Design und die Materialien für das Expositionssystem werden nicht spezifiziert. Es sollte Glas, Edelstahl oder andere chemisch trägen Materialien für die Konstruktion des Prüfsystems verwendet werden, das bei vorherigen Tests nicht kontaminiert wurde. Für den Zweck dieses Tests kann ein gut geeignetes Expositionssystem aus einem kontinuierlichen Durchflusssystem bestehen (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13).

Prüflösungen

14. Die Stammlösung der Prüfchemikalie sollte mithilfe einer geeigneten Pumpe in das Expositionssystem befördert werden. Die Durchflussrate der Stammlösung sollte gemäß der analytischen Bestätigung der Prüflösungen vor der Einleitung der Exposition kalibriert und während des Tests regelmäßig volumetrisch kontrolliert werden. Die Prüflösung in jeder Kammer wird in Abhängigkeit der Prüfchemikalienstabilität und der Wasserqualität angemessen erneut (z. B. mindestens 5 Volumenerneuerungen/Tag bis 16 Volumenerneuerungen/Tag oder bis zu 20 ml/min Durchfluss).

15. Die Prüflösungen werden durch Verdünnung einer Stammlösung in den gewünschten Konzentrationen zubereitet. Die Stammlösung sollte vorzugsweise durch einfaches Mischen oder Einrühren der Prüfchemikalie in das Verdünnungswasser mit mechanischen Mitteln (z. B. Rührwerk und/oder Ultraschall) hergestellt werden. Zur Herstellung einer Stammlösung in geeigneter Konzentration können Sättigungssäulen/-systeme oder passive Dosierungsmethoden (14) verwendet werden. Vorzugsweise sollten weder Lösungsmittel noch Träger verwendet werden: (1) bestimmte Lösungsmittel selbst können zu einer Toxizität und/oder unerwünschten oder unerwarteten Reaktionen führen, (2) das Prüfen von Chemikalien über ihrer Wasserlöslichkeit (wie dies oft durch die Verwendung von Lösungsmitteln passieren kann) kann zu ungenauen Bestimmungen der effektiven Konzentrationen führen, (3) die Verwendung von Lösungsmitteln bei längerfristigen Tests kann zur starken Ausprägung eines Biofilms im Zusammenhang mit mikrobieller Aktivität führen, was die Umweltbedingungen sowie die Fähigkeit, Expositionskonzentrationen beizubehalten, beeinträchtigt und (4) in Abwesenheit historischer Daten zeigt, dass das Lösungsmittel das Ergebnis der Studie nicht beeinflusst, die Verwendung von Lösungsmitteln erfordert eine Lösungsmittelkontrollbehandlung, die mit Implikationen hinsichtlich des Wohlbefindens der Tiere einhergeht, da zusätzliche Tiere erforderlich sind, um den Test durchzuführen. Bei schwierig zu prüfenden Chemikalien kann ein Lösungsmittel als letztes Mittel eingesetzt werden und es sollte das OECD Guidance Document 23 on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (15) herangezogen werden, um die beste Methode zu bestimmen. Die Wahl des Lösungsmittels wird durch die chemischen Eigenschaften der Prüfchemikalien und die Verfügbarkeit der historischen Daten zur Verwendung des Lösungsmittels bestimmt. Wenn Lösungsmittel verwendet werden, sind zusätzlich zu den Kontrollen ohne Lösungsmittel (negativ) auch geeignete Lösungsmittelkontrollen zu untersuchen (nur Verdünnungswasser). Falls diese Verwendung eines Lösungsmittels unvermeidbar ist und eine mikrobielle Aktivität (Bildung eines Biofilms) auftritt, wird während des Tests (mindestens wöchentlich) eine Aufzeichnung/Berichterstattung der Biofilmbildung pro Becken empfohlen. Idealerweise sollte die Lösungsmittelkonzentration bei der Lösungsmittelkontrolle und allen Prüfbehandlungen konstant gehalten werden. Wenn die Konzentration des Lösungsmittels nicht konstant gehalten wird, sollte die höchste Konzentration des Lösungsmittels bei der Prüfbehandlung auch bei der Lösungsmittelkontrolle verwendet werden. In Fällen, bei denen ein Lösungsmittelträger verwendet wird, sollten die maximalen Lösungsmittelkonzentrationen 100 µl/l oder 100 mg/l (15) nicht überschreiten und es wird empfohlen, die Lösungsmittelkonzentration so niedrig wie möglich zu halten (z. *B.* < 20 µl/l), um eine potenzielle Auswirkung des Lösungsmittels auf die gemessenen Endpunkte zu vermeiden (16).

Versuchstiere

Auswahl und Halten der Fische

16. Die Prüfspezies ist der japanische Reiskärpfling *Oryzias latipes*, da er einen kurzen Lebenszyklus besitzt und sein genetisches Geschlecht bestimmt werden kann. Obwohl andere kleine Fischarten eventuell an ein ähnliches Prüfprotokoll angepasst werden können, gelten die spezifischen Methoden und Beobachtungsendpunkte in dieser Prüfmethode nur für den japanischen Reiskärpfling (siehe Abschnitt 1). Der Reiskärpfling ist bereits induziert, sich in Gefangenschaft fortzupflanzen; für seine Kultur existieren veröffentlichte Methoden (17) (18) (19) und es sind Daten von Tests zur kurzzeitigen Letalität, zu frühen Lebensstadien und zu kompletten Lebenszyklen verfügbar (5) (6) (8) (9) (20). Alle Fische werden in einer Photoperiode mit 16 Std. Licht, 8 Std. Dunkelheit gehalten. Die Fische werden mit lebenden Salinenkrebsen, *Artemia* spp., nauplii gefüttert, die wenn erforderlich durch im Handel erhältliches Flockenfutter ergänzt werden können. Im Handel erhältliches Flockenfutter sollte regelmäßig auf Verunreinigungen überprüft werden.

17. Solange die angemessenen Tierhaltungspraktiken befolgt werden ist kein spezifisches Kulturprotokoll erforderlich. Der Reiskärpfling kann beispielsweise bis 4 wpf in 2 l-Becken mit 240 Larven pro Becken und anschließend kann er bis 8 wpf in 2 l-Becken mit 10 Fischen pro Becken aufgezogen werden; zu diesem Zeitpunkt gehen sie in den 2 l-Becken zu Brutpaaren über.

Akklimatisierung und Auswahl der Fische

18. Die zu prüfenden Fische sollten aus einem einzigen Laborbestand stammen, der mindestens zwei Wochen vor dem Test bei ähnlicher Wasserqualität und ähnlichen Lichtverhältnissen wie im Test akklimatisiert wurde (Hinweis: Dieser Akklimatisierungszeitraum ist kein in situ-Präexpositionszeitraum). Es wird empfohlen, dass die Prüffische aus einer Kultur im eigenen Labor entnommen werden, da der Versand von adulten Fischen stressig ist und das zuverlässige Laichen beeinträchtigen kann. Die Fische sollten während des Haltezeitraums und der Expositionsphase zweimal täglich mit Salinenkrebsen nauplii gefüttert werden, die bei Bedarf mit im Handel erhältlichem Flockenfutter ergänzt werden können. Es werden mindestens 42 Brutpaare (54 Brutpaare, wenn teilweise aufgrund eines Mangels an historischen Daten zur Unterstützung der ausschließlichen Kontrolle ohne Lösungsmittel eine Lösungsmittelkontrolle erforderlich ist) als erforderlich erachtet, um diesen Test einzuleiten, um eine ausreichende Replikation zu gewährleisten. Zusätzlich dazu sollte jedes Brutpaar von F0 als XX-XY verifiziert werden (d. h. normale Ergänzung der Geschlechtschromosome in jedem Geschlecht), um den möglichen Einschluss von spontanen XX-Männchen zu vermeiden (siehe Abschnitt 39).

19. Während der Akklimatisierungsphase sollten die Mortalitäten der Kulturfische aufgezeichnet und die folgenden Kriterien während eines 48-stündigen Ansiedlungszeitraums angewandt werden:

— Mortalitäten von mehr als 10 % der Kulturpopulation innerhalb von sieben Tagen vor der Übertragung zum Prüfsystem: Austausch des gesamten Besatzes;

— bei einer Mortalität zwischen 5 % und 10 % der Population innerhalb von sieben Tagen vor der Übertragung zum Prüfsystem: weitere sieben Tage Akklimatisation zusätzlich zum 2-wöchigen Akklimatisierungszeitraum; bei einer Mortalität innerhalb der folgenden sieben Tage von über 5 %: Austausch des gesamten Besatzes;

— Mortalitäten von weniger als 5 % der Population innerhalb von sieben Tagen vor der Übertragung zum Prüfsystem: Annahme des Besatzes.

20. Die Fische sollten im zweiwöchigen Akklimatisierungszeitraum vor dem Test und während des Expositionszeitraums keine Behandlung für Krankheiten erhalten und eine Behandlung von Krankheiten sollte wenn möglich komplett vermieden werden. Fische mit klinischen Anzeichen einer Erkrankung sollten nicht in die Studie aufgenommen werden. Es sollte während des Kulturzeitraums vor dem Test eine Aufzeichnung der Beobachtungen sowie der prophylaktischen und therapeutischen Krankheitsbehandlungen gepflegt werden.

21. Die Expositionsphase sollte mit sexuell dimorphen, genetisch stimulierten adulten Fischen aus einem Laborbestand geschlechtsreifer Tiere, die bei 25 ± 2 °C gezüchtet wurden, begonnen werden. Die Fische sollten in der Woche vor der Exposition als bewährte Brüter (d. h. sie haben lebensfähige Nachkommen gezeugt) identifiziert werden. Bei der gesamten Gruppe der in diesem Test verwendeten Fische sollte das individuelle Gewicht nach Geschlecht im Bereich von ± 20 % des arithmetischen Mittelgewichts der Fische gleichen Geschlechts liegen. Vor dem Test sollte eine Teilprobe gewogen werden, um das mittlere Gewicht einzuschätzen. Die ausgewählten Fische sollten mindestens 12 wpf sein und ≥ 300 mg (Weibchen) und ≥ 250 mg (Männchen) wiegen.

VERSUCHSPLAN

Prüfkonzentrationen

22. Es wird empfohlen, fünf Chemikalienkonzentrationen plus Kontrolle(n) zu verwenden. Alle Informationsquellen sollten bei der Auswahl des Bereichs der Prüfkonzentrationen berücksichtigt werden, einschließlich quantitativer Strukturaktivitätsbeziehungen (QSARs), Analogien aus Analogen, Ergebnissen von Fischtests wie Prüfungen auf akute Toxizität (Kapitel C.1 dieses Anhangs), kurzzeitiger Reproduktionstests für Fische (Kapitel C.48 dieses Anhangs) und anderer Prüfmethoden, z. B. Kapitel C.15, C.37, C.41, C.47 oder C.49 dieses Anhangs (21) (22) (23) (24) (25) (26) falls verfügbar oder falls erforderlich auf einer Bereichsfindungsprüfung, die möglicherweise eine Reproduktionsphase mit einschließt. Bei Bedarf kann die Bereichsfindungsprüfung unter ähnlichen Bedingungen (Wasserqualität, Prüfsystem, Tierbesatz) wie denen für den definitiven Test durchgeführt werden. Wenn die Verwendung eines Lösungsmittels erforderlich ist und keine historischen Daten verfügbar sind, kann die Bereichsfindungsprüfung dazu verwendet werden, die Eignung des Lösungsmittels zu identifizieren. Die höchste Prüfkonzentration sollte die Wasserlöslichkeit, 10 mg/l oder 1/10. von 96h-LC50 nicht überschreiten (27). Die niedrigste Konzentration sollte um einen Faktor von 10 bis 100 niedriger sein als die höchste Konzentration. Die Verwendung von fünf Konzentrationen in diesem Test ermöglicht nicht nur die Messung der Dosis-Reaktion-Beziehungen, sondern bietet auch die niedrigste Konzentration mit beobachteter Wirkung (LOEC) und NOEC, die zur Risikobeurteilung in regulatorischen Programmen oder Gerichtsbarkeiten erforderlich sind. Allgemein beträgt der Abstandsfaktor zwischen den Nennkonzentrationen der Prüfchemikalie zwischen nebeneinander liegenden Konzentrationsniveaus ≤ 3,2.

Replikate innerhalb der Behandlungsgruppen und Kontrollen

23. Es sollten mindestens sechs Replikate der Prüfkammern pro Prüfkonzentration verwendet werden (siehe Anlage 7). Während der reproduktiven Phase (F0-Generation ausgenommen) wird die Replikationsstruktur für die Fruchtbarkeitsbewertung verdoppelt und jedes Replikat verfügt nur über ein Brutpaar (siehe Abschnitt 42).

24. Zusätzlich zu den Prüfkonzentrationen werden eine Kontrolle mit Wasser und falls erforderlich eine Lösungsmittelkontrolle notwendig. Es sollte eine doppelte Anzahl der Replikatkammern für die Kontrollen verwendet werden, um eine angemessene statistische Aussagekraft zu gewährleisten (d. h. es sollten mindestens zwölf Replikate für die Kontrollen verwendet werden). Während der reproduktiven Phase wird die Anzahl der Replikate in den Kontrollen verdoppelt (d. h. mindestens 24 Replikate und jedes Replikat besitzt nur ein Brutpaar). Nach der Reproduktion sollten die Kontrollreplikate nicht mehr als 20 Embryos (Fische) enthalten.

VERFAHREN

Einleitung des Tests

25. Die geschlechtsreifen adulten Fische, die zum Start der F0-Generation des Tests verwendet werden, werden basierend auf zwei Kriterien ausgewählt: Alter (normalerweise älter als 12, aber es wird nicht empfohlen, 16 wpf zu überschreiten) und Gewicht (sollte für Weibchen ≥ 300 mg und für Männchen ≥ 250 mg betragen).

26. Paare aus Weibchen und Männchen, die die obigen Spezifikationen erfüllen, werden als individuelle Paare in jedes Beckenreplikat übersiedelt, d. h. zwölf Replikate bei den Kontrollen und sechs Replikate bei chemischen Behandlungen zu Beginn des Tests. Diesen Becken wird nach dem Zufallsprinzip eine Behandlung (z. B. T1-T5 und Kontrolle) und ein Replikat zugewiesen (z. B., A-L bei den Kontrollen und A-F bei der Behandlung) und dann werden sie mit dem entsprechenden Durchfluss in jeden Tank im Expositionssystem platziert.

Expositionsbedingungen

27. Eine vollständige Zusammenfassung der Prüfparameter und Bedingungen findet sich in Anlage 3. Die Beachtung dieser Spezifikationen sollte zu Kontrollfischen mit Endpunktwerten führen, die denen in Anlage 4 ähnlich sind.

28. Während des Tests sollten der gelöste Sauerstoff, der pH-Wert und die Temperatur in mindestens einem Prüfgefäß jeder Behandlungsgruppe und der Kontrolle gemessen werden. Diese Messungen, mit Ausnahme der Temperaturmessung, sollten während der Expositionsdauer mindestens einmal pro Woche durchgeführt werden. Die mittlere Wassertemperatur über die gesamte Studiendauer hinweg sollte während des Tests zwischen 24 und 26 °C liegen. Die Temperatur sollte während der Expositionsdauer jeden Tag gemessen werden. Der pH-Wert des Wassers sollte im Bereich 6,5 bis 8,5 liegen und während des Tests nicht um mehr als ± 0,5 pH-Einheiten schwanken. Replikate sollten sich in einer Behandlung statistisch nicht voneinander unterscheiden und Behandlungsgruppen innerhalb des Tests sollten sich auch statistisch nicht voneinander unterscheiden (basierend auf täglichen Temperaturmessungen und kurze Abweichungen ausgenommen).

Expositionsdauer

29. Beim Test werden geschlechtsreife Fische aus F0 drei Wochen lang exponiert. In Woche 4 um den Prüftag 24 herum wird F1 etabliert und die F0-Brutpaare werden schmerzfrei getötet und ihr Gewicht und ihre Länge aufgezeichnet (siehe Abschnitt 34). Darauf folgt eine Exposition der F1-Generation für 14 weitere Wochen (insgesamt 15 Wochen für F1) und der F2-Generation für zwei Wochen bis zum Schlüpfen. Die Gesamtdauer des Tests beträgt primär 19 Wochen (d. h. bis zum Schlüpfen von F2). Die Fristen für den Test werden in Tabelle 2 dargestellt und in Anlage 9 genauer erläutert.

Fütterungsregime

30. Die Fische können mit lebenden Salinenkrebsen, *Artemia* spp. (24 Stunden alte nauplii) ad libitum gefüttert werden, die wenn erforderlich durch im Handel erhältliches Flockenfutter ergänzt werden können. Im Handel erhältliches Flockenfutter sollte regelmäßig auf Verunreinigungen wie chlororganische Pestizide, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) und polychlorierte Biphenyle (PCB) untersucht werden. Futter mit einem hohen Gehalt an Stoffen mit endokriner Wirkung (d. h. Phytoöstrogene), die die Testwirkung beeinträchtigen könnten, sollte vermieden werden. Nicht aufgenommenes Futter und Fäkalien sind bei Bedarf aus den Prüfgefäßen zu entfernen (etwa durch vorsichtiges Absaugen vom Beckenboden). Die Seiten und der Boden jedes Beckens sollte auch mindestens ein- oder zweimal pro Woche gereinigt werden (z. B. durch Abkratzen mit einem Spachtel). Ein Beispiel für einen Fütterungsplans findet sich in Anlage 5. Die Fütterungsrate basiert auf der Anzahl der Fische pro Replikat. Deshalb wird die Fütterungsrate reduziert, wenn Mortalitäten in einem Replikat auftreten.

Analytische Bestimmungen und Messungen

31. Vor Beginn der Exposition ist zu überprüfen, ob die Chemikalienbeschickung einwandfrei funktioniert. Es dürfen ausschließlich anerkannte Analysemethoden angewandt werden, und die Stabilität der Chemikalie im Prüfsystem muss hinreichend bekannt sein. Während des Tests werden die Konzentrationen der Prüfchemikalie in angemessenen Intervallen bestimmt, vorzugsweise mindestens einmal pro Woche in einem Replikat für jede Behandlungsgruppe, wobei jede Woche zwischen Replikaten derselben Behandlungsgruppe abgewechselt wird.

32. Während des Tests sollten die Durchflussraten von Verdünnungsmittel und Stammlösung in entsprechenden Intervallen überprüft werden (z. B. mindestens dreimal pro Woche). Die Ergebnisse sollten auf gemessenen Konzentrationen basieren. Wurde die Konzentration der Chemikalienlösung während des gesamten Tests jedoch zufriedenstellend innerhalb der gemessenen Mittelwerte (± 20 %) gehalten, so können sich die Ergebnisse auf die nominalen oder die gemessenen Werte beziehen. Im Falle von Chemikalien, die sich deutlich in Fischen anhäufen, können sich die Prüfkonzentrationen verringern, während die Fische wachsen. In solchen Fällen wird empfohlen, dass die Erneuerungsrate der Prüflösung in jeder Kammer angepasst wird, um die Prüfkonzentrationen so konstant wie möglich zu halten.

Beobachtungen und gemessene Endpunkte

33. Die gemessenen Endpunkte umfassen Fruchtbarkeit, Fertilität, Schlüpfen, Wachstum und Überleben für die Bewertung der möglichen Auswirkungen auf Ebene der Population. Das Verhalten sollten ebenfalls täglich beobachtet und ungewöhnliches Verhalten notiert werden. Andere mechanistische Endpunkte umfassen hepatische *vtg* mRNA oder VTG Proteingehalte durch ein Immunoassay (28), sexuelle phänotypische Marker wie die charakteristische männliche Afterflossen-Papille, die histologische Bewertung des gonadalen Geschlechts und die histopathologische Bewertung von Niere, Leber und Gonaden (siehe Liste mit Endpunkten in Tabelle 1). All diese spezifischen Endpunkte werden im Kontext einer Bestimmung des genetischen Geschlechts der einzelnen Fische bewertet, basierend auf dem Vorhandensein oder dem Fehlen des Gens *dmy*, das das männliche Geschlecht des Reiskärpflings bestimmt (siehe Abschnitt 41). Zusätzlich dazu wird die Zeit bis zum Laichen ebenfalls bewertet. Außerdem können mithilfe der Informationen aus der Anzahl der Afterflossen-Papillen einfache phänotypische Geschlechtsverhältnisse abgeleitet werden, um die einzelnen Reiskärpflinge entweder als phänotypisch männlich oder weiblich zu definieren. Von dieser Prüfmethode wird nicht erwartet, dass sie mäßige Abweichungen vom erwarteten Geschlechtsverhältnis erkennt, da die relativ kleine Anzahl der Fische pro Replikat keine ausreichende statistische Aussagekraft bietet. Während der histopathologischen Bewertung wird auch die Gonade bewertet und es werden viel leistungsstärkere Analysen zur Beurteilung des Gonadenphänotyps im Kontext des genetischen Geschlechts durchgeführt.

34. Der Hauptzweck dieser Prüfmethode ist die Bewertung der potenziellen populationsrelevanten Effekte einer Prüfchemikalie. Mechanistische Endpunkte (VTG, SSCs und bestimmte gonadale Histopathologie-Effekte) können ebenfalls dabei helfen, zu bestimmen, ob ein Effekt über eine endokrine Aktivität vermittelt wird. Diese mechanistischen Endpunkte können auch von systemischen und anderen Toxizitäten beeinflusst werden. Folglich können auch die Histopathologien von Leber und Niere gründlich bewertet werden, um dabei zu helfen, Reaktionen in mechanistischen Endpunkten besser zu verstehen. Wenn diese detaillierten Bewertungen jedoch nicht vorgenommen werden, sollten deutliche Abnormalitäten, die beiläufig bei der histopathologischen Bewertung beobachtet werden, trotzdem notiert und gemeldet werden.

Schmerzfreies Töten

35. Bei Beendigung der Exposition von Generation F0 und F1 und wenn eine Teilstichprobe von subadulten Fische genommen wird, sollte der Fisch mit den erforderlichen Mengen an anästhetischer Lösung (z. B. Tricainmethansulfonat, MS-222 (CAS.886-86-2), 100-500 mg/l) gepuffert mit 300 mg/l $NaHCO_3$ (Natriumbicarbonat, CAS.144-55-8) getötet werden, um die Reizung der Schleimhäute zu verringern. Wenn die Fische Anzeichen dafür zeigen, dass sie ziemlich leiden (sehr schwer und der Tod kann zuverlässig vorausgesagt werden) und sie als sterbend angesehen werden, dann sollten die Tiere betäubt und getötet und für die Datenanalyse als Mortalität behandelt werden. Wenn ein Fisch aufgrund von Morbidität getötet wird, sollte dies notiert und gemeldet werden. Je nachdem, wann der Fisch während der Studie getötet wurde, kann er für eine histopathologische Analyse behalten werden (Fixierung des Fisches für mögliche Histopathologie).

Umgang mit Eiern und larvalen Fischen

Sammeln von Eiern von Brutpaaren, um die nächste Generation zu propagieren

36. Das Sammeln der Eier erfolgt am ersten Tag (oder den ersten zwei Tagen, wenn erforderlich) der Prüfwoche 4, um von F0 zu F1 und Prüfwoche 18, um von F1 zu F2 überzugehen. Prüfwoche 18 entspricht F1, 15 wpf (Wochen nach der Befruchtung) adulte Fische. Es ist wichtig, dass alle Eier am Tag vor Beginn des Eiersammelns aus jedem Becken entfernt werden, um sicherzustellen, dass alle Eier, die von einem Brutpaar gesammelt wurden, aus einem einzigen Laich stammen. Nach dem Ablaichen tragen weibliche Reiskärpflinge ihre Eier nahe ihres Rumpfes, bis die Eier auf ein Substrat abgegeben werden können. Ohne Substrat im Becken können die Eier entweder am Weibchen oder am Beckenboden gefunden werden. Je nach ihrer Position werden die Eier in Prüfwoche 4 von F0 und Prüfwoche 18 von F1 entweder vorsichtig vom Weibchen entfernt oder vom Boden gefiltert. Alle in einer Behandlung gesammelten Eier werden vor der Verteilung auf Inkubationskammern gepoolt.

37. Eierfasern, die die abgelaichten Eier zusammenhalten, sollten entfernt werden. Befruchtete Eier (bis zu 20) werden von jedem Brutpaar gesammelt (1 Paar pro Replikat), nach Behandlung gepoolt und systematisch auf geeignete Inkubationskammern verteilt (Anlage 6, 7). Mithilfe eines qualitativ hochwertigen Stereomikroskops kann man Kennzeichen für die frühe Befruchtung/Entwicklung sehen, wie beispielsweise das Anheben der Befruchtungsmembran (Chorion), laufende Zellteilungen oder die Bildung der Blastula. Die Inkubatorkammern können in unterschiedliche „Inkubatoraquarien" gelegt werden, die für jede Behandlung aufgestellt wurden (in welchem Fall die Wasserqualitätsparameter und die Prüfchemikalienkonzentrationen in ihnen gemessen werden müssen), oder im Replikataquarium, in dem sich die geschlüpften Larven (*z. B.* Eleutheroembryo) befinden werden. Wenn ein zweiter Sammlungstag (Prüftag 23) erforderlich ist, sollten alle Eier von beiden Tagen gepoolt und dann systematisch erneut auf die behandelten Replikate verteilt werden.

Aufzucht der Eier bis zum Schlüpfen

38. Die befruchteten Eier werden stets angeregt, z. B. im Eierinkubator durch Luftblasen oder durch vertikales Schwingen des Eierinkubators. Die Mortalitäten der befruchteten Eier (Embryos) werden täglich kontrolliert und aufgezeichnet. Tote Eier werden aus den Inkubatoren entfernt (Anlage 9). Am 7. Tag nach der Befruchtung (dpf) wird die Anregung gestoppt oder reduziert, sodass sich die befruchteten Eier auf den Boden des Inkubators absetzen können. Dies fördert das Schlüpfen, das dann normalerweise am nächsten oder übernächsten Tag erfolgt. Bei jeder Behandlung und Kontrolle werden die Jungtiere (junge Larven; Eleutheroembryo) gezählt (gepoolte Replikatbasis). Befruchtete Eier, die bis zum Doppelten des medianen Schlüpftags bei der Kontrolle (normalerweise 16 oder 18 dpf) noch nicht geschlüpft sind, werden als nicht lebensfähig angesehen und entsorgt.

39. Zwölf Jungtiere werden in jedes Replikatbecken gegeben. Die Jungtiere aus den Inkubationskammern werden gepoolt und systematisch auf die Replikatbecken verteilt (Anlage 7). Dies kann über die zufällige Auswahl eines Jungtiers aus dem Behandlungspool und dem nachfolgenden Hinzufügen eines Jungtiers zu einem Replikataquarium in einer nicht diskriminierenden Ziehung erfolgen. Jedes der Becken sollte eine gleiche Anzahl (n = 12) an geschlüpften Larven enthalten (maximal jeweils 20 Larven). Wenn es nicht genug Jungtiere gibt, um alle behandelten Replikate zu füllen, dann wird empfohlen, sicherzustellen, dass so viele Replikate wie möglich über 12 Jungtiere verfügen. Jungtiere können sicher mit Glaspipetten mit großer Öffnung gehandhabt werden. Zusätzliche Jungtiere werden mit Anästhetikum schmerzfrei getötet. Während der paar Wochen vor der Bildung der Brutpaare sollte der Tag, an dem das erste Laichereignis in jedem Replikat beobachtet wurde, aufgezeichnet werden.

Bildung der Brutpaare

Flossenabtrennung und Bestimmung des genotypischen Geschlechts

40. Die Bestimmung des genotypischen Geschlechts über die Abtrennung der Flosse erfolgt bei 9–10 wpf (d. h. Prüfwoche 12–13 für die F1-Generation). Alle Fische in einem Becken werden betäubt (mithilfe zulässiger Methoden, z. B. IACUC) und eine kleine Gewebeprobe wird entweder von der dorsalen oder ventralen Spitze der Schwanzflosse jedes Fischs entnommen, um das genotypische Geschlecht des Tiers zu bestimmen (29). Die Fische aus einem Replikat können in kleinen Käfigen – wenn möglich ein Fisch pro Käfig – im Replikatbecken gehalten werden. Alternativ können zwei Fische in einem Käfig gehalten werden, wenn sie voneinander unterscheidbar sind. Eine Methode, um sie zu unterscheiden, ist das Abtrennen der Schwanzflosse (z. B. dorsale im Vergleich zur ventralen Spitze) bei der Entnahme der Gewebeprobe.

41. Das genotypische Geschlecht des Reiskärpflings kann über ein identifiziertes und sequenziertes Gen (*dmy*) bestimmt werden, das sich auf dem Y-Chromosom befindet. Das Vorhandensein eines *dmy*-Gens ist unabhängig vom Phänotyp als Beleg für das Vorliegen eines XY-Tieres anzunehmen; entsprechend ist das Fehlen des *dmy*-Gens unabhängig vom Phänotyp als Beleg für das Vorliegen eines XX-Tieres anzunehmen (30); (31). Desoxyribonukleinsäure (DNA) wird bei jeder Flossenabtrennung extrahiert und das Vorhandensein oder Fehlen von *dmy* kann anhand einer Polymerasekettenreaktion (PCR) bestimmt werden (siehe Anlage 9 in Kapitel C.41 dieses Anhangs oder Anlage 3 und 4 in (29).

Bildung der Brutpaare

42. Die Informationen zum genotypischen Geschlecht werden verwendet, um XX-XY-Brutpaare zu bilden; unabhängig von den äußeren Phänotypen, die durch eine Exposition gegenüber einer Prüfchemikalie verändert werden könnten. Am Tag, nachdem das genotypische Geschlecht jedes Fischs bestimmt wurde, werden zwei XX-Fische und zwei XY-Fische aus jedem Replikat nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und zwei XX-XY-Brutpaare gebildet. Wenn ein Replikat nicht entweder zwei XX- oder zwei XY-Fische hat, dann sollten angemessene Fische aus anderen behandelten Replikaten genommen werden. Die Priorität liegt darin, die empfohlene Anzahl an Replikatbrutpaaren (12) in jeder Behandlung und in den Kontrollen (24) zu haben. Fische mit offensichtlichen Abnormalitäten (Schwimmblasenprobleme, Missbildungen der Wirbelsäule, extreme Größenvariationen, usw.) würden bei der Bildung der Brutpaare ausgeschlossen werden. Während der Fortpflanzungsphase für F1 sollte jedes Replikatbecken nur ein Brutpaar enthalten.

Probenahme von subadulten Fischen und Endpunktbewertung

Probenahme von nicht brütenden Fischen

43. Nach der Bildung der Brutpaare werden die Fische, die nicht für eine weitere Züchtung ausgewählt wurden, zur Messung der subadulten Endpunkte in Prüfwoche 12–13 schmerzfrei getötet (F1). Es ist extrem wichtig, dass die Fische so gehandhabt werden, dass das genotypische Geschlecht für die Brutpaarauswahl noch immer auf einen individuellen Fisch nachverfolgt werden kann. Alle gesammelten Daten werden im Kontext des genotypischen Geschlechts der spezifischen Fische untersucht. Jeder Fisch wird für eine Vielzahl von Endpunktmessungen verwendet,

einschließlich: Bestimmung der Überlebensraten von Jungtieren/subadulten Fischen (Prüfwochen 7–12/13 (F1), Wachstum in Länge (die Standardlänge könnte gemessen werden, wenn die Schwanzflosse aufgrund der Probenahme für die genetische Geschlechtsanalyse gekürzt wurde. Die Gesamtlänge kann gemessen werden, wenn nur von einem Teil der Schwanzflosse, dorsal oder ventral, eine Probe für *dmy* genommen wird) und Körpermasse (d. h. Nassgewicht, trocken getupft), Leber *vtg* mRNA (oder VTG) und Afterflossen-Papille (siehe Tabellen 1 und 2). Bitte beachten, dass Gewichte und Längen der Brutpaare ebenfalls zur Berechnung des mittleren Wachstums in einer Behandlungsgruppe erforderlich sind.

Gewebeprobenahme und Vitellogenin-Messung

44. Die Leber wird seziert und sollte bei ≤ −70 °C gelagert werden, bis die *vtg* mRNA (oder VTG) gemessen wird. Der Schwanz des Fischs, einschließlich der Schwanzflosse, wird in einer angemessenen Fixierlösung aufbewahrt (z. B. Davidson) oder fotografiert, damit die Afterflossen-Papillen später gezählt werden können. Falls gewünscht, könnte zu diesem Zeitpunkt von anderen Gewebearten (d. h. Gonaden) eine Probe genommen und diese aufbewahrt werden). Die Konzentration des Leber-VTG sollte mit einer homologen ELISA-Technik quantifiziert werden (siehe die empfohlenen Verfahren für Reiskärpflinge in Anlage 6 in Kapitel C.48 dieses Anhangs). Alternativ wurden die Methoden für die vtg-mRNA-Quantifizierung, d. h. *vtg I*−Gen mRNA-Extrahierung aus einer Leberprobe und Quantifizierung der Anzahl an Kopien des *vtg I*−Gene (pro ng der gesamten mRNA) durch quantitative PCR, von der U.S EPA (29) etabliert. Anstatt die Anzahl der Kopien des *vtg*-Gens in den Kontroll- und Behandlungsgruppen zu bestimmen, besteht eine ressourcenschonendere und technisch weniger schwierige Methode darin, die relative (vielfache) Änderung der *vtg I*-Expression aus Kontroll- und Behandlungsgruppen zu bestimmen.

Sekundäre Geschlechtsmerkmale

45. Unter normalen Bedingungen besitzen nur geschlechtsreife männliche Reiskärpflinge Papillen, die sich auf den verbundenen Platten bestimmter Afterflossenstacheln als sexuelle Geschlechtsmerkmale entwickeln und einen potenziellen Biomarker für endokrinwirksame Effekte bieten. Die Methode des Zählens von Afterflossen-Papillen (die Anzahl der verbundenen Platten mit Papillen) wird in Anlage 8 beschrieben. Es wird auch die Anzahl der Afterflossen-Papillen pro Tier verwendet, um dieses Tier als äußerlich phänotypisches Männchen oder Weibchen zu kategorisieren, um ein einfaches Geschlechtsverhältnis pro Replikat zu berechnen. Ein Reiskärpfling mit einer Anzahl von mehr als 0 wird als Männchen definiert; ein Reiskärpfling mit 0 Afterflossen-Papillen wird als Weibchen definiert.

Beurteilung der Fruchtbarkeit und Fertilität

46. Fruchtbarkeit und Fertilität werden in den Prüfwochen 1 bis 3 in der F0-Generation und in den Prüfwochen 15 bis 17 in der F1-Generation bewertet. Die Eier werden 21 aufeinanderfolgende Tage lang täglich von jedem Brutpaar gesammelt. Die Eier werden jeden Morgen sanft von den mit dem Netz gefangenen Weibchen entfernt und/oder vom Boden des Aquariums genommen. Sowohl Fruchtbarkeit als auch Fertilität werden jeden Tag für jedes Replikatbrutpaar aufgezeichnet. Die Fruchtbarkeit wird als die Anzahl der abgelaichten Eier definiert und die Fertilität wird funktionell als die Anzahl an befruchteten und lebensfähigen Eiern zum Zeitpunkt des Zählens definiert. Das Zählen sollte so bald wie möglich nach dem Sammeln der Eier erfolgen.

47. Die Fruchtbarkeit der Replikate wird jeden Tag als die Anzahl der Eier pro Brutpaar aufgezeichnet, das durch die empfohlenen statistischen Verfahren mithilfe der Replikatmittelwerte analysiert wird. Die Fertilität der Replikate ist die Summe der Anzahl der lebensfähigen Eier, die von einem Brutpaar produziert werden, geteilt durch die Summe der Anzahl der Eier, die durch dieses Paar produziert wurden. Statistisch gesehen wird die Fertilität als Verhältnis pro Replikat analysiert. Die Schlupffähigkeit der Replikate ist die Anzahl an Embryos geteilt durch die Anzahl an Embryos im Inkubator (normalerweise 20). Statistisch gesehen wird die Schlupffähigkeit als Verhältnis pro Replikat analysiert.

Probenahme von adulten Fischen und Endpunktbewertung

Probenahme von Brutpaaren

48. Nach Prüfwoche 17 (d. h. nachdem die F2-Generation erfolgreich begonnen hat) werden die adulten F1-Fische schmerzfrei getötet und verschiedene Endpunkte bewertet (siehe Tabellen 1 und 2). Von der Schwanzflosse und/oder dem Schwanz wird zur Bewertung der Afterflossen-Papille kurz nach dem Rumpf ein Bild angefertigt (siehe Anlage 8); sie wird entfernt und zum späteren Zählen der Papillen fixiert. Es kann eine Probe von einem Teil der Schwanzflosse genommen und diese falls gewünscht zur Verifizierung des genetischen Geschlechts (*dmy)* archiviert werden. Wenn erforderlich kann eine Gewebeprobe genommen werden, um die *dmy*-Analyse zur Verifizierung des genetischen Geschlechts des spezifischen Fischs zu wiederholen. Die Körperhöhle wird geöffnet, um eine Perfusion mit den angemessenen Fixierlösungen (z. B. Davidson) zu ermöglichen, bevor der gesamte Körper in die Fixierlösung getaucht wird. Wenn jedoch vor der Fixierung ein angemessener Permeabilisierungsschritt durchgeführt wird, muss die Körperhöhle nicht geöffnet werden.

Histopathologie

49. Jeder Fisch wird histologisch auf die Pathologie im Gonadengewebe bewertet (30); (29). Wie in Abschnitt 33 angeführt, könnten andere in diesem Test bewertete mechanistische Endpunkte (d. h. VTG, SSCs und bestimmte gonadale Histopathologieeffekte) von systemischen oder anderen Toxizitäten beeinflusst werden. Folglich können auch die Histopathologien von Leber und Niere gründlich bewertet werden, um dabei zu helfen, Reaktionen in mechanistischen Endpunkten besser zu verstehen. Wenn diese detaillierten Bewertungen jedoch nicht vorgenommen werden, sollten deutliche Abnormalitäten, die beiläufig bei der histopathologischen Bewertung beobachtet werden, trotzdem notiert und gemeldet werden. Das Lesen nach unten von der höchsten Behandlungsgruppe (im Vergleich zur Kontrolle) bis zu einer Behandlung ohne Effekt könnte berücksichtig werden, allerdings wird empfohlen, die Histopathologieleitlinien zu lesen (29). Normalerweise werden alle Proben verarbeitet/unterteilt, nachdem sie vom Pathologen gelesen wurden. Wenn ein Ansatz des Lesens nach unten angewandt wird, muss beachtet werden, dass das Verfahren Rao-Scott Cochrane-Armitage nach Scheiben (RSCABS) die Erwartung nutzt, dass sich die biologische Auswirkung (die Pathologie) mit steigender Dosis ebenfalls erhöht. Deshalb wird die Aussagekraft verloren, wenn nur eine einzige hohe Dosis ohne Zwischendosen berücksichtigt wird. Wenn keine statistische Analyse erforderlich ist, um zu bestimmen, dass die hohe Dosis keinen Effekt hat, kann dieser Ansatz eventuell annehmbar sein. Der Gonadenphototyp wird ebenfalls von dieser Bewertung abgeleitet

Sonstige Beobachtungen

50. Der MEOGRT bietet Daten, die benutzt werden können (z. B. in einem Ansatz der Beweiskraft der Daten), um gleichzeitig mindestens zwei allgemeine Arten an AOPs zu bewerten, die in einer reproduktiven Einschränkung enden: (a) endokrin-vermittelte Wege, die eine Störung der endokrinen Hypothalamus/Hypophyse/Gonaden-Achse umfassen; und (b) Wege, die eine Reduzierungen des Überlebens, des Wachstums (Länge und Gewicht) und der Fortpflanzung durch eine nicht-endokrin vermittelte Toxizität verursachen. Normalerweise sind in chronischen Toxizitätstests gemessene Endpunkte wie der Test des vollständigen Lebenszyklus und der Test im frühen Lebensstadium auch in diesem Test enthalten und können verwendet werden, um die Gefahren aufgrund nicht-endokrin vermittelter toxischer Wirkweisen und endokrin vermittelter Toxizitätswege zu bewerten. Während des Tests sollte das Verhalten täglich beobachtet und ungewöhnliches Verhalten notiert werden. Zusätzlich sollten Mortalitäten aufgezeichnet und das Überleben bis zum Töten des Fischs (Prüfwoche 6/7), das Überleben, nachdem die subadulte Stichprobe getötet wurde, bis zur subadulten Probenahme (9-10 wpf) und das Überleben von Paaren bis zur Probenahme der adulten Fische berechnet werden.

Tabelle 1

Endpunktüberblick zum MEOGRT (*)

Lebensstadium	Endpunkt	Generation
Embryo (2 wpf)	Schlüpfen (% und Zeit bis zum Schlüpfen)	F1, F2
Jungfisch (4 wpf)	Überleben	F1
Subadulter Fisch (9 oder10 wpf)	Überleben	F1
	Wachstum (Länge und Gewicht)	
	Vitellogenin (mRNA oder Protein)	
	Sekundäre Geschlechtsmerkmale (Afterflossen-Papille)	
	Externes Geschlechterverhältnis	
	Zeit bis 1. Laichen	
Adulter Fisch (12–14 wpf)	Reproduktion (Fruchtbarkeit und Fertilität)	F0, F1
Adulter Fisch (15 wpf)	Überleben	F1
	Wachstum (Länge und Gewicht)	
	Sekundäre Geschlechtsmerkmale (Afterflossen-Papille)	
	Histopathologie (Gonaden, Leber, Niere)	

(*) Diese Endpunkte müssen statistisch analysiert werden

ZEITLEISTE

51. Eine in Tabelle 2 dargestellte Zeitleiste für den MEOGRT zeigt der Test. Der MEOGRT umfasst 4 Wochen Exposition gegenüber adulten F0-Tieren und 15 Wochen Exposition gegenüber der F1-Generation sowie die Expositionsdauer für die zweite Generation (F2) bis zum Schlüpfen (2 wpf). Aktivitäten im Verlauf des MEOGRT werden in Anlage 9 zusammengefasst.

Tabelle 2

Expositions- und Messendpunktfristen für MEOGRT

MEOGRT Expositions- und Endpunktfrist

F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																		1	2
Prüfwoche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Schlüssel zum Lebensstadium					**Embryo**					**Larve**					**Jungfisch**			**Subadulter Fisch**	**Adulter Fisch**
Endpunkte																			
Fruchtbarkeit	F_0														F_1				
Fertilität	F_0														F_1				
Schlüpfen					F_1														F_2
Überleben						F_1						F_1						F_1	
Wachstum				F_0								F_1						F_1	
Vitellogenin												F_1							
Sekundäres Geschlecht												F_1						F_1	
Histopathologie																		F_1	
Prüfwoche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- Der Versuchsplan hat 7 Replikatgruppen
  - 5 für Behandlungen mit Prüfchemikalien
  - 2 für Kontrollbehandlungen (4, wenn Lösungsmittel verwendet werden)
- Innerhalb des Gruppenplans
  - 12 Replikate für die Reproduktion, Pathologie und SSC bei adulten Fischen (Wochen 10 bis 18)
  - 6 Replikate zum Schlüpfen, Überleben, Vtg; und - SSC und Wachstum subadulter Fische (Wochen 1 bis 9)

SSC: sekundäre Geschlechtsmerkmale;
Vtg: Vitellogenin

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Statistische Analyse

52. Da das genotypische Geschlecht für alle Prüffische bestimmt wird, sollten die Daten für jedes genotypische Geschlecht separat analysiert werden (d. h. XY-Männchen und XX-Weibchen). Das Nichtbeachten dieser Regel reduziert die statistische Aussagekraft der Analysen erheblich. Statistische Datenanalysen sollten nach den Verfahren im OECD-Dokument „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“ (32) durchgeführt werden. Anlage 10 bietet weitere Hilfestellungen zur statistischen Analyse.

53. Der Versuchsplan und die gewählte Statistikmethode sollten eine ausreichende statistische Aussagekraft besitzen, damit Änderungen von biologischer Bedeutung bei den Endpunkten erkannt werden können, für die eine NOEC anzugeben ist (32). Die Angabe der Konzentrationen und Parameter, bei denen relevante Wirkungen auftreten, kann vom jeweiligen Rechtsrahmen abhängen. Die prozentuale Änderung sollte bei jedem Endpunkt festgestellt werden, der nachgewiesen oder geschätzt werden muss. Der Versuchsaufbau sollte entsprechend angepasst werden. Da es unwahrscheinlich ist, dass derselbe Prozentsatz bei allen Endpunkten zutrifft oder dass ein durchführbarer Versuch geplant werden kann, der diese Kriterien bei allen Endpunkten erfüllt, sollte man sich bei der Versuchsplanung auf die Endpunkte konzentrieren, die für den jeweiligen Versuch von Bedeutung sind. Die Flussdiagramme und Leitlinien für die statistische Vorgehensweise sind der Anlage 10 zu entnehmen und können bei der Auswertung der Daten und bei der Wahl der am besten geeigneten statistischen Methode oder des zu verwendenden Modells als Leitlinie herangezogen werden. Es können andere statistische Ansätze angewandt werden, sofern sie wissenschaftlich begründet sind.

54. Streuungen innerhalb jeder Reihe von Replikaten müssen durch Varianzanalyse oder Kontingenztabellenverfahren analysiert werden, und es müssen ausreichend geeignete statistische Analysemethoden basierend auf dieser Analyse angewandt werden. Um einen mehrfachen Vergleich zwischen den Ergebnissen bei den individuellen Konzentrationen und denen für die Kontrollen zu ziehen, wird ein abstufendes Verfahren (z. B. Jonckheere-Terpstra-Test) für fortlaufende Reaktionen empfohlen. Wo die Daten nicht mit einer monotonen Konzentrationsreaktion konsistent sind, sollte ein Dunnett- oder Dunn-Test verwendet werden (ggf. nach einer angemessenen Datentransformation).

55. Für die Fruchtbarkeit werden die Eier täglich gezählt, können aber als Gesamteieranzahl oder als wiederholte Messung analysiert werden. Anlage 10 bietet die Angaben darüber, wie dieser Endpunkt analysiert wird. Für Histopathologiedaten in der Form von Schweregradeinstufungen wird ein neuer statistischer Test, Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS), entwickelt (33).

56. Endpunkte, die in chemischen Behandlungen beobachtet wurden, die sich signifikant von den angemessenen Kontrollen unterscheiden, sollten gemeldet werden.

Erwägungen zur Datenanalyse

Behandlung von Konzentrationen mit offensichtlich toxischer Wirkung

57. Um festzustellen, ob ein Replikat oder eine Prüfkonzentration insgesamt offensichtlich toxisch wirkt und von der Analyse ausgeschlossen werden muss, sind mehrere Faktoren zu berücksichtigen. Eine offensichtliche Toxizität ist bei einer Mortalität von > 4 in einem Replikat zwischen 3 wpf und 9 wpf gegeben, die nicht durch einen technischen Fehler zu erklären ist. Andere Anzeichen einer offensichtlichen Toxizität sind Hämorrhagie, Verhaltensauffälligkeiten, anomales Schwimmverhalten, Anorexie und sonstige klinische Anzeichen einer Erkrankung. Bei Anzeichen einer subletalen Toxizität können qualitative Untersuchungen erforderlich sein; in diesen Fällen ist grundsätzlich ein Vergleich mit der Kontrollgruppe mit Verdünnungswasser (nur sauberes Wasser) vorzunehmen. Wenn eine offensichtliche Toxizität in den höchsten Behandlungen nachweisbar ist, wird es empfohlen, dass diese Behandlungen nicht in die Analyse aufgenommen werden.

Lösungsmittelkontrollen

58. Die Verwendung eines Lösungsmittels ist nur als letzte Möglichkeit in Betracht zu ziehen, wenn alle sonstigen Verfahren zur Applikation der betreffenden Chemikalie geprüft wurden. Wenn ein Lösungsmittel verwendet wird, ist auch eine Kontrolle mit Verdünnungswasser zu prüfen. Bei Ende des Tests werden die potenziellen Wirkungen des Lösungsmittels bestimmt. Dazu wird ein statistischer Vergleich der Kontrollgruppe mit dem Lösungsmittel und der Kontrollgruppe mit dem Verdünnungswasser vorgenommen. Die wichtigsten Endpunkte für diese Analyse sind Wachstumsdeterminanten (Masse), da diese Parameter auch durch allgemein wirkende Toxizität beeinträchtigt werden können. Wenn statistisch signifikante Unterschiede in diesen Endpunkten zwischen der Verdünnungswasserkontrolle und den Lösungsmittelkontrollgruppen erkannt werden, sollte das beste fachliche Urteilsvermögen angewandt werden, um zu bestimmen, ob die Validität des Tests kompromittiert ist. Wenn die zwei Kontrollen sich unterscheiden, sollten die den Chemikalien ausgesetzten Behandlungen mit der Lösungsmittelkontrolle verglichen werden, außer es ist bekannt, dass der Vergleich mit der Verdünnungswasserkontrolle bevorzugt wird. Wenn es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den zwei Kontrollgruppen gibt, wird empfohlen, dass die den Prüfchemikalien ausgesetzten Behandlungen mit den gepoolten verglichen werden (Lösungsmittel- und Verdünnungswasserkontrollgruppen), außer es ist bekannt, dass der Vergleich mit der Verdünnungswasser- oder der Lösungsmittelkontrollgruppe bevorzugt wird.

Prüfbericht

59. Der Prüfbericht sollte Folgendes enthalten:

Prüfchemikalie: physikalischer Zustand und, soweit relevant, physikalisch-chemische Eigenschaften;

— chemische Kenndaten;

Einkomponentiger Stoff:

— physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;

— chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar usw. (einschließlich des Gehalts an organischem Kohlenstoff, falls zutreffend).

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:

— so weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

Geprüfte Fischart:

— wissenschaftliche Bezeichnung, ggf. Stamm, Herkunft und Art der Gewinnung der befruchteten Eier sowie anschließende Handhabung.

Prüfbedingungen:

— Fotoperiode(n);

— Testdesign (z. B. Kammerngröße, Material- und Wasservolumen, Anzahl an Prüfkammern und Replikaten, Anzahl an Jungtieren pro Replikaten);

— Methode zur Herstellung von Stammlösungen und Häufigkeit der Erneuerung (falls verwendet, sind der Lösungsvermittler und seine Konzentration anzugeben);

— Methode zur Dosierung der Prüfchemikalie (z. *B.* Pumpen, Verdünnungssysteme);

— Wiederfindungsrate der Methode und nominelle Prüfkonzentrationen, Bestimmungsgrenze, Mittel der gemessenen Werte mit ihren Standardabweichungen in den Prüfgefäßen sowie das Verfahren, durch das diese ermittelt wurden, sowie Nachweise dafür, dass sich die Messungen auf die Konzentrationen der Prüfchemikalie in echter Lösung beziehen;

— Eigenschaften des Verdünnungswassers: pH-Wert, Härte, Temperatur, Konzentration des gelösten Sauerstoffs, Restchlor (falls gemessen), gesamter organischer Kohlenstoff (falls gemessen), Schwebstoffe (falls gemessen), Salzgehalt des Prüfmediums (falls gemessen) sowie alle sonstigen durchgeführten Messungen;

— die nominalen Prüfkonzentrationen, die Mittelwerte der gemessenen Werte und ihre Standardabweichungen;

— Wasserqualität innerhalb der Prüfgefäße, pH-Wert, Temperatur (täglich) und Konzentration des gelösten Sauerstoffs;

— ausführliche Angaben zur Fütterung (z. B. Art des Futters, Herkunft, Fütterungsmenge und -häufigkeit).

Ergebnisse:

— Nachweis, dass die Kontrollen die Gesamtvaliditätskriterien erfüllt haben;

— Daten für die Kontrolle (plus Lösungsmittelkontrolle, falls verwendet) und die Behandlungsgruppen wie folgt, Schlüpfen (Schlupffähigkeit und Zeit bis zum Schlüpfen) für F1 und F2, Überleben nach dem Schlüpfen für F1, Wachstum (Länge und Körpergewicht) für F1, genotypisches Geschlecht und sexuelle Unterscheidung (z. B. sekundäre Geschlechtsmerkmale auf der Grundlage der Afterflossen-Papillen und der gonadalen Histologie) für F1, phänotypisches Geschlecht für F1, sekundäre Geschlechtsmerkmale (Afterflossen-Papillen) für F1 *vtg* mRNA (oder VTG-Protein) für F1, Histopathologiebewertung (Gonaden, Leber und Niere) für F1 und Fortpflanzung (Fruchtbarkeit und Fertilität) für F0, F1; (siehe Tabellen 1 und 2).

— Ansatz der statistischen Analyse (Regressionsanalyse oder Varianzanalyse) und Auswertung der Daten (angewandte statistische Tests oder Modelle);

— NOEC (No Observed Effect Concentration) für jede bewertete Wirkung;

— LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) für jede bewertete Wirkung (bei p = 0,05); EC_x für jede bewertete Wirkung, falls zutreffend, und Konfidenzintervalle (z. B. 90 % oder 95 %) und ein Diagramm des angepassten Modells, das für deren Berechnung benutzt wurde, die Steigung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve, die Formel des Regressionsmodells, die geschätzten Modellparameter und deren Standardfehler.

— Abweichungen von dieser Prüfmethode und Abweichungen von den Akzeptanzkriterien und Erwägungen der potenziellen Folgen hinsichtlich des Testergebnisses.

60. Für die Ergebnisse der Endpunktmessungen sollten die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen (auf Replikat- und Konzentrationsbasis, falls möglich) präsentiert werden.

LITERATURHINWEISE

(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 17β-Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Chemosphere 47: 71–80.

(8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 21: 1692–1698.

(9) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-T*ert*-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 22: 1487–1496.

(10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. Aquatic Toxicology 79: 288–295.

(11) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. Aquatic Toxicology 77: 78–86.

(12) Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Journal of Applied Toxicology 35:11-23.

(13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Verfügbar unter: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) Kapitel C.15 dieses Anhangs, Fisch, Kurzfristige Toxizitätsprüfung an Embryonen und Jungfischen mit Dottersack.

(22) Kapitel C.37 dieses Anhangs, 21-Tage Fisch-Screening-Assay: Ein Kurzzeittest zur Bestimmung der Östrogenen und Androgenenaktivität und der Aromatasehemmung.

(23) Kapitel C.41 dieses Anhangs, Fish Sexual Development Test (Test zur Geschlechtsentwicklung bei Fischen).

(24) Kapitel C.48 dieses Anhangs, Kurzeit-Reproduktionstest an Fischen.

(25) Kapitel C.47 dieses Anhangs, Toxizitätsprüfung an Fischen im frühen Entwicklungsstadium.

(26) Kapitel C.49 dieses Anhangs, Prüfung auf akute Toxizität an Fischembryonen (FET).

(27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L und 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 und 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.

Anlage 1

DEFINITIONEN

Chemikalie: Stoff oder Gemisch.

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Fruchtbarkeit = Anzahl der Eier;

Fertilität = Anzahl der lebensfähigen Eier/Fruchtbarkeit;

Gabellänge (FL) ist die Länge von der Spitze des Fischmauls bis zum Ende der mittleren Schwanzflossenstrahlen; wird bei Fischen verwendet, bei denen das Ende der Wirbelsäule schwer zu bestimmen ist (www.fishbase.org)

Schlupfresultat = Schlüpflinge/Anzahl an Embryos, die in einen Inkubator kommen

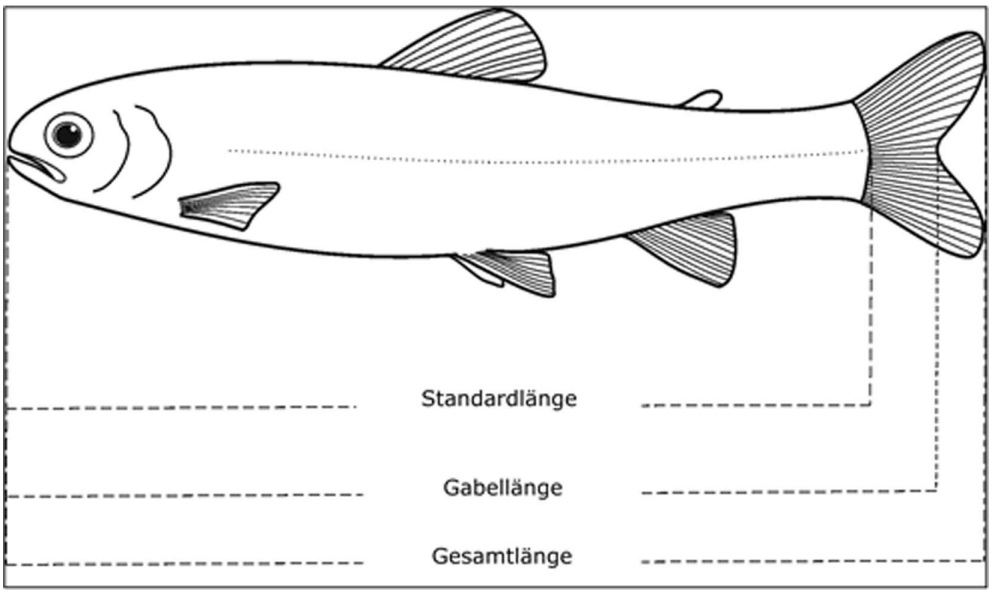
IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee

Standardlänge (SL) ist die Länge eines Fisches, gemessen von der Spitze des Fischmauls bis zum hinteren Ende des letzten Wirbels oder bis zum hinteren Ende des mittelseitigen Teils des Schwanzansatzes. Einfach ausgedrückt, wird bei diesem Maß die Schwanzflosse nicht mitgemessen. (www.fishbase.org)

Gesamtlänge (TL) ist die Länge von der Spitze des Fischmauls bis zur Spitze des längeren Lappens der Schwanzflosse; wird gewöhnlich mit entlang der Mittellinie zusammengehaltenen Lappen gemessen. Es wird in gerader Linie gemessen, nicht entlang der Körperkrümmung. (www.fishbase.org)

Abbildung 1

Beschreibung der verschiedenen verwendeten Längen



ECx: (Konzentration mit einer Wirkung von x %) Konzentration, bei der innerhalb einer bestimmten Expositionsdauer im Vergleich zur Kontrolle eine Wirkung von x % auf die Prüforganismen zu verzeichnen ist. Eine EC50 beispielsweise ist die Konzentration, bei der davon ausgegangen wird, dass sie bei 50 % einer exponierten Population während einer bestimmten Expositionsdauer eine Wirkung auf einen Endpunkt im Test hat.

Durchflusstest ist ein Test mit durchgehender Strömung der Testlösungen durch das Prüfsystem während der Expositionsdauer.

HPG-Achse: Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.

Besatz: Feuchtmasse eines Fischs pro Wasservolumen.

Lowest observed effect concentration (LOEC) die niedrigste geprüfte Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der sich im Vergleich zur Kontrolle eine statistisch signifikante Wirkung beobachten lässt (bei $p < 0,05$). Alle Prüfkonzentrationen oberhalb der LOEC müssen jedoch eine schädigende Wirkung haben, die gleich den bei der LOEC beobachteten Wirkungen oder größer als diese ist. Können diese beiden Bedingungen nicht erfüllt werden, muss ausführlich erklärt werden, wie die LOEC (und damit auch die NOEC) ausgewählt wurde. Weitere Hinweise sind den Anlagen 5 und 6 zu entnehmen.

Median Lethal Concentration (LC50): ist die Konzentration einer Prüfchemikalie, die schätzungsweise auf 50 % der Prüforganismen während der Prüfdauer letal wirkt.

No observed effect concentration (NOEC) die Prüfkonzentration unmittelbar unterhalb der LOEC, die im Vergleich zur Kontrolle innerhalb eines angegebenen Expositionszeitraums keine statistisch signifikante Wirkung ($p < 0,05$) hat.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Besatzdichte: Anzahl Fische je Wasservolumen.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der bzw. das nach dieser Prüfmethode getestet wird.

UVCB: Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

VTG: Vitellogenin ist ein Phospholipoglycoprotein-Vorläufer für Eidotterprotein, das in der Regel bei geschlechtlich aktiven weiblichen Tieren aller eierlegenden Arten vorkommt.

WPF: Wochen nach der Befruchtung

Anlage 2

CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN EINES GEEIGNETEN VERDÜNNUNGSWASSSERS

Stoff	Höchstkonzen-tration
Partikel	5 mg/l
Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff	2 mg/l
Nicht ionisierter Ammoniak	1 µg/l
Restchlor	10 µg/l
Gesamtgehalt an phosphororganischen Pestiziden	50 ng/l
Gesamtgehalt an chlororganischen Pestiziden plus polychlorierten Biphenylen	50 ng/l
Gesamtgehalt an organischem Chlor	25 ng/l
Aluminium	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Chrom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Kupfer	1 µg/l
Eisen	1 µg/l
Blei	1 µg/l
Nickel	1 µg/l
Zink	1 µg/l
Cadmium	100 ng/l
Quecksilber	100 ng/l
Silber	100 ng/l

Anlage 3

PRÜFBEDINGUNGEN FÜR DEN MEOGRT

1. Empfohlene Arten	Japanischer Reiskärpfling (*Oryzias latipes*)
2. Testtyp	Kontinuierlicher Durchfluss
3. Wassertemperatur	Die nominale Prüftemperatur beträgt 25 °C. Die mittlere Temperatur während des Tests in jedem Becken beträgt 24–26 C.
4. Beleuchtungsqualität	Leuchtstofflampen (breites Spektrum und ~150 Lumen/m^2) (~150 Lux).
5. Photoperiode	16 Std. Licht, 8 Std. Dunkelheit
6. Besatz	F0: 2 adulte Fische/Replikat; F1: eingeleitet mit maximal 20 Eiern (Embryos)/ Replikat, reduziert auf 12 Embryos/Replikat beim Schlüpfen, dann 2 adulte Fisch (XX-XY-Brutpaar) bei 9–10 wpf für Fortpflanzungsphase
7. Minimales nutzbares Volumen der Prüfkammer	1,8 l (z. B., Größe der Prüfkammer: 18 x 9 x 15 cm)
8. Erneuerung der Prüflösungen	Mindestens 5 Volumenerneuerungen/Tag bis zu 16 Volumenerneuerungen/Tag (oder 20 ml/min Durchfluss)
9. Alter der Prüforganismen bei Einleitung	F0: > 12 wpf, aber es wird empfohlen, 16 wpf nicht zu überschreiten
10. Anzahl der Organismen pro Replikat	F0: 2 Fische (Paar aus Männchen und Weibchen); F1: maximal 20 Fische (Eier)/ Replikat (erzeugt aus F0- und F1-Brutpaaren).
11. Anzahl der Behandlungen	5 Prüfchemikalien plus angemessene Kontrolle(n)
12. Anzahl der Replikate pro Behandlung	Mindestens 6 Replikate pro Behandlung für Prüfchemikalien und mindestens 12 Replikate für die Kontrolle und für die Lösungsmittelkontrolle, falls diese verwendet wird (die Anzahl an Replikaten wird in der Fortpflanzungsphase in F1 verdoppelt)
13. Anzahl der Organismen pro Test	Mindestens 84 Fische in F0 und 504 in F1. (Wenn eine Lösungsmittelkontrolle verwendet wird, dann 108 Fische in F0 und 648 Fische in F1). Die gezählte Einheit ist der Embryo nach Eleuthero.
14. Fütterungsregime	Die Fische werden mit Salinenkrebsen, *Artemia* spp., (24 Stunden alte nauplii) ad libitum gefüttert, ggf. ergänzt mit einem im Handel erhältlichen Flockenfutter (Ein Beispiel für einen Fütterungsplan, der ein angemessenes Wachstum und die Entwicklung gewährleistet, um die solide Reproduktion zu unterstützen, findet sich in Anlage 5).
15. Belüftung	Keine, außer der gelöste Sauerstoff nähert sich < 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts
16. Verdünnungswasser	Sauberes Oberflächen- oder Brunnenwasser oder rekonstituiertes Wasser oder entchlortes Leitungswasser.

17. Expositionsdauer	Primär 19 Wochen (von F0 bis F2 Schlüpfen)
18.Biologische Endpunkte (primär)	Schlupffähigkeit (F1 und F2); Überleben (F1, vom Schlüpfen bis 4 wpf (Ende des Larven-/Beginn des Jungtierstadiums), von 4 bis 9 (oder 10) wpf (Beginn des Jungtier- bis subadulten Stadiums) und von 9 bis 15 wpf (subadultes Stadium bis adulte Tötung)); Wachstum (F1, Länge und Gewicht bei 9 und 15 wpf); sekundäre Geschlechtsmerkmale (F1, Afterflossen-Papillen bei 9 und 15 wpf); Vitellogenin (F1, *vtg* mRNA oder VTG-Protein bei 15wpf); phänotypisches Geschlecht (F1, über Gonadenhistologie bei 15 wpf); Reproduktion (F0 und F1, Fruchtbarkeit und Fertilität für 21 Tage); Zeit bis zum Laichen (F1); und Histopathologie (F1, Gonaden, Leber und Niere bei 15 wpf)
19.Testvaliditätskriterien	Gelöster Sauerstoff von ≥ 60 % Luftsauerstoff-Sättigungswert; mittlere Wassertemperatur von 24–26 C während des gesamten Tests; erfolgreiche Reproduktion von≥ 65 % der Weibchen bei den Kontrollen; tägliche mittlere Befruchtung von ≥ 20 Eiern bei den Kontrollen; Schlupffähigkeit von ≥ 80 % (Durchschnitt) bei den Kontrollen (jeweils in F1 und F2); Überleben nach dem Schlüpfen bis 3 wpf von ≥ 80 % (Durchschnitt) und von 3 wpf bis zur Tötung für die Generation von ≥ 90 % (Durchschnitt) bei den Kontrollen (F1), Konzentrationen der Prüfchemikalie in der Lösung sollten zufriedenstellend innerhalb von ± 20 % der mittleren gemessenen Werte beibehalten werden.

Anlage 4

LEITLINIEN ZU TYPISCHEN KONTROLLWERTEN

Es sollte angemerkt werden, dass diese Kontrollwerte auf einer begrenzten Anzahl von Validierungsstudien basieren und Änderungen im Falle von weiteren Erkenntnissen unterliegen.

Wachstum

Die Messungen von Gewicht und Länge werden für alle Fische, von denen eine Probe genommen wird, bei 9 (oder 10) und 15 Wochen nach der Befruchtung (wpf) vorgenommen. Die Befolgung dieses Protokolls ergibt die erwarteten Nassgewichte bei 9 wpf von 85–145 mg für Männchen und 95–150 mg für Weibchen. Die erwarteten Gewichtswerte bei 15 wpf betragen 250–330 mg für Männchen und 280–350 mg für Weibchen. Während es bei einzelnen Fischen bedeutende Abweichungen von diesen Bereichen geben kann, würden mittlere Gewichtswerte bei Kontrollen, die erheblich außerhalb dieser Bereiche liegen (und insbesondere geringer sind), auf Probleme mit der Fütterung, der Temperaturkontrolle, der Wasserqualität, eine Erkrankung oder eine Kombination dieser Faktoren hindeuten.

Schlüpfen

Der Schlupferfolg liegt bei den Kontrollen normalerweise um die 90 %, Werte von nur 80 % kommen jedoch häufiger vor. Ein Schlupferfolg von weniger als 75 % kann auf eine unzureichende Anregung der sich entwickelnden Eier oder nicht genug Sorgfalt beim Umgang mit den Eiern hindeuten, wie beispielsweise mangelndes pünktliches Entfernen von toten Eiern, was zu einem Pilzbefall führen kann.

Überleben

Überlebensraten bis 3 wpf ab dem Schlüpfen und nach 3 wpf betragen normalerweise 90 % oder mehr bei Kontrollen, aber Überlebensraten in frühen Lebensstadien von nur 80 % sind nicht alarmierend. Überlebensraten bei Kontrollen von weniger als 80 % wären Grund zur Sorge und könnten eine unzureichende Reinigung der Aquarien anzeigen, was zu einem Verlust der larvalen Fische aufgrund von Erkrankungen oder Erstickung durch zu niedrigen gelösten Sauerstoffpegel führt. Auch Mortalität kann infolge einer Verletzung bei der Beckenreinigung und durch den Verlust larvaler Fische im Abflusssystem des Beckens auftreten.

Vitellogenin-Gen

Während absolute Niveaus des *Vitellogenin*-Gens (*vtg*), ausgedrückt als Kopien/ng der Gesamt-mRNA, sich aufgrund der verwendeten Verfahren oder Instrumente zwischen den Laboren stark unterscheiden könnten, sollte das Verhältnis von *vtg* bei Kontrollweibchen im Vergleich zu Kontrollmännchen ungefähr 200 Mal höher sein. Es ist nicht ungewöhnlich, dass dieses Verhältnis bei einem so hohen Wert wie 1 000 oder 2 000 liegt, jedoch wäre ein Verhältnis von weniger als 200 verdächtig und könnte auf Probleme mit einer Probenverunreinigung oder Problemen mit dem verwendeten Verfahren und/oder den Reagenzien hinweisen.

Sekundäre Geschlechtsmerkmale

Bei Männchen liegt der normale Bereich der sekundären Geschlechtsmerkmale, der als die Gesamtanzahl der Segmente in den Flossenstacheln der Afterflossen-Papille definiert ist, bei 40–80 Segmenten bei 9–10 wpf. Bei 15 wpf sollte der Bereich für Kontrollmännchen ungefähr 80–120 und 0 für Kontrollweibchen betragen. Aus unerklärten Gründen liegt in seltenen Fällen bei Männchen bis 9 wpf keine Papille vor, aber da alle Kontrollmännchen bis 15 wpf eine Papille entwickelt haben, wird dies höchstwahrscheinlich durch eine verzögerte Entwicklung hervorgerufen. Das Vorhandensein einer Papille bei Kontrollweibchen weist auf das Vorhandensein von XX-Männchen in der Population hin.

XX-Männchen

Das normale Auftreten von XX-Männchen im Hintergrund scheint in der Kultur ungefähr 4 % oder weniger bei 25 °C zu betragen, wobei das Vorkommen sich mit gesteigerter Temperatur erhöht. Es sollten Schritte unternommen werden, um den Anteil von XX-Männchen in der Population zu minimieren. Da das Vorhandensein von XX-Männchen eine genetische Komponente zu haben scheint und deshalb vererblich ist, ist die Überwachung des Kulturstamms und die Gewährleistung, dass XX-Männchen nicht verwendet werden, um den Kulturstamm zu propagieren, ein effektives Mittel zur Reduzierung des Vorkommens von XX-Männchen in der Population.

Laichaktivität

Die Laichaktivität bei den Kontrollreplikaten sollte vor dem Durchführen der Fruchtbarkeitsbeurteilung täglich überwacht werden. Die Kontrollpaare können qualitativ anhand einer Sichtprüfung auf Nachweise für eine Laichaktivität bewertet werden. Bis 12–14 wpf sollten die meisten Kontrollpaare laichen. Eine geringe Anzahl an Laichpaaren zu dieser Zeit weist auf potenzielle Probleme mit der Gesundheit, der Reife oder dem Wohlbefinden des Fisches hin.

Fruchtbarkeit

Gesunde und gut gefütterte Reiskärpflinge laichen 12–14 wpf allgemein täglich und produzieren zwischen 15 und 50 Eiern pro Tag. Die Eierproduktion für 16 der empfohlenen 24 Kontrollbrutpaare (> 65 %) sollte bei mehr als 20 Eier pro Paar pro Tag liegen und sogar bis zu 40 Eier pro Tag erreichen. Eine geringere Menge kann auf unreife, mangelernährte oder ungesunde Laichpaare hindeuten.

Fertilität

Der Prozentsatz an befruchteten Eiern für Kontroll-Laichpaare liegt normalerweise im Bereich von 90 %, wobei Werte in den mittleren bis oberen 90ern nicht ungewöhnlich sind. Fertilitätsraten von weniger als 80 % für Kontrolleier sind verdächtig und können entweder auf ungesunde Tiere oder nicht ideale Kulturbedingungen schließen lassen.

Anlage 5

BEISPIEL EINES FÜTTERUNGSPLANS

Ein Beispiel eines Fütterungsplans zur Gewährleistung eines ausreichenden Wachstums und einer adäquaten Entwicklung zur Unterstützung der soliden Reproduktion wird in Tabelle 1 dargestellt. Abweichungen von diesem Fütterungsplan können annehmbar sein, aber es wird empfohlen, dass sie geprüft werden, um zu verifizieren, dass das annehmbare Wachstum und die Reproduktion beachtet werden. Um den vorgeschlagenen Fütterungsplan einzuhalten, muss das Trockengewicht der Salinenkrebse pro Volumen an Salinenkrebsschlamm vor Beginn des Tests bestimmt werden. Dies kann durch das Wiegen eines definierten Volumens an Salinenkrebsschlamm erfolgen, der 24 Stunden lange bei 60 °C auf vorgewogenen Schalen getrocknet wurde. Um das Gewicht der Salze im Schlamm zu berücksichtigen, sollte eine gleiche Menge derselben Salzlösung, die im Schlamm verwendet wurde, ebenfalls getrocknet, gewogen und vom Gewicht des getrockneten Salinenkrebsschlamms abgezogen werden. Alternativ können die Salinenkrebse gefiltert und vor dem Trocknen mit destilliertem Wasser abgespült werden, um so das Erfordernis zu beseitigen, das Gewicht von „Leersalz" zu messen. Diese Informationen werden genutzt, um die Informationen in der Tabelle bezüglich des Trockengewichts der Salinenkrebse in das Volumen des pro Fisch zu fütternden Salinenkrebsschlamms umzuwandeln. Zusätzlich dazu wird empfohlen, dass die Aliquoten des Salinenkrebsschlamms wöchentlich gewogen werden, um das korrekte Trockengewicht der verfütterten Salinenkrebse zu bestätigen.

Tabelle 1

Beispiel eines Fütterungsplans

Zeit (nach dem Schlüpfen)	Salinenkrebs (mg Trockenmasse/Fisch/Tag)
Tag 1	0,5
Tag 2	0,5
Tag 3	0,6
Tag 4	0,7
Tag 5	0,8
Tag 6	1,0
Tag 7	1,3
Tag 8	1,7
Tag 9	2,2
Tag 10	2,8
Tag 11	3,5
Tag 12	4,2
Tag 13	4,5

Zeit (nach dem Schlüpfen)	Salinenkrebs (mg Trockenmasse/Fisch/Tag)
Tag 14	4,8
Tag 15	5,2
Tag 16-21	5,6
Woche 4	7,7
Woche 5	9,0
Woche 6	11,0
Woche 7	13,5
Woche 8-Tötung	22,5

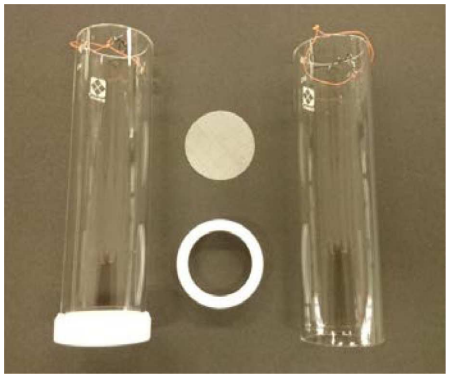
Anlage 6

BEISPIELE EINER EIERINKUBATIONSKAMMER

Beispiel A

Dieser Inkubator besteht aus einem Zentrifugenröhrchen aus durchtrenntem Glas, der über eine Edelstahlhülse verbunden ist und durch die obere Kappe der Zentrifugenschraube in seiner Position gehalten wird. Ein kleines Glas- oder Edelstahlröhrchen wird durch die Kappe projiziert und nahe des abgerundeten Bodens positioniert und es werden vorsichtig Luftblasen erzeugt, um die Eier schwebend zu halten und die Übertragung von saprophytischen Pilzinfektionen zwischen den Eiern zu reduzieren, während der chemische Austausch zwischen dem Inkubator und dem Haltebecken vereinfacht wird.

Beispiel B



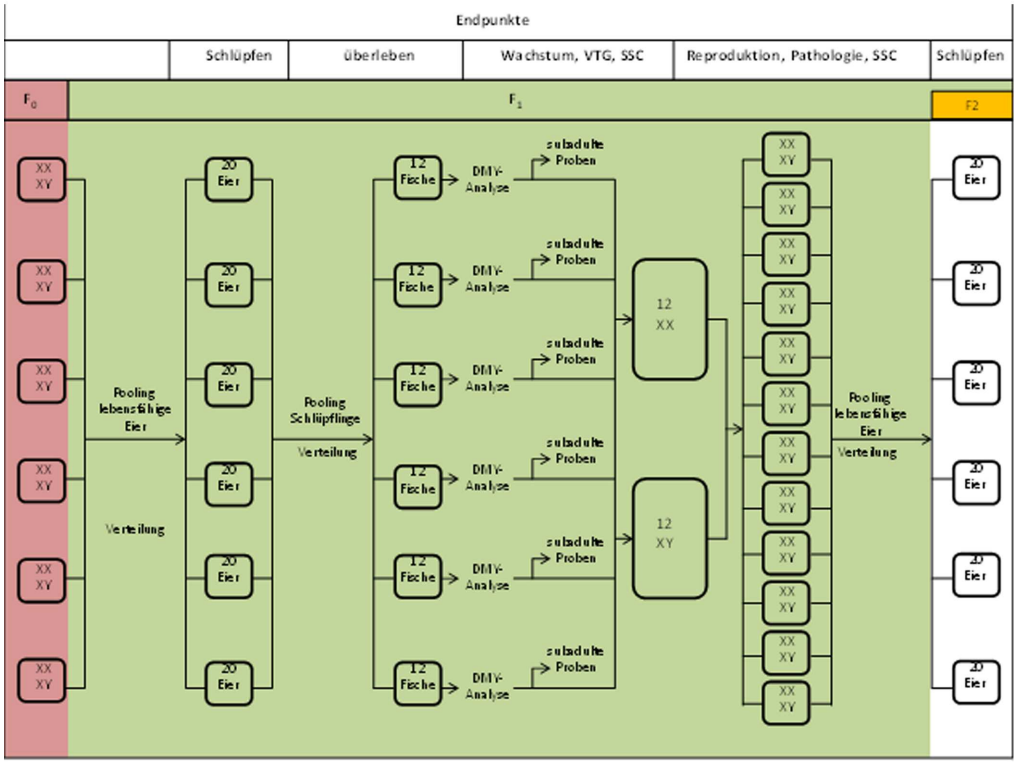
Der Inkubator besteht aus einem Glaszylinderkörper (5 cm Durchmesser und 10 cm Höhe) und Edelstahldrahtgeflecht (0,25 φ und 32 Maschenweite), das mithilfe eines PTFE-Rings an der Unterseite des Körpers befestigt ist. Die Inkubatoren für Eier von Reiskärpflingen werden von den Hebestangen in die Becken gehängt und vertikal (ungefähr 5 cm Amplitude) in einem ungefähren Kreis (ca. einmal alle 4 Sekunden) geschüttelt.

Anlage 7

SCHEMATISCHE DARSTELLUNG FÜR DAS POOLING UND BESIEDELN VON REPLIKATEN WÄHREND DER MEOGRT-PRÜFMETHODE

Abb. 1

Pooling und Besiedelung von Replikaten während des MEOGRT. Die Abbildung stellt eine Behandlung oder ½ Kontrolle dar. Aufgrund des Pooling ist die Replikatsidentität während des Tests nicht durchgehend. Bitte beachten, dass der Begriff „Eier“ sich auf lebensfähige, befruchtete Eier bezieht (ähnlich zu Embryos).



Behandlungen und Replikation.

Die Prüfmethode empfiehlt Behandlungen mit fünf Prüfchemikalien mithilfe von technischem Material und einer Negativkontrolle. Die Anzahl der Replikate pro Behandlung bleibt während des MEOGRT nicht konstant und die Anzahl der Replikate in der Kontrollbehandlung ist doppelt so hoch wie bei einer Behandlung mit einer einzelnen Prüfchemikalie. In F0 verfügt jede Behandlung mit Prüfchemikalien über sechs Replikate, während es bei der Negativkontrollbehandlung 12 Replikate sind. Von Lösungsmitteln wird stark abgeraten, und falls sie verwendet werden, sollte eine Begründung für die Verwendung eines Lösungsmittels und die Wahl des Lösungsmittels im MEOGRT-Bericht aufgenommen werden. Wenn eine Lösungsmittel verwendet wird, sind außerdem zwei Arten von Kontrollen erforderlich: a) eine Lösungsmittelkontrolle und b) eine Negativkontrolle. Diese zwei Kontrollgruppen sollten an allen Punkten der MEOGRT-Zeitleiste jeweils aus einer vollen Zahl an Replikaten bestehen. Während der Entwicklung der Prüforganismen in der F1-Generation (und F2 bis zum Schlüpfen), bleibt diese Replikatstruktur gleich. Im adulten Stadium wird die Anzahl der Brutpaarreplikate pro Behandlung optimalerweise jedoch verdoppelt, wenn die F1-Brutpaare aufgestellt werden; deshalb gibt es bei jeder Behandlung mit Prüfchemikalien bis zu 12 Replikatpaare und in der Kontrollgruppe 24 Replikatpaare (und ggf. weitere 24 Replikatpaare in der Lösungsmittelkontrolle). Die Bestimmung des Schlüpfens von Embryos, die von den F1-Paaren abgelaicht wurden, erfolgt über dieselbe Replikatstruktur, die für die Embryos verwendet wurde, die von den F0-Paaren abgelaicht wurden, was ursprünglich sechs Replikate pro Behandlung mit Prüfchemikalien und 12 Replikate in die Kontrollgruppe(n) bedeutet.

Anlage 8

ZÄHLEN VON AFTERFLOSSEN-PAPILLEN

Wichtiges Material und Reagenzien

— Stereomikroskop (optional mit angebrachter Kamera)

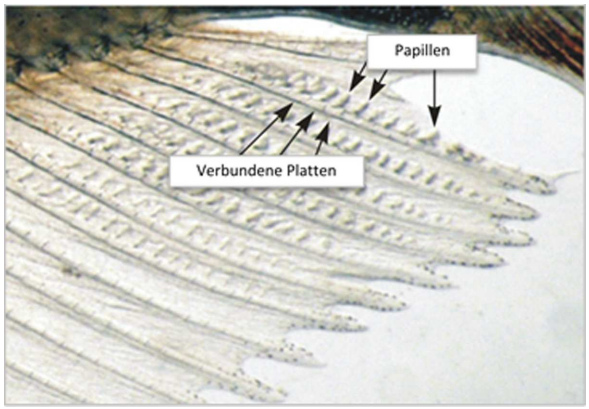
— Fixierlösung (z. B. Davidson (Bouin wird nicht empfohlen)), wenn nicht auf einem Bild gezählt wird

Verfahren

Nach der Nekropsie sollte ein Bild der Afterflosse aufgenommen werden, um ein bequemes Zählen der Afterflossen-Papillen zu ermöglichen. Während die Bildgebung die empfohlene Methode ist, kann die Afterflosse mit der Davidson-Fixierlösung oder anderen angemessenen Fixierlösungen ca. 1 Minute lang befestigt werden. Es ist wichtig, die Afterflosse während der Fixierung flach zu halten, um das Zählen der Papillen einfacher zu gestalten. Die Karkasse mit der Afterflosse kann im Davidson-Fixierlösung oder einer anderen angemessenen Fixierlösung aufbewahrt werden, bis sie analysiert wird. Es muss die Anzahl der verbundenen Platten (siehe **Abbildung 1**) mit Papillen gezählt werden, die aus dem Hinterrand der verbundenen Platte hervorstehen.

Abb. 1

Afterflossen-Papille



Anlage 9

DETAILLIERTE ZEITLEISTE DES MEOGRT

Prüfwochen 1–3 (F0)

Die laichenden Fische der F0-Generation, die die Auswahlkriterien erfüllt haben (siehe Abschn. 16–20) werden drei Wochen lang exponiert, um es den sich entwickelnden Gameten und Gonadengeweben zu ermöglichen, der Prüfchemikalie ausgesetzt zu sein. In jedem Replikatbecken befindet sich ein einziges Fischpaar (Brutpaar aus XX-Weibchen und XY-Männchen). Die abgelaichten Eier werden 21 Tage lang ab Testtag 1 gesammelt, gezählt und hinsichtlich ihrer Fertilität beurteilt.

Prüfwoche 4 (F0 und F1)

Die befruchteten und lebensfähigen Eier (Embryos) sollten bevorzugt an einem einzigen Tag gesammelt werden; wenn es jedoch nicht genug Embryos gibt, können diese über zwei Tage hinweg gesammelt werden. In diesem Fall werden alle Embryos, die am ersten Tag gesammelt wurden, für die Behandlungen mit denen, die am zweiten Tag gesammelt wurden, zusammengelegt. Dann werden die insgesamt gepoolten Embryos für jede Behandlung nach dem Zufallsprinzip auf jeden der Replikatinkubatoren mit 20 Embryos pro Inkubator verteilt. Die Mortalitäten der befruchteten Eier (Embryos) werden täglich kontrolliert und aufgezeichnet. Tote Eier werden aus den Inkubatoren entfernt (tote befruchtete Eier können insbesondere in den frühen Stadien durch einen deutlich erkennbaren Verlust an Lichtdurchlässigkeit und eine Veränderung der Färbung bezeichnet werden, hervorgerufen durch Gerinnung und/oder Ausfällung von Eiweiß, was zu einem weiß-opaken Aussehen führt; OECD 2010).

Hinweis: Wenn eine einzelne Behandlung einen zweiten Sammeltag erfordert, müssen alle Behandlungen (einschließlich der Kontrollen) dieses Verfahren befolgen. Wenn es nach dem zweiten Tag des Sammelns nicht genügend Embryos in einer Behandlung gibt, um 20 Embryos pro Inkubator zu erhalten, muss die Anzahl der Embryos bei dieser spezifischen Behandlung auf 15 Embryos pro Inkubator reduziert werden. Wenn es nicht genug Embryos gibt, um 15 pro Inkubator zu haben, dann muss die Anzahl der Replikatinkubatoren reduziert werden, bis genug Embryos für 15 pro Inkubator vorhanden sind. Zusätzlich dazu könnten mehr Brutpaare pro Behandlung und Kontrollen in F0 hinzugefügt werden, um mehr Eier zu produzieren, um die empfohlenen 20 pro Replikat zu erhalten.

Am Testtag 24 werden die F0-Brutpaare schmerzfrei getötet und Gewicht und Länge aufgezeichnet. Wenn erforderlich können die F0-Brutpaare weitere 1–2 Tage behalten werden, um F1 neu zu starten.

Prüfwochen 5–6 (F1)

Ein bis zwei Tage vor dem geplanten Start des Schlüpfens muss die Anregung der inkubierten Eier gestoppt oder reduziert werden, um das Schlüpfen zu beschleunigen. Da an jedem Tag Embryos schlüpfen, werden die Jungtiere nach Behandlung zusammengefasst und systematisch auf jedes larvale Replikatbecken in einer spezifischen Behandlung mit nicht mehr als 12 Jungtieren verteilt. Dies geschieht durch zufällige Auswahl von Jungtieren und Platzierung eines einzelnen Jungtiers in aufeinanderfolgenden Replikaten in einer wahllosen Ziehung, wobei die Reihenfolge der spezifischen Behandlungsreplikate durchlaufen wird, bis alle Replikate innerhalb Behandlung über 12 Jungtiere verfügen. Wenn es nicht genug Jungtiere gibt, um alle Replikate zu füllen, dann muss sichergestellt werden, dass so viele Replikate wie möglich über 12 Jungtiere verfügen, um die F1-Phase zu starten.

Die Eier, die bis zum Doppelten des mittleren Kontrolltags für das Schlüpfen noch nicht geschlüpft sind, werden als nicht lebensfähig angesehen und entsorgt. Die Anzahl an Jungtieren wird aufgezeichnet und der Schlupferfolg (Schlupffähigkeit) wird in jedem Replikat berechnet.

Prüfwochen 7–11 (F1)

Das Überleben der larvalen Fische wird geprüft und täglich in allen Replikaten aufgezeichnet. Am Prüftag 43 wird die Anzahl der überlebenden Fisch in jedem Replikat sowie die ursprüngliche Anzahl der Jungtiere im Replikat aufgezeichnet (nominal zwölf). Dies ermöglicht die Berechnung des Überlebens vom Schlüpfen bis zum subadulten Stadium.

Prüfwoche 12 (F1)

An den Prüftagen 78–85 wird eine kleine Probe aus der Schwanzflosse jedes Fischs entnommen, um das genotypische Geschlecht jedes einzelnen Tiers zu bestimmen (d. h. Flossenabtrennung). Diese Information wird verwendet, um Brutpaare zu bilden.

Innerhalb von drei Tagen nach der Bestimmung des genotypischen Geschlechts jedes Fischs werden zufällig 12 Brutpaare pro Behandlung und 24 Paare pro Kontrolle gebildet. Zwei XX- und XY-Fische aus jedem Replikat werden zufällig ausgewählt und dann nach Geschlecht gepoolt. Anschließend werden sie zufällig ausgewählt, um ein Brutpaar zu bilden (d. h. XX-XY-Paar). Es werden mindestens 12 Replikate pro Chemikalienbehandlung und mindestens 24 Replikate für die Kontrolle mit jeweils einem Brutpaar pro Replikat gebildet. Wenn ein Replikat nicht entweder zwei XX- oder zwei XY-Fische für das Pooling zur Verfügung hat, dann sollten Fische mit dem angemessenen Geschlechtsgenotyp aus anderen Replikaten innerhalb der Behandlung genommen werden.

Die verbleibenden Fische (maximal 8 Fische pro Replikat) werden schmerzfrei getötet und von ihnen wird eine Probe für die verschiedenen subadulten Endpunkte genommen. Die *dmy*-Daten (XX oder XY) für alle subadulten Proben werden behalten, um sicherzustellen, dass alle Endpunktdaten auf das genetische Geschlecht jedes einzelnen Fischs bezogen werden können.

Prüfwochen 13–14 (F1)

Die Exposition wird fortgesetzt, während sich die subadulten Brutpaare in adulte Fische weiterentwickeln. Am Prüftag 98 (d. h. dem Tag, bevor das Sammeln der Eier beginnt), werden die Eier aus den Aquarien und von den Weibchen entfernt.

Prüfwochen 15–17 (F1)

Die abgelaichten Eier werden 21 nachfolgende Tage lang in jedem Replikat gesammelt und auf Fruchtbarkeit und Fertilität bewertet.

Prüfwoche 18 (Wiederholung von Prüfwoche 4) (F1 und F2)

Am Prüftag 120 erfolgt die Eiersammlung in jedem Replikatbecken morgens. Die gesammelten Eier werden bewertet und die befruchteten Eier (Fasern entfernt) von jedem der Brutpaare nach Behandlung gepoolt und systematisch auf Eierinkubationskammern mit 20 befruchteten Eiern pro Inkubator verteilt. Die Inkubatoren können in separaten „Inkubatorbecken", die für jede Behandlung eingerichtet wurden, oder im Replikatbecken platziert werden, die beim Schlüpfen die geschlüpften Larven enthalten. Es wird bevorzugt, dass die Embryos an einem einzigen Tag gesammelt werden; wenn es jedoch nicht genug Embryos gibt, können die Embryos über zwei Tage hinweg gesammelt werden. Wenn über zwei Tage gesammelt wird, werden alle Embryos in der Behandlung, die am ersten Tag gesammelt wurden, mit denen gepoolt, die am zweiten Tag gesammelt wurden. Dann werden die insgesamt gepoolten Embryos für jede Behandlung nach dem Zufallsprinzip auf jeden der Replikatinkubatoren mit 20 Embryos pro Inkubator verteilt. Hinweis: Wenn eine einzelne Behandlung einen zweiten Sammeltag erfordert, müssen alle Behandlungen (einschließlich der Kontrollen) dieses Verfahren befolgen. Wenn es nach dem zweiten Tag des Sammelns eine unzureichende Anzahl von Embryos in einer Behandlung gibt, um 20 Embryos pro Inkubator zu erhalten, muss die Anzahl der Embryos in dieser spezifischen Behandlung auf 15 Embryos pro Inkubator reduziert werden. Wenn es nicht genug Embryos gibt, um 15 pro Inkubator zu haben, muss die Anzahl der Replikatinkubatoren reduziert werden, bis genug Embryos für 15 pro Inkubator vorhanden sind.

Am Prüftag 121 (oder Prüftag 122, um sicherzustellen, dass F2 gut gestartet ist) werden die F1-Brutpaare schmerzfrei getötet und für die adulten Endpunkte analysiert. Wenn erforderlich können die F1-Brutpaare weitere 1–2 Tage behalten werden, um F2 neu zu starten.

Prüfwochen 19–20 (F2)

Ein bis zwei Tage vor dem geplanten Start des Schlüpfens muss die Anregung der inkubierten Eier gestoppt oder reduziert werden, um das Schlüpfen zu beschleunigen. Wenn der Test durch den Abschluss des Schlüpfens von F2 beendet wird, werden die Jungtiere jeden Tag gezählt und entsorgt. (Embryos, die nach einer längeren Inkubationszeit, die als zwei Mal der mediane Kontrolltag des Schlüpfens definiert ist, noch nicht geschlüpft sind, werden als nicht lebensfähig angesehen).

Anlage 10

STATISTISCHE ANALYSE

Die Arten von biologischen Daten, die im MEOGRT erzeugt werden, sind nicht einzigartig, und mit Ausnahme von pathologischen Daten wurden viele geeignete statistische Methoden entwickelt, um ähnliche Daten in Abhängigkeit von den Merkmalen der Daten wie Normalität, Varianzhomogenität, ob das Studiendesign für Hypothesentests oder Regressionsanalysen, parametrische oder nicht-parametrische Tests usw. geeignet ist, ordnungsgemäß zu analysieren. Im Allgemeinen folgen die vorgeschlagenen statistischen Analysen den Empfehlungen der OECD für Ökotoxizitätsdaten (OECD 2006) und ein Entscheidungsflussdiagramm für die MEOGRT-Datenanalyse ist in Abbildung 2 zu sehen.

Es wird angenommen, dass die Datensätze meist monotone Reaktionen anzeigen. Zusätzlich dazu sollte das Problem, einen einseitigen statistischen Test im Vergleich zu einem zweiseitigen statistischen Test zu verwenden, berücksichtigt werden. Wenn es keine biologische Begründung gibt, die einen einseitigen Test angemessen machen würde, wird empfohlen, einen einseitigen Test zu verwenden. Während der folgende Abschnitt bestimmte statistische Tests empfiehlt, würden, wenn angemessenere und/oder aussagekräftige statistische Methoden zur Anwendung der spezifischen, im MEOGRT erzeugten Daten entwickelt werden, diese statistischen Tests verwendet werden, um diese Vorteile auszunutzen.

Die MEOGRT-Daten sollten für jedes genotypische Geschlecht separat analysiert werden. Es gibt zwei Strategien, um die Daten von Fischen mit umgekehrtem Geschlecht zu analysieren (entweder XX-Männchen oder XY-Weibchen). 1) Alle Daten von Fischen mit umgekehrtem Geschlecht für den gesamten Test zensieren, außer der Prävalenz des umgekehrten Geschlechts in jedem Replikat. 2) Die Daten aller Fische mit umgekehrtem Geschlecht im Datensatz lassen und auf Basis des Genotyps analysieren.

Histopathologische Daten

Die histopathologischen Daten werden als Einstufungen des Schweregrads eingetragen, die mit einem neu entwickelten statistischen Verfahren, dem Rao-Scott Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS), bewertet werden (Green et al., 2014). Die *Rao-Scott*-Anpassung speichert Informationen zur Testreplikation; das Verfahren *by Slices* integriert die biologische Erwartung, dass die Einstufungen des Schweregrads dazu tendieren, sich mit steigenden Behandlungskonzentrationen zu erhöhen. Bei jeder Diagnose spezifiziert der RSCABS-Ausgang, welche Behandlungen eine höhere Prävalenz der Pathologie besitzen als Kontrollen und die zugehörigen Sicherheitsstufen.

Fruchtbarkeitsdaten

Analysen für Vermehrungsratendaten bestehen aus einem abstufenden Jonckheere-Terpstra- oder Williams-Test, um die Behandlungseffekte zu bestimmen, sofern die Daten mit einer monotonen Konzentrationsreaktion konsistent sind. Bei einem abstufenden Test erfolgen alle Vergleiche auf einem Signifikanzniveau von 0,05 und es werden keine Anpassungen für die Anzahl der durchgeführten Vergleiche gemacht. Es wird erwartet, dass die Daten mit einer monotonen Konzentrationsreaktion konsistent sind, aber dies kann entweder durch Sichtprüfung der Daten oder durch die Konstruktion von linearen und quadratischen Kontrasten von Behandlungsmittelwerten nach einer Transformation nach Reihenfolge der Daten verifiziert werden. Sofern der quadratische Kontrast signifikant ist und der lineare Kontrast nicht signifikant ist, wird die Trendprüfung durchgeführt. Andernfalls wird der Dunnett-Test verwendet, um die Behandlungseffekte zu bestimmen, wenn die Daten normal verteilt sind und homogene (ähnliche) Varianzen aufweisen. Sind diese Anforderungen nicht erfüllt, wird der Dunn-Test mit einer Bonferroni-Holm-Anpassung verwendet. Alle indizierten Tests werden unabhängig von allgemeinen F- oder Kruskal-Wallis-Tests durchgeführt. Weitere Angaben werden in OECD 2006 bereitgestellt.

Es können alternative Methoden verwendet werden, wie beispielsweise ein verallgemeinertes lineares Modell mit Poisson-Fehlern für Eierzählungen (ohne Transformation), wenn dies statistisch begründet wird (Cameron und Trividi, 2013). Statistische Beratung wird empfohlen, wenn ein alternativer Ansatz verwendet wird.

Tägliche Eierzählung in einer einzelnen Generation

Das ANOVA-Modell ist gegeben durch Y = Zeit*Zeit + Behandlung + *Behandlung + Zeit*Behandlung + *Zeit*Behandlung, mit zufälligen Effekten von Replikat(Generation*Behandlung) und Zeit*Replikat(Behandlung), was ungleichmäßige Varianzkomponenten beider Arten über Generationen hinweg ermöglicht. „Zeit" bezieht sich hier auf die Häufigkeit der Eierzählungen (z. B. Tag oder Woche). Dies ist eine Analyse mit Messwiederholungen, wobei die Korrelationen zwischen Beobachtungen in denselben Replikaten die Datenart mit wiederholten Messungen erklärt.

Die Haupteffekte der Behandlung werden mit dem Dunnett- (oder Dunnett-Hsu-)Test geprüft, der an die Anzahl der Vergleiche angepasst wird. Anpassungen für den Haupteffekt der Generation oder Zeit sind erforderlich, da es für diese zwei Faktoren kein „Kontrollniveau" gibt und jedes Stufenpaar ein Vergleich möglicher Interessen ist. Wenn der F-Test für den Haupteffekt auf Niveau 0,05 signifikant ist, dann können die paarweisen Vergleiche für diese zwei Haupteffekte über die Niveaus dieses Faktors hinweg ohne weitere Anpassungen auf dem Niveau von 0,05 geprüft werden.

Das Modell umfasst Zwei- und Drei-Faktor-Interaktion, sodass ein Haupteffekt für beispielsweise die Zeit eventuell nicht signifikant ist, obwohl die Zeit einen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse hat. Wenn deshalb eine Zwei- oder Drei-Faktor-Interaktionen im Hinblick auf die Zeit bei einem Niveau von 0,05 signifikant ist, dann können die Niveauvergleiche der Zeit auf dem 0,05-Signifikanzniveau ohne weitere Anpassung übernommen werden.

Danach folgen F-Tests für die Signifikanz der Behandlung innerhalb der Zeit, die sogenannten „Scheiben" in der ANOVA-Tabelle. Wenn die Scheibe für die Behandlung beispielsweise innerhalb von F1 und Zeit 12 liegt und auf einem Niveau von 0,05 signifikant ist, dann können die paarweisen Vergleiche für die Behandlung innerhalb von F1 und Zeit 12 ohne weitere Anpassung auf dem Niveau von 0,05 akzeptiert werden. Ähnliche Aussagen gelten für Tests auf Zeit innerhalb von F1 und Behandlung und für Generation innerhalb einer Zeit und Behandlung.

Schließlich sollten für Vergleiche, die nicht unter eine der obigen Kategorien fallen, Vergleiche mithilfe der Bonferroni-Holm-Anpassung an p-Werte angepasst werden. Weitere Informationen zu Analysen solcher Modelle können in Hocking (1985) und Hochberg und Tamhane (1987) gefunden werden.

Alternativ werden die Rohdaten aufgezeichnet und im Studienbericht als die Vermehrungsrate (Anzahl an Eiern) pro Replikat für jeden Tag präsentiert. Der Replikatmittelwert der Rohdaten sollte berechnet werden und dann eine Quadratwurzeltransformation angewandt werden. Eine Einweg-ANOVA auf dem transformierten Replikatmittelwert sollte berechnet werden, gefolgt von Dunnett-Kontrasten. Es kann auch hilfreich sein, eine Sichtprüfung der Vermehrungsratendaten jeder Behandlung und/oder jedes Replikats mit einem Streudiagramm durchzuführen, das die Daten über die Zeit anzeigt. Dadurch kann eine informelle Beurteilung der potenziellen Effekte über die Zeit durchgeführt werden.

Alle anderen biologischen Daten

Die statistischen Analysen basieren auf der zugrunde liegenden Annahme, dass die Daten mit einer angemessenen Dosiswahl monoton sein werden. Deshalb wird angenommen, dass die Daten monoton sind und sie werden formell mithilfe von linearen und quadratischen Kontrasten auf Monotonie bewertet. Wenn die Daten monoton sind, ist ein Jonckheere-Terpstra-Trendtest aus den Medianen der Replikate (wie in OECD 2006 empfohlen) empfehlenswert. Wenn der quadratische Kontrast signifikant ist und der lineare Kontrast nicht, werden die Daten als nicht monoton angesehen.

Wenn die Daten nicht monoton sind, insbesondere aufgrund der reduzierten Reaktion auf die höchste oder die höchsten zwei Behandlungen, sollte die Zensur des Datensatzes erwogen werden, sodass die Analyse ohne diese Behandlungen durchgeführt werden kann. Diese Entscheidung muss mit fachlichem Urteilsvermögen und allen verfügbaren Daten, insbesondere denen, die bei diesen Behandlungsniveaus eine offensichtliche Toxizität anzeigen, getroffen werden.

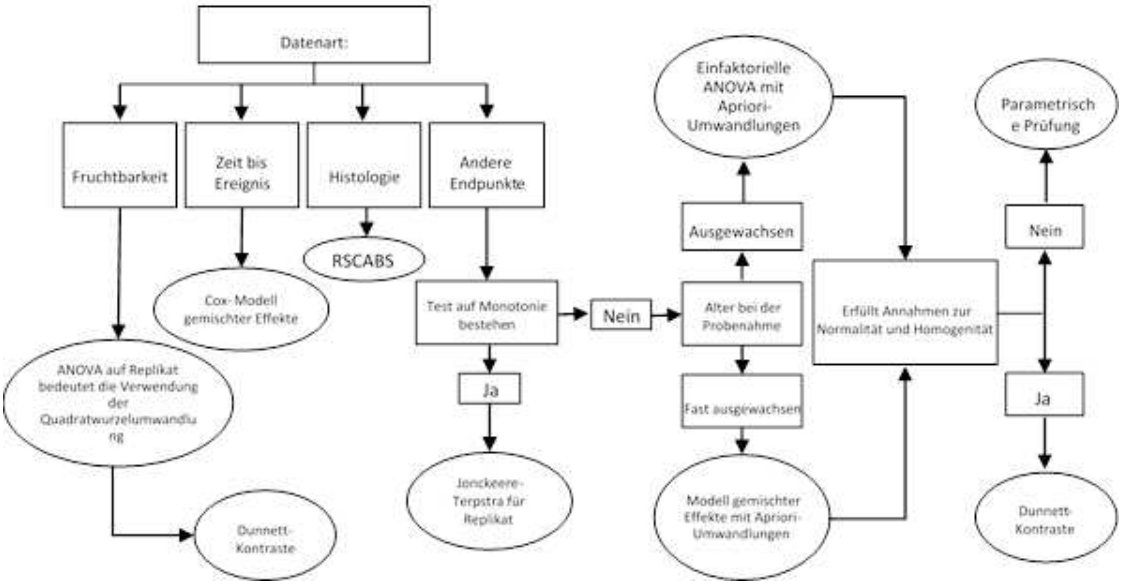
Für Gewicht und Länge werden keine Transformationen empfohlen, obwohl sie gelegentlich erforderlich sein könnten. Es wird jedoch eine log-Transformation für die Vitellogenin-Daten empfohlen; eine Quadratwurzeltransformation wird für die SSC-Daten empfohlen (Afterflosse und Papillen); eine Arkussinuswurzel-Transformation wird für die Daten zum proportionalen Schlüpfen, dem Prozentsatz an Überlebenden, dem Geschlechtsverhältnis und dem Prozentsatz an fruchtbaren Eiern empfohlen. Die Zeit bis zum Schlüpfen und die Zeit bis zum ersten Ablaichen sollten als Zeit-bis-Ereignisdaten behandelt werden, wobei individuelle Embryos, die nicht im definierten Zeitraum schlüpfen, oder Replikate, die niemals ablaichen, als rechts-zensierte Daten behandelt werden. Die Zeit bis zum Schlüpfen sollte über den medianen Tag des Schlüpfens jedes Replikats berechnet werden. Diese Endpunkte sollten mithilfe eines proportionalen Cox-Gefahrenmodells mit gemischten Effekten analysiert werden.

Die biologischen Daten aus adulten Proben haben eine Messung pro Replikat, das heißt, dass es einen XX-Fisch und einen XY-Fisch pro Replikataquarium gibt. Deshalb wird empfohlen, dass eine Einweg-ANOVA auf den Replikatmittelwerten durchgeführt wird. Wenn die Annahmen von ANOVA (Normalität und Varianzhomogenität wie auf den Residuen der ANOVA durch den Shapiro-Wilks-Test bzw. den Levene-Test bewertet) erfüllt werden, sollten die Dunnett-Kontraste verwendet werden, um Behandlungen zu bestimmen, die sich von der Kontrolle unterschieden. Auf der anderen Seite sollte ein Dunn-Test durchgeführt werden, wenn die Annahmen der ANOVA nicht erfüllt werden, um zu bestimmen, welche Behandlungen sich von der Kontrolle unterschieden. Ein ähnliches Verfahren wird für Daten empfohlen, die in der Form von Prozentsätzen vorliegen (Fertilität, Schlüpfen und Überleben).

Die biologischen Daten aus den subadulten Proben haben 1 bis 8 Messungen pro Replikat, d. h. es kann eine variable Anzahl von Tieren geben, die zum Replikatmittelwert für jedes genotypische Geschlecht beitragen. Deshalb wird es empfohlen, dass ein ANOVA-Modell mit gemischten Effekten und dann die Dunnett-Kontraste verwendet werden, wenn die Annahmen zur Normalität und der Varianzhomogenität erfüllt wurden (auf den Rückständen der ANOVA mit gemischten Effekten). Es sollte ein Dunn-Test durchgeführt werden, wenn sie nicht erfüllt wurden, um zu bestimmen, welche Behandlungen sich von der Kontrolle unterschieden.

Abbildung 2

Flussdiagramm für die empfohlenen statistischen Verfahren für die MEOGRT-Datenanalyse.



LITERATURHINWEISE

(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 und 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 und Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. Auflage, John Wiley and Sons, New York

C.53 THE LARVAL AMPHIBIAN GROWTH AND DEVELOPMENT ASSAY (LAGDA)

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 241 (2015). Angesichts des Risikos, dass in der Umwelt vorhandene Chemikalien Menschen und wild lebende Pflanzen und Tiere beeinträchtigen könnten, muss ein Test zur Identifizierung und Charakterisierung der nachteiligen Folgen der Exposition gegenüber giftigen Chemikalien bei Amphibien entwickelt und validiert werden. Die OECD-Testleitlinie des Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA) beschreibt eine Toxizitätsprüfung mit einer Amphibienspezies, die das Wachstum und die Entwicklung von der Befruchtung bis zur frühen Jungtierphase berücksichtigt. Dieser Test (normalerweise 16 Wochen) beurteilt die frühe Entwicklung, Metamorphosen, das Überleben, das Wachstum und die teilweise Geschlechtsreife. Er ermöglicht auch die Messung einer Folge an anderen Endpunkten, die die diagnostische Beurteilung von Chemikalien mit mutmaßlicher endokriner Wirkung (EDCs) oder anderen Arten von entwicklungs- und reproduktionstoxischen Stoffen ermöglicht. Dieses in dieser Prüfmethode beschriebene Verfahren wird aus der Validierungsarbeit der US-Umweltschutzbehörde zu afrikanischen Krallenfröschen (*Xenopus laevis*) mit Unterstützungsarbeit in Japan (1) abgeleitet. Obwohl andere amphibische Spezies an ein Wachstums- und Entwicklungsprüfprotokoll angepasst werden könnten, wobei die Fähigkeit, das genetische Geschlecht zu bestimmen, eine wichtige Komponente ist, gelten die in dieser Prüfmethode beschriebenen spezifischen Methoden und Beobachtungsendpunkte ausschließlich für *Xenopus laevis*.

2. Der LAGDA dient als höherstufiger Test mit einer Amphibie zur Sammlung umfassenderer Informationen zur Konzentrationsreaktion hinsichtlich unerwünschter Auswirkungen, die sich zur Verwendung bei der Gefahrenidentifizierung und -charakterisierung und bei der Bewertung des ökologischen Risikos eignen. Der Test passt bei Stufe 4 des OECD-Rahmenkonzepts zur Prüfung und Bewertung der endokrinen Disruptoren, wobei In-vivo-Tests auch Daten zu unerwünschten Auswirkungen auf endokrinrelevante Endpunkte bieten (2). Das allgemeine experimentelle Design umfasst die Exposition von *X. laevis*-Embryos im Nieuwkoop und Faber (NF) Stadium 8–10 (3) gegenüber mindestens vier Konzentrationen an Prüfchemikalien (allgemein im Abstand von nicht weniger als einem halben Logarithmus) und Kontrollen bis 10 Wochen nach der medianen Zeit zum NF-Stadium 62 bei der Kontrolle, wobei zwischenzeitlich eine Teilstichprobe im NF-Stadium 62 genommen wird (≤ 45 nach der Befruchtung; normalerweise ungefähr 45 Tage (dpf). Es gibt vier Replikate in jeder Prüfkonzentration mit acht Replikaten für die Kontrolle. Im Laufe der Exposition bewertete Endpunkte (bei der zwischenzeitlichen Teilstichprobe und endgültige Probenahme bei Beendigung des Tests) umfassen diejenigen, die die verallgemeinerte Toxizität angeben: Bestimmung von Mortalität, abnormalem Verhalten und Wachstum (Länge und Gewicht), sowie Endpunkte, die entwickelt wurden, um die spezifischen Wirkweisen der endokrinen Toxizität zu charakterisieren, die auf Östrogen, Androgen oder über die Schilddrüse vermittelte physiologische Prozesse abzielen. Die Methode hat ihren Hauptschwerpunkt auf den potenziellen populationsrelevanten Effekten (nämlich Einfluss auf Überleben, Entwicklung, Wachstum und Fortpflanzungsentwicklung) für die Berechnung einer No Observed Effect Concentration (NOEC) oder einer Effektkonzentration, die × % Änderung (ECx) im gemessenen Endpunkt hervorrufen kann. Obwohl angemerkt werden sollte, dass ECx-Ansätze sich selten für große Studien dieser Art eignen, bei denen die Erhöhung der Anzahl an Prüfkonzentrationen zur Bestimmung der gewünschten ECx unpraktisch sein könnte. Es sollte ebenfalls angemerkt werden, dass die Methode nicht die Fortpflanzungsphase selbst abdeckt. Die in dieser Prüfmethode verwendeten Begriffe sind in Anlage 1 definiert.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

3. Aufgrund der begrenzten Anzahl an geprüften Chemikalien und Laboren, die an der Validierung dieses eher komplexen Tests beteiligt sind – insbesondere die Inter-Laborreproduzierbarkeit wird bisher nicht mit experimentellen Daten dokumentiert – wird erwartet, dass die OECD-Testleitlinie 241 überarbeitet und wenn erforderlich mit Blick auf die gewonnene Erfahrung aktualisiert wird, wenn eine ausreichende Anzahl an Studien verfügbar ist, um den Einfluss dieses neuen Studiendesigns zu ermitteln. Der LAGDA ist ein wichtiger Test, um potenzielle Mitverursacher des Rückgangs der Amphibienpopulation zu ermitteln, indem er die Auswirkungen der Exposition gegenüber Chemikalien während des sensiblen Larvenstadiums bewertet, in dem Auswirkungen auf das Überleben und die Entwicklung, einschließlich der normalen Entwicklung der Fortpflanzungsorgane, die Populationen negativ beeinflussen können.

4. Der Test wurde entwickelt, um apikale Effekte aufgrund endokriner und nicht-endokriner Mechanismen zu erkennen, und umfasst diagnostische Endpunkte, die teilweise für wichtige endokrine Modalitäten spezifisch sind. Es sollte angemerkt werden, dass es bis zur Entwicklung des LAGDA keinen validierten Test gab, der diese Funktion für Amphibien übernahm.

5. Vor Beginn des Tests ist es wichtig, Informationen über die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfchemikalie zu haben, insbesondere, um die Herstellung stabiler chemischer Lösungen zu gewährleisten. Es ist zudem erforderlich, eine ausreichend sensitive Methode zur Verifizierung der Konzentrationen der Prüfchemikalie zu besitzen. Für den Test sind über eine Dauer von ungefähr 16 Wochen hinweg insgesamt 480 Tiere erforderlich, d. h. *X. laevis*-Embryos (oder 640 Embryos, wenn eine Lösungsmittelkontrolle verwendet wird), um eine ausreichende Aussagekraft des Tests für die Bewertung der populationsrelevanten Endpunkte wie Wachstum, Entwicklung und Geschlechtsreife zu gewährleisten.

6. Bevor die Prüfmethode zum gesetzlich vorgeschriebenen Test eines Gemischs angewendet wird, sollte geprüft werden, ob sie für solche Zwecke geeignete Ergebnisse liefert. Zudem bewertet dieser Test nicht die Fruchtbarkeit direkt, deshalb ist es eventuell auf einer fortgeschritteneren Ebene als Niveau 4 des OECD-Rahmenkonzepts zur Prüfung und Bewertung endokriner Disruptoren nicht anwendbar.

WISSENSCHAFTLICHE BASIS FÜR DIE PRÜFMETHODE

7. Vieles unseres aktuellen Verständnisses der Amphibienbiologie wurde mithilfe der Labormodellspezies *X. laevis erhalten*. Diese Spezies kann regelmäßig im Labor gezüchtet werden, die Ovulation kann mithilfe von humanem Choriongonadotropin (hCG) eingeleitet werden und Tierbesatze sind umgehend von gewerblichen Züchtern verfügbar.

8. Wie bei allen Wirbeltieren unterliegt die Fortpflanzung bei Amphibien der Kontrolle der Hypothalamus/Hypophyse/Gonaden-Achse (HPG) (4). Östrogene und Androgene sind Mediatoren dieses Endokrinsystem und leiten die Entwicklung und Physiologie der sexuell dimorphen Gewebe. Es gibt drei bestimmte Phasen im Lebenszyklus von Amphibien, in denen diese Achse besonders aktiv ist: (1) gonadale Unterscheidung während der larvalen Entwicklung, (2) Entwicklung sekundärer Geschlechtsmerkmale und Gonadenreifung während der Jungtierphase und (3) funktionale Fortpflanzung von adulten Tieren. Jedes dieser drei Entwicklungsfenster ist wahrscheinlich anfällig für Endokrinstörungen aufgrund bestimmter Chemikalien wie Östrogenen und Androgenen, was schließlich zu einem Verlust der reproduktiven Leistungsfähigkeit durch die Organismen führt.

9. Die Gonaden beginnen im NF-Stadium 43 mit der Entwicklung, wenn der bipotenzielle Genitalkamm sich zu entwickeln beginnt. Die Unterscheidung der Gonaden beginnt im NF-Stadium 52, wenn primordiale Keimzellen entweder zu medullärem Gewebe migrieren (Männchen) oder in der kortikalen Region (Weibchen) der sich entwickelnden Gonaden bleiben (3). In den 1950er-Jahren wurde erstmals berichtet, dass dieser Prozess der sexuellen Unterscheidung der Gonaden für eine chemische Veränderung bei *Xenopus* anfällig ist (5) (6). Die Exposition von Larven gegenüber Estradiol während dieses Zeitraums der Gonadenunterscheidung führt zu einer Geschlechtsumkehrung bei Männchen, sodass sie im ausgewachsenen Alter vollständig funktionale Weibchen sind (7) (8). Die funktionale Geschlechtsumkehrung von Weibchen in Männchen ist ebenfalls möglich und wurde nach der Implantation

von Hodengewebe in Larven berichtet (9). Eine Exposition gegenüber einem Aromatasehemmer führt jedoch auch zu einer funktionalen Geschlechtsumkehrung bei *X. tropicalis* (10); es wurde nicht gezeigt, dass dies auch bei *X. laevis* auftritt. Historisch gesehen wurden giftige Wirkungen auf die gonadale Unterscheidung durch die histologische Untersuchung der Gonaden bei Metamorphose bewertet und die Geschlechtsumkehrung konnte nur anhand einer Analyse der Geschlechterverhältnisse bestimmt werden. Bis vor Kurzem gab es kein Mittel zur direkten Bestimmung des genetischen Geschlechts von *Xenopus*. Jedoch ermöglichte die kürzliche Einführung von geschlechtsbezogenen Markern bei *X. laevis* die Bestimmung des genetischen Geschlechts sowie die direkte Identifizierung der Tiere mit umgekehrtem Geschlecht (11).

10. Bei Männchen wird die Jungtierentwicklung fortgesetzt, während sich die Blutspiegel von Testosteron in Übereinstimmung mit der Entwicklung der sekundären Geschlechtsmerkmale sowie der Entwicklung der Hoden erhöhen. Bei Weibchen wird Estradiol von den Eierstöcken produziert, was zu einem Auftreten von Vitellogenin (VTG) in vitellogenen Eizellen in den Eierstöcken und der Entwicklung von Eileitern führt (12). Eileiter sind sekundäre Geschlechtsmerkmale der Weibchen, die während der Fortpflanzung in der Eizellenreifung fungieren. Eihüllen werden auf die Außenseite der Eizellen aufgetragen, während diese durch den Eileiter wandern, sich im Eibeutel sammeln und bereit für die Befruchtung sind. Die Eileiterentwicklung scheint durch Östrogene geregelt zu sein, während die Entwicklung mit dem Estradiolspiegel im Blut bei *X. laevis* (13) und *X. tropicalis* korreliert (12). Die Entwicklung von Eileitern bei Männchen nach der Exposition gegenüber polychlorierten Biphenyl-Verbundstoffen (14) und 4-*tert*-Octylphenol (15) wurde berichtet.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

11. Das Testdesign umfasst die Exposition von *X. laevis*-Embryos im NF-Stadium 8–10 gegenüber vier verschiedenen Konzentrationen an Prüfchemikalien über den Wasserweg sowie Kontrollen bis 10 Wochen nach der medianen Zeit zum NF-Stadium 62 bei der Kontrolle mit einer zwischenzeitlichen Teilstichprobe im NF-Stadium 62. Während es möglich sein kann, höchst hydrophobische Chemikalien über die Zuleitung zu dosieren, gab es bisher nur wenig Erfahrung bei der Verwendung dieses Expositionswegs in diesem Test. Es gibt vier Replikate in jeder Prüfkonzentration mit acht Replikaten für jede verwendete Kontrolle. Im Laufe der Exposition bewertete Endpunkte umfassen diejenigen, die die verallgemeinerte Toxizität angeben: Bestimmung von Mortalität, abnormalem Verhalten und Wachstum (Länge und Gewicht), sowie Endpunkte, die entwickelt wurden, um die spezifischen Wirkweisen der endokrinen Toxizität zu charakterisieren, die auf Östrogen, Androgen oder über die Schilddrüse vermittelte physiologische Prozesse abzielen (d. h. Histopathologie der Schilddrüse, Histopathologie der Gonaden und Gonadengänge, abnormale Entwicklung, Plasma-Vitellogenin (optional) und genotypische/phänotypische Geschlechtsverhältnisse).

TESTVALIDITÄTSKRITERIEN

12. Es gelten die folgenden Kriterien für die Testvalidität:

— Die Konzentration des gelösten Sauerstoffs sollte während der gesamten Prüfdauer ≥ 40 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts betragen;

— die Wassertemperatur sollte im Bereich von 21 ± 1 °C liegen und das Inter-Replikat und die Inter-Behandlungsdifferenzen sollten 1,0 °C nicht überschreiten;

— der pH-Wert der Prüflösung sollte zwischen 6,5 und 8,5 gehalten werden und das Inter-Replikate und die Inter-Behandlungsdifferenzen sollten 0,5 nicht überschreiten;

— es muss belegt werden, dass die Konzentrationen der Prüfchemikalie in der Lösung mit einer Toleranz von ± 20 % bezogen auf die gemessenen Mittelwerte aufrechterhalten wurden;

— die Mortalität über die Expositionsdauer hinweg sollte in jedem Replikat in den Kontrollen ≤ 20 % betragen;

— ≥ 70 % Viabilität im Laich, der zum Starten der Studie ausgewählt wurde;

— die mediane Zeit bis zum NF-Stadium 62 der Kontrollen sollte ≤ 45 Tage betragen.

— Das mittlere Gewicht der Prüforganismen sollte im NF-Stadium 62 und bei der Beendigung des Tests bei Kontrollen und Lösungsmittelkontrollen (falls verwendet) 1,0 ± 0,2 bzw. 11,5 ± 3 g erreichen.

13. Obwohl dies kein Validitätskriterium ist, wird empfohlen, dass mindestens drei Behandlungsniveaus mit drei unkompromittierten Replikaten für die Analyse zur Verfügung stehen. Die übermäßige Mortalität, die eine Behandlung umfasst, wird definiert als > 4 Mortalitäten (> 20 %) in 2 oder mehr Replikaten, die nicht durch einen technischen Fehler erklärt werden können. Für die Analysen müssen mindestens drei Behandlungskonzentrationen ohne offensichtlich toxische Wirkung verfügbar sein. Anzeichen einer offensichtlichen Toxizität umfassen insbesondere Treiben an der Oberfläche, Liegen auf dem Beckenboden, umgekehrtes oder unregelmäßige Schwimmen, mangelndes Auftauchen und keine Reaktion auf Reize, morphologische Abnormalitäten (z. B. Gliedmaßenmissbildungen), hämorrhagische Läsionen und Unterleibsödeme.

14. Wird eine Abweichung von den Testvaliditätskriterien beobachtet, sollte geprüft werden, welche Folgen dies für die Zuverlässigkeit der Testergebnisse hat, und diese Abweichungen und Erwägungen sollten in den Prüfbericht aufgenommen werden.

BESCHREIBUNG DER METHODEN

Apparatur

15. Übliche Laborausrüstung und insbesondere die folgenden Geräte:

(a) Temperaturregelung (z. B. Heiz- oder Kühlgeräte, einstellbar auf 21 ± 1 °C);

(b) Thermometer;

(c) binokulares Stereomikroskop und Sezierinstrumente;

(d) Digitalkamera mit einer Auflösung von mindestens 4 Megapixeln und mit Mikroskopfunktion (falls erforderlich);

(e) Analysewaage mit einer Messgenauigkeit von 0,001 mg oder 1 µg;

(f) Messgerät für gelösten Sauerstoff und pH-Messgerät;

(g) Gerät zur Messung der Lichtintensität (Anzeige in lx).

Wasser

Quelle und Qualität

16. Für den Test kann beliebiges vor Ort verfügbares Verdünnungswasser (z. B. Quellwasser oder mit Aktivkohle gefiltertes Leitungswasser) verwendet werden, bei dem *Krallenfrosch-Larven* normal wachsen und sich entwickeln können, und es muss nachgewiesen werden, dass in diesem Wasser ein normales Wachstum stattfinden kann. Da die Wasserqualität je nach Standort von Region zu Region sehr unterschiedlich sein kann, ist die Wasserqualität insbesondere dann zu analysieren, wenn keine historischen Daten über die Verwendbarkeit des Wassers für die Aufzucht von Amphibienlarven verfügbar sind. Das Wasser ist auf Schwermetalle (z. B. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), dominante Anionen und Kationen (z. B. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), Pestizide, den gesamten organischen Kohlenstoff und suspendierte Feststoffe zu untersuchen, bevor die Tests beginnen, und/oder beispielsweise alle sechs Monate, wenn bekannt ist, dass das Wasser qualitativ gesehen relativ konstant ist. Einige chemische Merkmale akzeptablen Verdünnungswassers sind in Anlage 2 aufgeführt.

Jodkonzentration des Prüfwassers

17. Damit die Schilddrüse Schilddrüsenhormone synthetisieren kann, um die normale Metamorphose zu unterstützen, sollte für die Larven im Wasser und im Futter ausreichend Jod verfügbar sein. Gegenwärtig liegen keine empirisch ermittelten Leitlinien für mindestens erforderliche Jodkonzentrationen im Futter oder im Wasser vor, um die ordnungsgemäße Entwicklung zu gewähren. Die Verfügbarkeit von Jod kann jedoch die Reaktionsfähigkeit des Schilddrüsensystems gegenüber den Schilddrüsenwirkstoffen beeinflussen, und es ist bekannt, dass Jod die Grundaktivität der Schilddrüse ändert, was bei der Auswertung der Ergebnisse histopathologischer Untersuchungen der Schilddrüse zu beachten ist. Basierend auf der vorherigen Arbeit wurde die erfolgreiche Leistung des Tests aufgezeigt, wenn die Jodkonzentration des Verdünnungswassers (I^{-}) zwischen 0,5 und 10 µg/l liegt. Idealerweise sollte die minimale Jodkonzentration im Verdünnungswasser während des Tests 0,5 µg/l betragen (als Natrium- oder Kaliumsalz hinzugefügt). Wenn das Prüfwasser aus entionisiertem Wasser rekonstituiert wird, muss Jod in einer Konzentration von mindestens 0,5 µg/l hinzugegeben werden. Die gemessenen Jodkonzentrationen aus dem Prüfwasser (d. h. Verdünnungswasser) und der Zusatz von Jod oder anderen Salzen (wenn verwenden) zum Prüfwasser sollten eingetragen werden. Der Jodgehalt kann ebenfalls in zusätzlich zum Prüfwasser in Lebensmitteln gemessen werden.

Expositionssystem

18. Der Test wurde mit einem Durchflusssystem entwickelt. Bestandteile des Systems, die mit Wasser in Berührung kommen, müssen aus Glas, Edelstahl und/oder anderen chemisch trägen Materialien bestehen. Die Expositionsbecken sollten Glas- oder Edelstahlaquarien sein und das nutzbare Volumen des Beckens sollte zwischen 4,0 und 10,0 l liegen (Mindestwassertiefe von 10 bis 15 cm). Das System sollte für sämtliche Expositionskonzentrationen, eine Kontrolle und eine Lösungsmittelkontrolle ausgelegt sein, wenn erforderlich mit vier Replikaten pro Behandlung und acht in den Kontrollen. Der Durchfluss in die einzelnen Becken muss konstant sein; dabei sind sowohl die Aufrechterhaltung der biologischen Bedingungen als auch die Exposition durch die Chemikalie zu berücksichtigen. Die Durchflussraten sollten angemessen sein (*z. B.* mindestens 5 Beckenumsätze pro Tag), um chemische Konzentrationsrückgänge aufgrund des Stoffwechsels sowohl der in den Aquarien vorhandenen Prüforganismen als auch der aquatischen Mikroorganismen oder der abiotischen Abbauprozesse (Hydrolyse, Photolyse) oder Verlust (Verflüchtigung, Sorption) zu vermeiden. Die Behandlungsbecken sollten einer zufälligen Position im Expositionssystem zugewiesen werden, um die potenziellen Positionseffekte zu reduzieren, einschließlich geringfügiger Abweichungen der Temperatur, Lichtstärke, *usw*. Weitere Informationen zum Aufbau von Durchfluss-Expositionssystemen können dem ASTM Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians (16) entnommen werden.

Chemikalienlieferung: Vorbereitung der Prüflösungen

19. Um Prüflösungen im Expositionssystem herzustellen, sollte die Stammlösung der Prüfchemikalie mit einer geeigneten Pumpe oder einem anderen Gerät in das Expositionssystem dosiert werden. Die Durchflussrate der Stammlösung sollte gemäß der analytischen Bestätigung der Prüflösungen vor der Einleitung der Exposition kalibriert und während des Tests regelmäßig volumetrisch kontrolliert werden. Die Prüflösung sollte in jeder Kammer mit mindestens 5 Volumenerneuerungen/Tag erneuert werden.

20. Die Prüfchemikalie kann je nach physikalisch-chemischen Eigenschaften auf unterschiedliche Weise in das Prüfsystem eingebracht werden. Daher sollten vor dem Test grundlegende Informationen über die Chemikalie, die für die Bestimmung ihrer Prüfbarkeit relevant sind, eingeholt werden. Zu nützlichen Informationen über Prüfchemikalien-spezifischen Eigenschaften zählen Strukturformel, Molekulargewicht, Reinheit, Stabilität in Wasser, die Lichtbeständigkeit, pK_a und K_{ow}, Wasserlöslichkeit (vorzugsweise im Prüfmedium) und Dampfdruck sowie die Ergebnisse eines Tests auf leichte biologische Abbaubarkeit (Prüfmethode C.4 (17) oder Prüfmethode C.29 (18)). Aus der Wasserlöslichkeit und dem Dampfdruck kann die Henry-Konstante berechnet werden, der zu entnehmen ist, ob erhebliche Verluste der Prüfchemikalie aufgrund von Verdampfung zu erwarten sind. Die Durchführung dieses Tests ohne die oben aufgeführten Informationen sollte sorgfältig erwogen werden, da das Studiendesign von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfchemikalie abhängen wird und Testergebnisse ohne diese Daten schwer zu interpretieren oder bedeutungslos sein könnten. Ein zuverlässiges analytisches Verfahren für die Quantifizierung der Prüfchemikalie in den Prüflösungen mit bekannter und dokumentierter Genauigkeit und Nachweisgrenze sollte vorhanden sein. Wasserlösliche Prüfchemikalien können in Aliquoten des Verdünnungswassers in einer Konzentration gelöst werden, mit der die für den Test vorgesehene Zielkonzentration in einem Durchflusssystem erreicht wird. Chemikalien, die bei Raumtemperatur flüssig oder fest und in Wasser mäßig löslich sind, erfordern Flüssig:Flüssig- oder Flüssig:Fest-Sättigungssäulen (z. B. Glaswollensäule) (19). Während es möglich sein kann, äußerst hydrophobische Prüfchemikalien über die Zuleitung zu dosieren, gab es nur wenig Erfahrung bei der Verwendung dieses Expositionswegs in diesem Test.

21. Die Prüflösungen werden durch Verdünnung einer Stammlösung in den gewünschten Konzentrationen zubereitet. Die Stammlösung sollte vorzugsweise durch einfaches Mischen oder Einrühren der Prüfchemikalie in das Verdünnungswasser mit mechanischen Mitteln (z. B. Rührwerk und/oder Ultraschall) hergestellt werden. Zur Herstellung einer Stammlösung in geeigneter Konzentration können Sättigungssäulen/-systeme oder passive Dosierungsmethoden (20) verwendet werden. Vorzugsweise ist ein zweitlösungsmittelfreies Prüfsystem zu verwenden; die Prüfchemikalien haben jedoch unterschiedliche physikalisch-chemische Eigenschaften, die wahrscheinlich unterschiedliche Ansätze bei der chemischen Aufbereitung des Wassers erfordern. Vorzugsweise sollten weder Lösungsmittel noch Träger verwendet werden: (1) bestimmte Lösungsmittel selbst können zu einer Toxizität und/oder unerwünschten oder unerwarteten Reaktionen führen, (2) das Prüfen von Chemikalien über ihrer Wasserlöslichkeit (wie dies oft durch die Verwendung von Lösungsmitteln passieren kann) kann zu ungenauen Bestimmungen der effektiven Konzentrationen führen, (3) die Verwendung von Lösungsmitteln bei längerfristigen Tests kann zur starken Ausprägung eines Biofilms im Zusammenhang mit mikrobieller Aktivität führen, was die Umweltbedingungen sowie die Fähigkeit, Expositionskonzentrationen beizubehalten, beeinträchtigt und (4) in Abwesenheit historischer Daten zeigt, dass das Lösungsmittel das Ergebnis der Studie nicht beeinflusst, die Verwendung von Lösungsmitteln erfordert eine Lösungsmittelkontrollbehandlung, die mit signifikanten Implikationen hinsichtlich des Wohlbefindens der Tiere einhergeht, da zusätzliche Tiere erforderlich sind, um den Test durchzuführen. Bei schwierig zu prüfenden Chemikalien kann ein Lösungsmittel als letztes Mittel eingesetzt werden und es sollte das OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (21) herangezogen werden, um die beste Methode zu bestimmen. Die Wahl des Lösungsmittels wird durch die chemischen Eigenschaften der Prüfchemikalien und die Verfügbarkeit der historischen Kontrolldaten des Lösungsmittels bestimmt. Im Falle eines Mangels der historischen Daten sollte die Eignung vor der Durchführung der definitiven Studie bestimmt werden. Falls diese Verwendung eines Lösungsmittels unvermeidbar ist und eine mikrobielle Aktivität (Bildung eines Biofilms) auftritt, wird während des Tests (mindestens wöchentlich) eine Aufzeichnung/Berichterstattung der Biofilmbildung pro Becken empfohlen. Idealerweise sollte die Lösungsmittelkonzentration bei der Lösungsmittelkontrolle und allen Prüfbehandlungen konstant gehalten werden. Wenn die Konzentration des Lösungsmittels nicht konstant gehalten wird, sollte die höchste Konzentration des Lösungsmittels bei der Prüfbehandlung auch bei der Lösungsmittelkontrolle verwendet werden. In Fällen, bei denen ein Lösungsmittelträger verwendet wird, sollten die maximalen Lösungsmittelkonzentrationen 100 µl/l oder 100 mg/l (21) nicht überschreiten und es wird empfohlen, die Lösungsmittelkonzentration so niedrig wie möglich zu halten (z. B. $\leq$20 µl/l), um potenzielle Effekte des Lösungsmittels auf gemessene Endpunkte zu vermeiden (22).

Versuchstiere

Prüfspezies

22. Die Prüfspezies ist *X. laevis*, da sie: (1) regelmäßig in Laboren auf der ganzen Welt gezüchtet wird (2), einfach über kommerzielle Händler zugänglich sind und (3) das genetische Geschlecht bestimmt werden kann.

Hälterung der adulten Tiere und Zucht

23. Die angemessene Hälterung und Züchtung von *X. laevis* wird in einem normierten Leitfaden beschrieben (23). Unterkunft und Pflege von *X. laevis* werden ebenso in Read (24) beschrieben. Um die Laichreifung zu induzieren, wird drei bis fünf Paaren von adulten weiblichen und männlichen Tieren intraperitoneal humanes Choriongonadotropin (hCG) injiziert. Weibchen und Männchen werden beispielsweise mit ungefähr 800–1 000 IU bzw. 500–800 IU hCG, das in 0,6–0,9 % Kochsalzlösung gelöst wurde, injiziert (oder Frosch-Ringer-Lösung, einem isotonischen

Kochsalz zur Verwendung bei Amphibien). Die Injektionsvolumen sollten ungefähr 10 µl/g Körpergewicht betragen (~1 000 µl). Die Zuchtpaare werden anschließend in großen Becken ohne Störungen unter statischen Bedingungen gehalten, um den Amplexus zu fördern. Die Unterseite der Brutbecken sollte jeweils einen Zwischenboden aus Edelstahlgitter (z. B. Öffnungen von 1,25 cm) enthalten, durch den der Laich auf den Boden des Beckens sinken kann. Frösche, die am späten Nachmittag eine Injektion mit hCG erhalten haben, laichen meist am Vormittag des Folgetages. Nachdem eine hinreichende Anzahl an Eiern abgelegt und befruchtet wurde, sind die adulten Tiere aus den Brutbecken zu nehmen. Die Eier werden dann gesammelt und die Eihüllen mithilfe einer Behandlung mit L-Cystein entfernt (23). Eine 2 %-ige L-Cystein-Lösung sollte vorbereitet und der pH-Wert mit 1 M NaOH auf 8,1 angepasst werden. Diese 21 °C-Lösung wird zu einem 500 ml fassenden Erlenmeyerkolben mit den Eiern eines einzelnen Laichs hinzugefügt und behutsam ein bis zwei Minuten lang geschwenkt und dann 6–8 Mal gründlich mit 21 °C warmem Kulturwasser abgespült. Die Eier werden dann in eine kristallisierende Schale gegeben und auf > 70 % lebensfähig mit minimalen Abnormalitäten bei der bei Embryos stattfindenden Zellteilung festgelegt.

VERSUCHSPLAN

Prüfkonzentrationen

24. Es wird empfohlen, mindestens vier chemische Konzentrationen und angemessene Kontrollen zu verwenden (einschließlich Lösungsmittelkontrollen, falls erforderlich). Allgemein wird eine Konzentrationstrennung (Abstandsfaktor) empfohlen, die 3,2 nicht überschreitet.

25. Für die Zwecke dieses Tests sollten die Ergebnisse aus bestehenden Amphibienstudien sofern möglich bei der Bestimmung der höchsten Prüfkonzentration verwendet werden, um Konzentrationen zu vermeiden, die offensichtlich toxisch sind. Beispielsweise können Informationen aus quantitativen Strukturaktivitätsbeziehungen, Analogien und Daten aus bestehenden Amphibienstudien wie dem Amphibian Metamorphosis Assay, Prüfmethoden C.38 (25) und dem Frog Embryo Teratogenesis Test – *Xenopus* (23) und/oder Fischtests wie Prüfmethoden C.48, C.41 und C.49 (26) (27) (28) zur Einstellung dieser Konzentration beitragen. Vor dem Durchlauf von LAGDA kann eventuell ein Bereichsfindungsexperiment durchgeführt werden. Es wird empfohlen, dass die Bereichsfindungsexposition innerhalb von 24 Stunden nach der Befruchtung eingeleitet und noch 7–14 Tage (oder ggf. länger) fortgesetzt werden und die Testkonzentrationen so eingestellt sind, dass die Intervalle zwischen den Prüfkonzentrationen nicht größer sind als Faktor 10. Die Ergebnisse des Bereichsfindungsexperiments sollten dazu dienen, die höchsten Prüfkonzentrationen im LAGDA einzustellen. Bitte beachten, dass wenn ein Lösungsmittel verwendet werden muss, die Eignung des Lösungsmittels (d. h. ob es einen Einfluss auf das Ergebnis der Studie hat oder nicht) als Teil der Bereichsfindungsstudie bestimmt wird.

Replikate innerhalb der Behandlungsgruppen und Kontrollen

26. Es sollten mindestens vier Replikattanks pro Prüfkonzentration und mindestens acht Replikate für die Kontrollen (und ggf. Lösungsmittelkontrolle) verwendet werden (d. h. die Anzahl der Replikate bei der Kontrolle und einer Lösungsmittelkontrolle sollte zweimal so hoch sein wie die Anzahl der Replikate jeder Behandlungsgruppe, um eine angemessene statistische Aussagekraft zu gewährleisten). Jedes Replikat sollte höchstens 20 Tiere enthalten. Die Mindestanzahl an verarbeiteten Tieren würde 15 betragen (5 für die Teilstichprobe im NF-Stadium 62 und 10 Jungtiere). Es werden jedoch zu jedem Replikat weitere Tiere hinzugefügt, um die Möglichkeit der Mortalität zu berücksichtigen, während die kritische Zahl 15 im Auge behalten wird.

VERFAHREN

Test-Übersicht

27. Der Test wird mit neu abgelaichten Embryos (NF-Stadium 8–10) eingeleitet und bis in die Entwicklung der Jungfische fortgeführt. Tiere werden täglich auf Mortalität und Anzeichen abnormalen Verhaltens untersucht. Im NF-Stadium 62 wird eine larvale Teilstichprobe (bis zu 5 Tiere pro Replikat) gesammelt und es werden verschiedene Endpunkte untersucht (Tabelle 1). Nachdem alle Tiere im NF-Stadium 66, d. h. Abschluss der Metamorphose, erreicht haben (oder nach 70 Tagen ab der Test-Einleitung, was zuerst eintrifft), wird nach dem Zufallsprinzip eine Tötung vorgenommen (aber ohne Teilstichprobennahme), um die Anzahl der Tiere (10 pro Becken) zu reduzieren (siehe Abschnitt 43) und die verbleibenden Tiere fahren bis 10 Wochen nach der medianen Zeit bis NF-Stadium 62 bei der Kontrolle mit der Exposition fort. Bei Beendigung des Tests (Probenahme bei Jungtieren) werden zusätzliche Messungen durchgeführt (Tabelle 1).

Expositionsbedingungen

28. Eine vollständige Zusammenfassung der Prüfparameter findet sich in Anlage 3. Während der Expositionsdauer sollten jeden Tag der gelöste Sauerstoff, die Temperatur und der pH-Wert der Prüflösungen gemessen werden. Leitfähigkeit, Alkalität und Härte werden einmal pro Monat gemessen. Für die Wassertemperatur der Prüflösungen dürfen die Unterschiede zwischen den einzelnen Replikaten und den einzelnen Behandlungen (innerhalb eines Tages) 1,0 °C nicht überschreiten. Außerdem dürfen sich einzelnen Replikate und einzelnen Behandlungen nicht um mehr als 0,5 unterscheiden.

29. Die Expositionsbecken können täglich entleert werden, um ungefressenes Futter und Abfallprodukte zu entsorgen. Dabei muss darauf geachtet werden, dass es nicht zu einer Kreuzkontaminierung der Becken kommt. Belastungen und Traumata für die Tiere sollten auf ein Minimum reduziert werden, insbesondere beim Verschieben und Reinigen von Aquarien sowie bei Änderungen. Stressige Bedingungen/Aktivitäten wie laute und/oder ständige Geräusche, Antippen des Aquariums und Schwingungen im Becken sollten vermieden werden.

Dauer der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie

30. Die Exposition wird mit neu abgelaichten Embryos eingeleitet (NF-Stadium 8–10) und bis zehn Wochen nach der medianen Zeit bis NF-Stadium 62 (≤ 45 Tage ab der Test-Einleitung) bei der Kontrollgruppe fortgesetzt. Allgemein beträgt die Dauer des LAGDA 16 Wochen (maximal 17 Wochen).

Test-Einleitung

31. Für die Test-Einleitung verwendete Elterntiere sollten zuvor schon gezeigt haben, dass sie Nachwuchs produzieren können, dessen genetisches Geschlecht bestimmt werden kann (Anlage 5). Nach dem Ablaichen der Elterntiere werden die Embryos gesammelt, mit Cysteine behandelt, um die Eihülle zu entfernen, und auf Lebensfähigkeit überprüft (23). Die Behandlung mit Cystein ermöglicht es, die Embryos während der Überprüfung zu handhaben, ohne dass sie an Oberflächen kleben bleiben. Die Überprüfung findet unter einem Stereomikroskop mit einer Augentropfenflasche in angemessener Größe statt, um nicht lebensfähige Embryos zu entfernen. Für den Test wird es bevorzugt, einen einzigen Laich mit einer Lebensfähigkeit von mehr als 70 % zu verwenden. Embryos im NF-Stadium 8–10 werden nach dem Zufallsprinzip auf die Expositionsbecken mit einer angemessenen Menge an Verdünnungswasser verteilt, bis jedes Becken 20 Embryos enthält. Beim Umsetzen sind die Embryos sorgfältig zu behandeln, um Stressbelastung während der Behandlung zu minimieren und um Verletzungen zu vermeiden. 96 Stunden nach der Befruchtung sollten die Larven schon die Wassersäule hoch geschwommen sein und sich an die Seiten des Beckens geklammert haben.

Fütterungsregime

32. Das Futter und die Fütterungsrate ändern sich in verschiedenen Lebensstadien von *X. laevis* und dies ist ein äußerst wichtiger Aspekt des LAGDA-Protokolls. Eine übermäßige Fütterung während der Larvenphase führt normalerweise zu einem erhöhten Auftreten und Schweregrad von Skoliose (Anlage 8) und sollte vermieden werden. Dahingegen führt eine unzureichende Fütterung während der Larvenphase zu höchst variablen Entwicklungsraten unter den Kontrollen, was die statistische Aussagekraft potenziell kompromittieren oder die Prüfergebnisse beeinträchtigen könnte. In Anlage 4 ist das empfohlene Futter- und Fütterungsregime für Larven und Jungfische von *X. laevis* in Durchflussbedingungen angegeben, aber Alternativen sind ebenfalls zulässig, solange die Prüforganismen zufriedenstellend wachsen und sich entwickeln. Es musst darauf hingewiesen werden, dass das Futter frei von endokrinwirkenden Stoffen wie Sojamehl sein sollte, wenn endokrinspezifische Endpunkte gemessen werden.

Fütterung der Larven

33. Das empfohlene Larvenfutter besteht aus Startfutter für Regenbogenforellen, *Spirulina*-Algenscheiben und Goldfischchips (z. B., TetraFin®-Flocken, Tetra, Deutschland), die in Kulturwasser (oder Verdünnungswasser) gemischt werden. Dieses Gemisch wird drei Mal täglich an Wochentagen und einmal täglich am Wochenende verabreicht. Die Larven werden außerdem ab Tag 8 nach der Befruchtung zweimal täglich an Wochentagen und einmal täglich am Wochenende mit lebenden Salinenkrebsen, *Artemia* spp., 24 Stunden alte nauplii, gefüttert. Die larvale Fütterung, die in jedem Prüfgefäß konsistent sein sollte, sollte den Versuchstieren ein ordentliches Wachstum und eine gute Entwicklung ermöglichen, um die Reproduzierbarkeit und Übertragbarkeit der Test-Ergebnisse zu gewährleisten: (1) die mediane Zeit bis zum NF-Stadium 62 bei den Kontrollen sollte ≤ 45 Tage betragen und (2) ein mittleres Gewicht innerhalb von 1,0 ± 0,2 g im NF-Stadium 62 bei den Kontrollen wird empfohlen.

Fütterung der Jungfische

34. Sobald die Metamorphose abgeschlossen wurde, besteht das Fütterungsregime aus sinkendem Premium-Froschfutter, z. B. Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, USA) (Anlage 4). Für Fröschlein (frühe Jungfrösche) werden die Pellets kurz in einer Kaffeemühle, einem Mixer oder einem Mörser mit Stößel zerkleinert, um ihre Größe zu reduzieren. Sobald die Jungfrösche große genug sind, um komplette Pellets zu fressen, ist ein Mahlen oder Zerkleinern nicht länger erforderlich. Die Tiere sollten einmal täglich gefüttert werden. Die Fütterung der Jungfrösche sollte ein angemessenes Wachstum und eine gute Entwicklung der Organismen ermöglichen: ein mittleres Gewicht innerhalb von 11,5 ± 3 g bei der Kontrolle der Jungfrösche am Ende des Tests wird empfohlen.

Analytik

35. Vor der Einleitung des Tests sollten die Stabilität der Prüfchemikalie (z. *B.* Löslichkeit, Abbaubarkeit und Flüchtigkeit) und alle erforderlichen analytischen Methoden z. *B.* mithilfe bestehender Informationen oder Kenntnisse etabliert werden. Wenn über Verdünnungswasser dosiert wird, dann wird empfohlen, dass Prüflösungen aus jedem Replikatbecken vor der Einleitung des Tests analysiert werden, um die Systemleistung zu verifizieren. Während der Expositionsdauer werden die Konzentrationen der Prüfchemikalie in angemessenen Intervallen bestimmt, vorzugsweise einmal pro Woche für mindestens ein Replikat in jeder Behandlungsgruppe, wobei jede Woche zwischen Replikaten derselben Behandlungsgruppe abgewechselt wird. Die Ergebnisse sollten auf gemessenen Konzentrationen basieren. Wurde die Konzentration der Chemikalienlösung während des gesamten Tests jedoch zufriedenstellend innerhalb der nominellen Konzentration (± 20 %) gehalten, so können sich die Ergebnisse auf die nominalen oder die gemessenen Werte stützen. Außerdem sollte der Variationskoeffizient (CV) der gemessenen Prüfkonzentrationen über den gesamten Prüfzeitraum hinweg innerhalb einer Behandlung bei 20 % oder weniger in jeder Konzentration gehalten werden. Wenn die gemessenen Konzentrationen nicht innerhalb von 80–120 % der Nennkonzentration bleiben (beispielsweise wenn höchst biologisch abbaubare oder adsorbierende Chemikalien geprüft werden), sollten die Effektkonzentrationen bestimmt und relativ zur arithmetisch gemittelten Konzentration für Durchflusstests ausgedrückt werden.

36. Die Durchflussrate des Verdünnungswassers und der Stammlösung sollte in angemessenen Intervallen (z. *B.* drei Mal pro Woche) während der Expositionsdauer geprüft werden. Im Falle von Chemikalien, die nicht bei manchen oder allen Nennkonzentrationen erkannt werden können (z. *B.* aufgrund eines schnellen Abbaus oder Absorption in den Prüfgefäßen oder durch eine Anhäufung markierter Chemikalien in den Körpern der exponierten Tiere), wird empfohlen, dass die Erneuerungsrate der Prüflösung in jeder Kammer angepasst wird, um die Prüfkonzentrationen so konstant wie möglich zu halten.

Beobachtungen und Endpunktmessungen

37. Die im Laufe der Exposition bewerteten Endpunkte sind diejenigen, die auf Toxizität einschließlich Mortalität, abnormales Verhalten wie klinische Anzeichen einer Erkrankung und/oder allgemeine Toxizität und Wachstumsbestimmungen (Länge und Gewicht) hinweisen, sowie pathologische Endpunkte, die sowohl auf die allgemeine Toxizität als auch auf endokrine Wirkungsweisen reagieren können, die auf Östrogen-, Androgen- oder Schilddrüsen-vermittelte Wege abzielen. Zusätzlich dazu kann die Plasma-VTG-Konzentration optional am Ende des Tests gemessen werden. Die Messung von VTG kann nützlich sein, um die Studienergebnisse im Kontext der endokrinen Mechanismen für vermeintliche EDCs zu verstehen. Die Endpunkte und die Zeitvorgabe für die Messungen werden in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1

Endpunktüberblick über LAGDA

Endpunkte (*)	Täglich	Zwischenprobe-nahme (Probenahme bei Larven)	Testbeendigung (Probenahme bei Jungtieren)
Mortalitäten und Abnormalitäten	X		
Zeit bis zum NF-Stadium 62		X	
Histo(patho)logie (Schilddrüse)		X	
Morphometrik (Wachstum in Gewicht und Länge)		X	X
Leber-somatischer Index (LSI)			X
Genetische/phänotypische Geschlechterverhältnisse			X
Histopathologie (Gonaden, Fortpflanzungsgänge, Niere und Leber)			X
Vitellogenin (VTG) (optional)			X

(*) Alle Endpunkte werden statistisch analysiert.

Mortalität und tägliche Beobachtungen

38. Alle Prüfbecken sind täglich auf tote Tiere zu prüfen und die Anzahl der toten Larven ist zu protokollieren. Bemerkte tote Tiere sind umgehend aus den Becken zu entfernen. Das Entwicklungsstadium der toten Tiere sollte entweder als NF-Vorstadium 58 (Auftreten vor den Vorderbeinen), NF-Stadium 58 bis NF-Stadium 62, NF-Stadium 63 bis NF-Stadium 66 (zwischen NF-Stadium 62 und vollständiger Schwanzabsorption) oder Post-NF-Stadium 66 (nach den Larven) kategorisiert werden. Mortalitäten von mehr als 20 % können auf ungeeignete Prüfbedingungen oder offensichtlich toxische Wirkungen der Prüfchemikalie hindeuten. Die Tiere neigen dazu, während der ersten paar Tage der Entwicklung nach dem Ablaichen und während des metamorphen Höhepunkts am sensibelsten gegenüber nicht chemisch induzierten Mortalitätsereignissen zu sein. Eine solche Mortalität könnte aus den Kontrolldaten ersichtlich sein.

39. Zusätzlich dazu sind Beobachtungen anormalen Verhaltens, deutlich sichtbare Fehlbildungen (*z. B.* Skoliose) oder Läsionen zu vermerken. Beobachtungen von Skoliose sollten gezählt (Auftreten) und hinsichtlich des Schweregrads eingestuft werden (*z. B.* nicht bemerkenswert – NR, minimal – 1, mäßig – 2, schwer – 3; Anlage 8). Es sollten Anstrengungen unternommen werden, um sicherzustellen, dass die Prävalenz der mäßigen und schweren Skoliose (*z. B.* unter 10 % bei den Kontrollen) während der Studie begrenzt wird, obwohl eine höhere Prävalenz von Kontrollabnormalitäten nicht zwingend ein Grund dafür wäre, den Test zu beenden. Normal ist, wenn sich die Larven in der Wassersäule so bewegen, dass sich der Schwanz über dem Kopf befindet, die Schwanzflosse regelmäßig rhythmisch schlägt, die Tiere regelmäßig an die Wasseroberfläche kommen, durch die Kiemen atmen und auf Reize reagieren. Anormal wäre beispielsweise, wenn die Larven auf der Oberfläche treiben, am Boden des Beckens liegen, mit dem Bauch nach oben oder unregelmäßig schwimmen, nicht an die Oberfläche kommen und nicht auf Reize reagieren. Bei Tieren nach der Metamorphose sollten zusätzlich zu den oben genannten abnormalen Verhaltensweisen deutliche Unterschiede bei der Nahrungsaufnahme zwischen Behandlungen aufgezeichnet werden. Erhebliche Fehlbildungen und Läsionen sind etwa morphologische Anomalien (*z. B.* Fehlbildungen der Beine), blutende Läsionen, Ödeme im Unterleib oder durch Bakterien oder Pilze verursachte Infektionen, um nur einige Beispiele zu nennen. Die Erscheinungen von Läsionen auf den Köpfen der Jungtiere, kurz vor den Nasenlöchern, kann ein Anzeichen für unzureichende Feuchtigkeit sein. Die entsprechenden Beobachtungen sind qualitativer Art; sie sind klinischen Anzeichen für Krankheiten/Stressbelastung vergleichbar und in Relation zu den Tieren in den Kontrollen zu sehen. Wenn in den Becken mit der Prüfchemikalie Fehlbildungen oder Läsionen in größerem Umfang und häufiger auftreten als in den Kontrollen, ist dies als Beleg für eine offensichtliche Toxizität zu betrachten.

Larvale Teilstichprobenahme

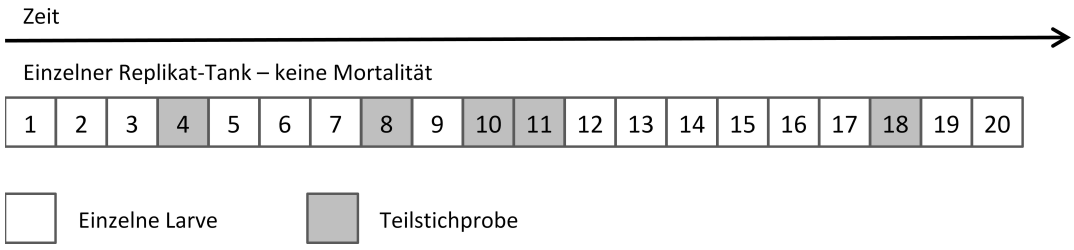
Beschreibung der larvalen Teilstichprobenahme:

40. Die Larven, die NF-Stadium 62 erreicht haben, sollten aus den Becken entfernt und entweder Proben genommen oder die Tiere zum nächsten Teil der Exposition in ein neues Becken gebracht werden, oder sie sollten mithilfe einer Trennwand physikalisch von den anderen Larven im selben Becken getrennt werden. Die Larven werden täglich überprüft und der Studientag, an dem die einzelnen Larven NF-Stadium 62 erreichen, wird aufgezeichnet. Das definierende Merkmal zur Verwendung in dieser Beurteilung ist die Kopfform. Sobald der Kopf so geschrumpft ist, dass er visuell ungefähr die gleiche Breite hat wie der Rumpf der Larve, und die Vorderbeine sich auf der Mitte des Herzens befinden, dann wird davon ausgegangen, dass diese Larve NF-Stadium 62 erreicht hat.

41. Das Ziel besteht darin, eine Probe von insgesamt fünf Larven im NF-Stadium 62 pro Replikatbecken zu nehmen. Dies sollte komplett nach dem Zufallsprinzip geschehen, aber *a priori* entschieden werden. Ein hypothetisches Beispiel eines Replikatbeckens ist in **Abbildung 1** bereitgestellt. Sollte es in einem bestimmten Becken 20 überlebende Larven geben, wenn die ersten Tiere das NF-Stadium 62 erreichen, sollten fünf zufällige Zahlen zwischen 1 und 20 ausgewählt werden. Larve Nr. 1 ist das erste Tier, das NF-Stadium 62 erreicht und Larve Nr. 20 ist das letzte Tier in einem Becken, das NF-Stadium 62 erreicht. Wenn es 18 überlebende Larven in einem Becken gibt, sollten auf dieselbe Weise fünf zufällige Zahlen zwischen 1 und 18 ausgewählt werden. Dies sollte für jedes Replikatbecken durchgeführt werden, wenn das erste Versuchstier NF-Stadium 62 erreicht. Wenn es Mortalitäten während der Probenahme im NF-Stadium 62 gibt, müssen die verbleibenden Proben basierend darauf, wie viele Larven im < NF-Stadium 62 übrig sind und wie viele weitere Proben erforderlich sind, um eine Gesamtanzahl von fünf Proben aus diesem Replikat zu erhalten, erneut randomisiert werden. An dem Tag, an dem eine Larve das NF-Stadium 62 erreicht, wird auf den vorbereiteten Probenahmeplan verwiesen, um zu bestimmen, ob von diesem Tier eine Probe genommen wird oder ob es physikalisch von den verbleibenden Larven für eine weitere Exposition getrennt wird. Im bereitgestellten Beispiel (Abbildung 1) wird das erste Tier, das NF-Stadium 62 erreicht (d. h. Kästchen Nr. 1) physikalisch von den anderen Larven getrennt, weiter exponiert und der Studientag, an dem dieses Tier das NF-Stadium 62 erreicht hat, wird aufgezeichnet. Anschließend werden die Tiere Nr. 2 und 3 auf dieselbe Weise behandelt wie Nr. 1 und von Tier Nr. 4 wird dann eine Probe für das Wachstum und die Histologie der Schilddrüse genommen (laut diesem Beispiel). Dieses Verfahren wird fortgesetzt, bis das 20. Tier entweder zum Rest der Tiere im Post-NF-Stadium 62 darf oder eine Probe davon genommen wird. Das Randomisierungsverfahren muss gewährleisten, dass für alle Tiere die gleiche Auswahlwahrscheinlichkeit gegeben ist. Dies kann mit einem beliebigen Randomisierungsverfahren sichergestellt werden, aber es ist erforderlich, dass jede Larve an einem beliebigen Punkt im NF-Stadium 62 des Teilstichprobenahmezeitraums wieder in das ursprüngliche Becken gesetzt wird.

Abb. 1

Hypothetisches Beispiel eines Probenahmeregimes im NF-Stadium 62 für ein einzelnes Replikatbecken



42. Bei der larvalen Teilstichprobenahme werden folgende Endpunkte ermittelt: (1) Zeit bis NF-Stadium 62 (d. h. Anzahl an Tagen zwischen Befruchtung und NF-Stadium 62), (2) äußere Abnormalitäten, (3) Morphometrik (z. B. Gewicht und Länge) und (4) Histologie der Schilddrüse.

Schmerzfreies Töten von Larven

43. Die Teilstichprobe von Larven im NF-Stadium 62 (5 Tiere pro Replikat) sollte getötet werden, indem sie 30 Minuten lang in angemessene Mengen (z. B. 500 ml) einer Anästhetikumlösung getaucht werden (z. B. 0,3 % Lösung von MS-222, Tricainmethansulphonat, CAS.886-86-2). Die MS-222-Lösung sollte mit Natriumbicarbonat auf einen pH-Wert von ungefähr 7,0 gepuffert werden, da ungepufferte MS-222-Lösung sauer ist und die Froschhaut reizt, was zu einer schlechten Absorption und unnötigem zusätzlichen Stress für die Organismen führt.

44. Mithilfe eines Maschentauchnetzes wird eine Larve aus der Versuchskammer entfernt und in die Euthanasielösung transportiert (gelegt). Das Tier wird ordnungsgemäß getötet und ist für die Nekropsie bereit, wenn es nicht mehr auf äußere Reize reagiert, wie beispielsweise das Zwicken der Hinterbeine mit einer Pinzette.

Morphometrik (Gewicht und Länge)

45. Die Messungen des Nassgewichts (auf mg genau) und Kopf-Rumpf-Länge (SVL) (auf 0,1 mm genau) sollten für jede Larve sofort dann durchgeführt werden, wenn sie aufgrund der Betäubung nicht mehr reagieren (Abbildung 2a). Eine Bildgebungsanalysesoftware kann verwendet werden, um die SVL auf einem Foto zu messen. Die Larven sollten vor dem Wiegen trocken getupft werden, um überschüssiges anhaftendes Wasser zu entfernen. Nach den Messungen der Körpergröße (Gewicht und SVL) sollten deutliche morphologische Abnormalitäten und/oder klinische Anzeichen einer Toxizität, wie beispielsweise Skoliose (siehe Anlage 8), Petechien und Hämorrhoiden aufgezeichnet oder notiert werden und eine digitale Dokumentation wird empfohlen. Beachten Sie, dass Petechien kleine rote oder lila Blutungen in den Hautkapillaren sind.

Gewebegewinnung und -fixierung

46. Bei der larvalen Teilstichprobe wird die Schilddrüse für die Histologie bewertet. Der untere Torso vor den Vorderbeinen wird entfernt und entsorgt. Der beschnittene Kadaver wird in einer Davidson-Fixierlösung befestigt. Das Volumen der Fixierlösung im Gefäß sollte mindestens 10 Mal so viel betragen wie das ungefähre Volumen der Gewebe. Die Fixierlösung sollte entsprechend bewegt und gedreht werden, um die Gewebe von Interesse angemessen zu fixieren. Sämtliche Gewebe bleiben mindestens 48 Stunden lang in der Davidson-Fixierlösung, jedoch nicht länger als 96 Stunden, zu welchem Zeitpunkt sie in deionisiertem Wasser ausgespült und in 10 % neutral gepuffertem Formalin gelagert werden (1) (29).

Histologie der Schilddrüse

47. Jede larvale Teilstichprobe (fixiertes Gewebe) wird histologisch hinsichtlich der Schilddrüse beurteilt, d. h. Diagnose und Schweregradeinstufung (29) (30).

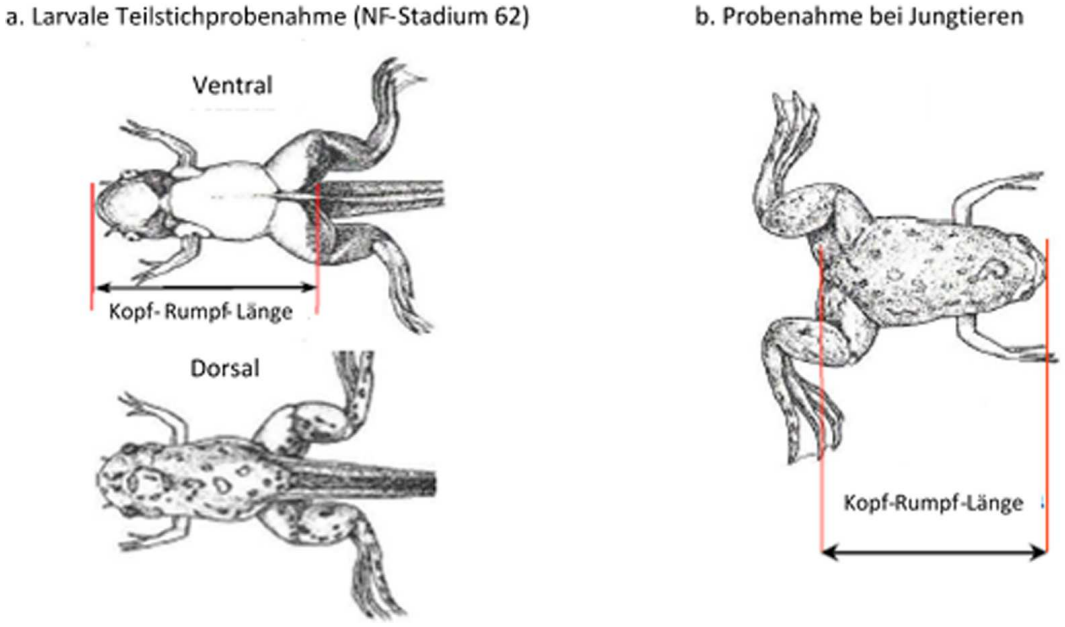


Abbildung 2: Orientierungspunkte für die Messung der Kopf-Rumpf-Länge für den LAGDA in NF-Stadium 62 (a) und bei Jungfröschen (b). Die definierenden Merkmale des NF-Stadiums 62 (a): der Kopf hat dieselbe Länge wie der Rumpf, die Länge des Riechnervs ist kürzer als der Durchmesser des Riechkolbens (dorsale Ansicht) und die Vorderbeine sind auf deiner Ebene mit dem Herzen (ventrale Ansicht). Die Bilder sind von Nieuwkoop und Faber (1994) übernommen.

Ende der Larvenexposition

48. Angesichts der ursprünglichen Anzahl an Larven wird erwartet, dass sich ein kleiner Prozentsatz an Tieren nicht normal entwickelt und die Metamorphose (NF-Stadium 66) nicht innerhalb eines vernünftigen Zeitrahmens abschließt. Der larvale Anteil der Exposition sollte 70 Tage nicht überschreiten. Larven, die am Ende dieses Zeitraums übrig sind, sollten getötet (siehe Abschn. 43), ihr Nassgewicht und ihre SVL gemessen und gemäß Nieuwkoop und Faber, 1994, arrangiert und entwicklungstechnische Abnormalitäten notiert werden.

Tötung der Tiere nach NF-Stadium 66

49. Zehn Tiere pro Tank sollten von NF-Stadium 66 (vollständige Schwanzresorption) bis zum Ende der Exposition erhalten bleiben. Deshalb sollte eine Massentötung stattfinden, nachdem alle Tiere NF-Stadium 66 erreicht haben, oder nach 70 Tagen (was zuerst eintritt). Tiere nach NF-Stadium 66, die nicht weiter exponiert werden, sollten per Zufallsprinzip ausgewählt werden.

50. Tiere, die nicht für eine weitere Exposition ausgewählt werden, werden getötet (siehe Abschn. 43). Für jedes Tier werden Messungen des Entwicklungsstadiums, des Nassgewichts und der SVL (Abbildung 2b) sowie eine grobe Nekropsie durchgeführt. Das phänotypische Geschlecht (basierend auf der Morphologie der Gonaden) wird als weiblich, männlich oder unbestimmt notiert.

Probenahme bei Jungfischen

Beschreibung der Probenahme bei Jungfischen

51. Die verbleibenden Tiere werden bis 10 Wochen nach der medianen Zeit bis zum NF-Stadium 62 in der Verdünnungswasserkontrolle (und/oder Lösungsmittelkontrolle, wenn relevant) weiter exponiert. Am Ende der Expositionsdauer werden die verbleibenden Tiere (maximal 10 Frösche pro Replikat) getötet und die verschiedenen Endpunkte werden gemessen oder bewertet und aufgezeichnet: (1) Morphometrik (Gewicht und Länge), (2) phänotypische/genotypische Geschlechtsverhältnisse, (3) Lebergewicht (Leber-somatischer Index), (4) Histopathologie (Gonaden, Fortpflanzungsgänge, Leber und Niere) und optional (5) Plasma-VTG.

Schmerzfreies Töten von Fröschen

52. Die Jungfroschproben, Frösche nach der Metamorphose, werden durch eine intraperitoneale Injektion eines Anästhetikums, z. *B.* 10 % MS-222 in einer angemessenen mit Phosphat gepufferten Lösung, getötet. Es können Proben von Fröschen genommen werden, nachdem diese reaktionslos wurden (normalerweise ungefähr 2 Minuten nach der Injektion, wenn 10 % MS-222 in einer Dosierung von 0,01 ml pro g Frosch verwendet wird). Während die Jungfrösche in ein Anästhetikum mit einer höheren Konzentration getaucht werden könnten (MS-222), hat die Erfahrung gezeigt, dass es mit dieser Methode länger dauert, sie zu betäuben und die Dauer nicht angemessen ist, um eine Probenahme zu ermöglichen. Die Injektion bietet eine effiziente und schnelle Tötung vor der Probenahme. Mit der Probenahme darf erst begonnen werden, wenn die mangelnde Reaktionsfähigkeit der Frösche bestätigt wurde, um sicherzustellen, dass die Tiere tot sind. Wenn die Frösche Anzeichen dafür zeigen, dass sie ziemlich leiden (sehr schwer und der Tod kann zuverlässig vorausgesagt werden) und sie als sterbend angesehen werden, dann sollten die Tiere betäubt und getötet und für die Datenanalyse als Mortalität behandelt werden. Wenn ein Frosch aufgrund von Morbidität getötet wird, sollte dies notiert und gemeldet werden. Je nachdem, wann der Frosch während der Studie getötet wurde, kann er für eine histopathologische Analyse behalten werden (Fixierung des Frosches für mögliche Histopathologie).

Morphometrik (Gewicht und Länge)

53. Die Messungen von Nassgewicht und SVL (Abbildung 2b) sind identisch zu denen, die für die larvale Teilstichprobenahme beschrieben wurden.

Plasma-VTG (Option)

54. VTG ist ein weit akzeptierter Biomarker, der aus der Exposition gegenüber östrogenen Chemikalien entsteht. Für den LAGDA kann Plasma-VTG optional innerhalb der Proben von Jungfröschen gemessen werden (dies kann besonders relevant sein, wenn von der Prüfchemikalie angenommen wird, dass sie ein Östrogen ist).

55. Die Hinterbeine des getöteten Jungfrosches werden aufgeschnitten und das Blut mit einer heparinisierten Kapillare gesammelt (obwohl sich alternative Methoden zum Sammeln von Blut, wie beispielsweise eine Herzpunktur, auch eignen können). Das Blut wird in ein Mikrozentrifugenröhrchen (z. *B.* 1,5 ml Volumen) gegeben und zentrifugiert, um Plasma zu erhalten. Die Plasmaproben sollten bis zur VTG-Bestimmung bei -70 °C oder weniger gelagert werden. Die Plasma-VTG-Konzentration kann über die Methode eines Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Anlage 6) oder über eine alternative Methode wie die Massenspektrometrie gemessen werden (31). Die für die Spezies spezifischen Antikörper werden aufgrund ihrer höheren Sensitivität bevorzugt.

Bestimmung des genetischen Geschlechts

56. Das genetische Geschlecht jedes Jungfrosches wird auf der Grundlage der von Yoshimoto *et al*. entwickelten Marker bewertet. (11). Um das genetische Geschlecht zu bestimmen, wird (das ganze oder) ein Teil des Hinterbeins (oder anderes Gewebe) bei der Sezierung gesammelt und in einem Mikrozentrifugenröhrchen gelagert (Gewebeproben von Fröschen können aus allen Gewebearten entnommen werden). Gewebe kann bis zur Isolierung der Desoxyribonukleinsäure (DNS) bei -20 °C oder weniger gelagert werden. Die Isolierung der DNS aus Geweben kann mit im Handel erhältlichen Kits vorgenommen werden und die Analyse auf Vorhandensein oder Fehlen des Markers wird durch eine Polymerase-Kettenreaktionsmethode (PCR) durchgeführt (Anlage 5). Allgemein beträgt die Konkordanz zwischen dem histologischen Geschlecht und dem Genotyp unter den Kontrolltieren zum Zeitpunkt der Probenahme bei Jungfröschen in der Kontrollgruppe mehr als 95 %.

Gewebegewinnung und -fixierung für die Histopathologie

57. Gonaden, Fortpflanzungsgänge, Nieren und Lebern werden bei der endgültigen Probenahme für die histologische Analyse gesammelt. Die Bauchhöhle wird geöffnet und die Leber wird seziert und gewogen. Dann werden die Verdauungsorgane (*z. B.* Magen, Darm) vorsichtig aus dem Unterleib entfernt, um die Gonaden, die Nieren und die Fortpflanzungsgänge freizulegen. Deutliche morphologische Abnormalitäten der Gonaden sollten notiert werden. Schließlich sollten die Hinterbeine entfernt werden, wenn sie nicht bereits zuvor zum Sammeln von Blut entfernt wurden. Gesammelte Lebern und der Kadaver mit den Gonaden *in situ* sollte umgehend in die Davidson-Fixierlösung gelegt werden. Das Volumen der Fixierlösung im Gefäß sollte mindestens 10 Mal so viel betragen wie das ungefähre Volumen der Gewebe. Sämtliche Gewebe bleiben mindestens 48 Stunden lang in der Davidson-Fixierlösung, jedoch nicht länger als 96 Stunden, zu welchem Zeitpunkt sie in deionisiertem Wasser ausgespült und in 10 % neutral gepuffertem Formalin gelagert werden (1) (29).

Histopathologie

58. Jede Probenahme bei Jungfröschen wird histologisch für die Pathologie in den Gonaden, den Fortpflanzungsgängen, den Nieren und dem Lebergewebe, d. h. Diagnose und Schweregradeinstufung, bewertet (32). Der Gonadenphänotyp wird ebenfalls aus dieser Bewertung abgeleitet (*z. B.* Ovarien, Hoden, Intersexualiät), und zusammen mit individuellen genetischen Geschlechtsmessungen können diese Beobachtungen verwendet werden, um die Phänotypischen/genotypischen Geschlechterverhältnisse zu berechnen.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Statistische Analyse

59. Der LAGDA erzeugt drei Arten von Daten, die statistisch analysiert werden müssen: (1) quantitative kontinuierliche Daten (Gewicht, SVL, LSI, VTG), (2) Zeit-bis-zum-Ereignis-Daten für Entwicklungsraten (d. h. Tage bis NF-Stadium 62 von der Test-Einleitung) und (3) ordinale Daten in Form der Schweregrade oder Entwicklungsstadien aus Histopathologiebewertungen.

60. Der Testplan und die gewählte Statistikmethode sollten eine ausreichende statistische Aussagekraft besitzen, damit Änderungen von biologischer Bedeutung bei den Endpunkten erkannt werden können, für die eine NOEC oder ECx anzugeben ist. Statistische Datenanalysen (allgemein auf mittlerer Replikatbasis) sollten nach den Verfahren im Dokument ‚Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application' (33) durchgeführt werden. Anlage 7 dieser Prüfmethode bietet den empfohlenen Entscheidungsbaum der statistischen Analyse und Hilfestellungen für die Behandlung der Daten und bei der Wahl des geeignetsten statistischen Tests oder Modells, die im LAGDA verwendet werden sollten.

61. Die Daten aus den Proben der Jungfrösche (*z. B.* Wachstum, LSI) sollten für jedes genotypische Geschlecht separat analysiert werden, da das genotypische Geschlecht für alle Frösche bestimmt wird.

Erwägungen zur Datenanalyse

Verwendung von kompromittierten Replikaten und Behandlungen

62. Replikate und Behandlungen können aufgrund einer übermäßigen Mortalität aus einer offensichtlichen Toxizität, Erkrankung oder einem technischen Fehler kompromittiert werden. Wenn eine Behandlung aufgrund einer Erkrankung oder eines technischen Fehlers kompromittiert ist, sollten drei nicht kompromittierte Behandlungen mit drei nicht kompromittierten Replikaten für die Analyse verfügbar sein. Wenn bei hohen Behandlungen eine offensichtliche Toxizität auftritt, wird es bevorzugt, dass mindestens drei Behandlungsniveaus mit drei nicht kompromittierten Replikaten für die Analyse zur Verfügung stehen (konsistent mit dem Ansatz der maximal tolerierten Konzentration für OECD-Testrichtlinien (34)). Zusätzlich zur Mortalität können im Qualitätsvergleich mit den Kontrolltieren Anzeichen einer offensichtlichen Toxizität Auswirkungen auf das Verhalten (z. B. Treiben auf der Oberfläche, Liegen auf dem Beckenboden, umgekehrtes oder unregelmäßiges Schwimmen, mangelndes Auftauchen), morphologische Läsionen (z. B. hämorrhagische Läsionen, Unterleibsödeme) oder die Hemmung normaler Fütterungsreaktionen umfassen.

Lösungsmittelkontrolle

63. Bei Ende des Tests werden die potenziellen Wirkungen des Lösungsmittels (falls vorhanden) bestimmt. Dazu wird ein statistischer Vergleich der Kontrollgruppe mit dem Lösungsmittel und der Kontrollgruppe mit dem Verdünnungswasser vorgenommen. Die wichtigsten Endpunkte für diese Analyse sind Wachstumsdeterminanten (Masse und Länge), da diese Parameter auch durch allgemein wirkende Toxizität beeinträchtigt werden können. Wenn statistisch signifikante Unterschiede in diesen Endpunkten zwischen der Verdünnungswasserkontrolle und den Lösungsmittelkontrollgruppen erkannt werden, sollte das beste fachliche Urteilsvermögen angewandt werden, um zu bestimmen, ob die Validität des Tests kompromittiert ist. Wenn die zwei Kontrollen sich unterscheiden, sollten die den Chemikalien ausgesetzten Behandlungen mit der Lösungsmittelkontrolle verglichen werden, außer es ist bekannt, dass der Vergleich mit der Verdünnungswasserkontrolle bevorzugt wird. Wenn es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den zwei Kontrollgruppen gibt, wird empfohlen, dass die den Prüfchemikalien ausgesetzten Behandlungen mit den gepoolten verglichen werden (Lösungsmittel- und Verdünnungswasserkontrollgruppen), außer es ist bekannt, dass der Vergleich mit der Verdünnungswasser- oder der Lösungsmittelkontrollgruppe bevorzugt wird.

Prüfbericht

64. Der Prüfbericht sollte Folgendes enthalten:

Prüfchemikalie:

— Physikalischer Zustand und, soweit relevant, physikalisch-chemische Eigenschaften;

— Einkomponentiger Stoff:

physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;

chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar usw. (einschließlich des Gehalts an organischem Kohlenstoff, falls zutreffend).

— Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:

so weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

Geprüfte Fischart:

— wissenschaftliche Bezeichnung, ggf. Stamm, Herkunft und Art der Sammlung der befruchteten Eier sowie anschließende Handhabung.

— Auftreten von Skoliose in historischen Kontrollen für die verwendete Stammkultur.

Prüfbedingungen:

— Photoperiode(n);

— Testdesign (z. *B.* Kammerngröße, Material- und Wasservolumen, Anzahl an Prüfkammern und Replikaten, Anzahl an Prüforganismen pro Replikat);

— Methode zur Herstellung von Stammlösungen und Häufigkeit der Erneuerung (falls verwendet, sind der Lösungsvermittler und seine Konzentration anzugeben);

— Methode zur Dosierung der Prüfchemikalie (z. *B.* Pumpen, Verdünnungssysteme);

— Wiederfindungsrate der Methode und nominelle Prüfkonzentrationen, Bestimmungsgrenze, Mittel der gemessenen Werte mit ihren Standardabweichungen in den Prüfgefäßen sowie das Verfahren, durch das diese ermittelt wurden, sowie Nachweise dafür, dass sich die Messungen auf die Konzentrationen der Prüfchemikalie in echter Lösung beziehen;

— Eigenschaften des Verdünnungswassers: pH-Wert, Härte, Temperatur, Konzentration des gelösten Sauerstoffs, Restchlor (falls gemessen), Gesamtgehalt von Jod, gesamter organischer Kohlenstoff (falls gemessen), Schwebstoffe (falls gemessen), Salzgehalt des Prüfmediums (falls gemessen) sowie alle sonstigen durchgeführten Messungen;

— die nominalen Prüfkonzentrationen, die Mittelwerte der gemessenen Werte und ihre Standardabweichungen;

— Wasserqualität innerhalb der Prüfgefäße, pH-Wert, Temperatur (täglich) und Konzentration des gelösten Sauerstoffs;

— ausführliche Angaben zur Fütterung (z. B. Art des Futters, Herkunft, Fütterungsmenge und -häufigkeit).

Ergebnisse:

— Belege dafür, dass die Kontrollen die Validitätskriterien erfüllt haben;

— Die Daten für die Kontrolle (und Lösungsmittelkontrolle, falls verwendet) und die Behandlungsgruppen lauten wie folgt: beobachtete Mortalität und Abnormalität, Zeit bis NF-Stadium 62, Beurteilung der Schilddrüsenhistologie (nur larvale Probenahme), Wachstum (Gewicht und Länge), LSI (nur Probenahme bei Jungtieren), genetische/phänotypische Geschlechtsverhältnisses (nur Probenahme bei Jungtieren), Ergebnisse der Histopathologiebewertung für Gonaden, Fortpflanzungsgänge, Niere und Leber (nur Probenahme bei Jungtieren) und Plasma-VTG (nur Probenahme bei Jungtieren, wenn durchgeführt);

— Ansatz der statistischen Analyse und Auswertung der Daten (angewandter statistischer Test oder angewandtes Modell);

— NOEC (No Observed Effect Concentration) für jede bewertete Wirkung;

— LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) für jede bewertete Wirkung (bei $\alpha = 0{,}05$); ECx für jede bewertete Wirkung, falls zutreffend, und Konfidenzintervalle (z. B. 95 %) und ein Diagramm des angepassten Modells, das für deren Berechnung benutzt wurde, die Steigung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve, die Formel des Regressionsmodells, die geschätzten Modellparameter und deren Standardfehler.

— Abweichungen von der Prüfmethode und Abweichungen von den Akzeptanzkriterien und Erwägungen der potenziellen Folgen hinsichtlich des Testergebnisses.

65. Für die Ergebnisse der Endpunktmessungen sollten die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen (auf Replikat- und Konzentrationsbasis, falls möglich) präsentiert werden.

66. Die mediane Zeit zum NF-Stadium 62 bei Kontrollen sollte berechnet und als Mittelwert der Mediane der Replikate und ihrer Standardabweichungen präsentiert werden. Auf die gleiche Weise sollte bei Behandlungen ein Behandlungsmedian berechnet und als Mittelwert der Mediane der Replikate und ihrer Standardabweichungen präsentiert werden.

LITERATURHINWEISE

(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 und Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.

(4) Kloas W und Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1 130: 16–27.

(5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140–144.

(6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1 565.

(7) Villalpando I und 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 und Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335–340.

(9) Mikamo K und Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.

(10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K und 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 und 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 und 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 und 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 und 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 und 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) Chapter C.4 of this Annex, Ready Biodegradability Test.

(18) Chapter C.29 of this Annex, Ready Biodegradability - CO2 in sealed vessels (Headspace Test).

(19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL und 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 und 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 ff.

(25) Chapter C.38 of this Annex, Amphibian Metamorphosis Assay.

(26) Chapter C.48 of this Annex, Fish Short Term Reproduction Assay.

(27) Chapter C.41 of this Annex, Fish Sexual Development Test.

(28) Chapter C.49 of this Annex, Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.

(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 und Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415–424.

(31) Luna LG und 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.

Anlage 1

DEFINITIONEN

Apikaler Endpunkt: Auslösen einer Wirkung auf Populationsebene.

Chemikalie: Stoff oder Gemisch

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ECx: (Konzentration mit einer Wirkung von x %) Konzentration, bei der innerhalb einer bestimmten Expositionsdauer im Vergleich zur Kontrolle eine Wirkung von x % auf die Prüforganismen zu verzeichnen ist. Eine EC50 beispielsweise ist die Konzentration, bei der davon ausgegangen wird, dass sie bei 50 % einer exponierten Population während einer bestimmten Expositionsdauer eine Wirkung auf einen Endpunkt im Test hat.

dpf: Tage nach der Befruchtung

Durchflussprüfung: Eine Prüfung mit durchgehender Strömung der Testlösungen durch das Prüfsystem während der Expositionsdauer.

HPG-Achse: Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.

Die niedrigste geprüfte Konzentration (LOEC): einer Prüfchemikalie, bei der sich im Vergleich zur Kontrolle eine statistisch signifikante Wirkung beobachten lässt (bei $p < 0{,}05$). Alle Prüfkonzentrationen oberhalb der LOEC müssen jedoch eine schädigende Wirkung haben, die gleich den bei der LOEC beobachteten Wirkungen oder größer als diese ist. Können diese beiden Bedingungen nicht erfüllt werden, muss ausführlich erklärt werden, wie die LOEC (und damit auch die NOEC) ausgewählt wurde. Anlage 7 bietet Hilfestellungen.

Median Lethal Concentration (LC50): ist die Konzentration einer Prüfchemikalie, die schätzungsweise auf 50 % der Prüforganismen während der Prüfdauer letal wirkt.

No observed effect concentration (NOEC): ist die Prüfkonzentration unmittelbar unterhalb der LOEC, die im Vergleich zur Kontrolle innerhalb eines angegebenen Expositionszeitraums keine statistisch signifikante Wirkung ($p < 005$) hat.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der bzw. das nach dieser Prüfmethode getestet wird.

UVCB: Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

VTG: Vitellogenin ist ein Phospholipoglycoprotein-Vorläufer für Eidotterprotein, das in der Regel bei geschlechtlich aktiven weiblichen Tieren aller eierlegenden Arten vorkommt.

Anlage 2

CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN EINES GEEIGNETEN VERDÜNNUNGSWASSSERS

Stoff	Höchstkonzen-tration
Partikel	5 mg/l
Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff	2 mg/l
Nicht ionisierter Ammoniak	1 µg/l
Restchlor	10 µg/l
Gesamtgehalt an phosphororganischen Pestiziden	50 ng/l
Gesamtgehalt an chlororganischen Pestiziden plus polychlorierten Biphenylen	50 ng/l
Gesamtgehalt an organischem Chlor	25 ng/l
Aluminium	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Chrom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Kupfer	1 µg/l
Eisen	1 µg/l
Blei	1 µg/l
Nickel	1 µg/l
Zink	1 µg/l
Cadmium	100 ng/l
Quecksilber	100 ng/l
Silber	100 ng/l

Anlage 3

PRÜFBEDINGUNGEN FÜR LAGDA

1.	Prüfspezies	*Xenopus laevis*
2.	Testtyp	Kontinuierlicher Durchfluss,
3.	Wassertemperatur	Die nominale Temperatur beträgt 21 °C. Die mittlere Temperatur über die Testdauer hinweg beträgt 21 ± 1 °C (die einzelnen Replikate und die einzelnen Behandlungen sollten sich nicht um mehr als 1,0 °C unterscheiden)
4.	Beleuchtungsqualität	Leuchtstofflampen (breites Spektrum) 600–2000 lux (Lumen/m^2) an der Wasseroberfläche
5.	Photoperiode	12 Std. Licht, 12 Std. Dunkelheit
6.	Prüflösungsvolumen und Prüfgefäß (Becken)	4–10 l (mindestens 10–15 cm Wassertiefe) Glas- oder Edelstahlbecken
7.	Erneuerung der Prüflösungen	Konstant, unter Berücksichtigung der Aufrechterhaltung der biologischen Bedingungen als auch der Exposition durch die Chemikalie (*z. B.* 5 Tankvolumenerneuerung pro Tag).
8.	Alter der Prüforganismen bei Einleitung	Nieuwkoop und Faber (NF), Stadium 8–10
9.	Anzahl der Organismen pro Replikat	20 Tiere (Embryos)/Becken (Replikat) bei Einleitung der Exposition und 10 Tiere (Jungtiere)/Becken (Replikat) nach NF-Stadium 66 bis zur Beendigung der Exposition
10.	Anzahl der Behandlungen	Mindestens 4 Prüfchemikalien plus angemessene Kontrolle(n)
11.	Anzahl der Replikate pro Behandlung	4 Replikate pro Behandlung für die Prüfchemikalie und 8 Replikate für die Kontrolle(n)
12.	Anzahl der Organismen pro Prüfkonzentration	Mindestens 80 Tiere pro Behandlung für die Prüfchemikalie und mindestens 160 Tiere für die Kontrolle(n)
13.	Verdünnungswasser	Beliebiges vor Ort verfügbares Wasser, bei dem *Krallenfrosch-Larven* normal wachsen und sich entwickeln (*z. B.* Quellwasser oder mit Aktivkohle gefiltertes Leitungswasser)
14.	Belüftung	Keine erforderlich, aber eine Belüftung der Becken kann erforderlich sein, wenn die Niveaus des gelösten Sauerstoffs unter die empfohlenen Grenzwerte fällt und die Steigerungen des Durchflusses der Prüflösung maximiert werden.
15.	Gelöster Sauerstoff der Prüflösung	Gelöster Sauerstoff: ≥ 40 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts oder ≥ 3,5 mg/l

16. pH-Wert der Prüflösung	6.5–8.5 (die einzelnen Replikate/Konzentrationen dürfen sich höchstens um 0,5 unterscheiden)
17. Härte und Alkalität der Prüflösung	10–250 mg $CaCO_3$/l
18. Fütterungsregime	(siehe Anlage 4)
19. Expositionsdauer	Von NF-Stadium 8–10 bis zehn Wochen nach der medianen Zeit bis NF-Stadium 62 in Wasser und/oder Lösungsmittelkontrollgruppe (maximal 17 Wochen)
20. Biologische Endpunkte	Mortalität (und abnormale Erscheinungen), Zeit bis zum NF-Stadium 62 (larvale Probe), Bewertung der Schilddrüsenhistologie (larvale Probe), Wachstum (Gewicht und Länge), Leber-somatischer Index (Probenahme bei Jungfischen), genetische/phänotypische Geschlechtsverhältnisse (Probenahme bei Jungfischen), Histopathologie für Gonaden, Fortpflanzungsgänge, Niere und Leber (Probenahme bei Jungfischen) und Plasma-Vitellogenin (Probenahme bei Jungfischen, optional)
21. Testvaliditätskriterien	Der gelöste Sauerstoff sollte > 40 % des Luftsättigungswerts betragen; die mittlere Temperatur sollte 21 ± 1 °C und die Unterschiede zwischen den einzelnen Replikaten/Konzentrationen sollten < 1,0 °C betragen; der pH-Wert der Prüflösung sollte im Bereich von 6,5 bis 8,5 liegen; die Mortalität in jedem Replikat sollte bei der Kontrolle ≤ 20 % betragen und die mittlere Zeit bis zum NF-Stadium 62 sollte bei der Kontrolle ≤ 45 Tage betragen; das mittlere Gewicht der Prüforganismen im NF-Stadium 62 und bei Beendigung des Tests bei den Kontrollen und den Lösungsmittelkontrollen (falls verwendet) sollte 1,0 ± 0,2 bzw. 11,5 ± 3 g erreichen, es muss belegt werden, dass die Konzentrationen der Prüfchemikalie in der Lösung mit einer Toleranz von ± 20 % bezogen auf die gemessenen Mittelwerte aufrechterhalten wurden.

Anlage 4

FÜTTERUNGSREGIME

Es sollte angemerkt werden, dass obwohl dieses Fütterungsregime empfohlen wird, auch Alternativen zulässig sind, sofern die Prüforganismen mit einer angemessenen Rate wachsen und sich entwickeln.

Fütterung der Larven

Vorbereitung für das Larvenfutter

A. 1:1 (v/v) Startfutter für Regenbogenforellen: Algae/TetraFin® (oder ähnliches);

1. Startfutter für Regenbogenforellen: 50 g Startfutter für Regenbogenforellen (feines Granulat oder Pulver) und 300 ml geeignetes gefiltertes Wasser 20 Sekunden lang auf einer hohen Mixereinstellung mischen

2. Algae/TetraFin®-Mischung (oder ähnliches): 12 g Spirulina-Algenscheiben und 500 ml gefiltertes Wasser 40 Sekunden lang auf einer hohen Mixereinstellung mischen, 12 g Tetrafin® (oder ähnliches) mit 500 ml gefiltertem Wasser mischen und diese dann kombinieren, um 1 Liter der 12 g/l Spirulina-Algen und 12 g/l Tetrafin® (oder ähnliches) herzustellen

3. Gleiche Mengen des gemischten Startfutters für Regenbogenforellen mit der Algae/TetraFin®-Mischung (oder ähnliches) kombinieren

B. Salinenkrebse:

15 ml Salinenkrebseier werden in 1 l Salzwasser ausgebrütet (vorbereitet durch Hinzufügen von 20 ml NaCl zu 1 l deionisiertem Wasser). Nachdem sie 24 Stunden lang unter konstanter Beleuchtung bei Raumtemperatur belüftet wurden, können die Salinenkrebse geerntet werden. Die Salinenkrebse dürfen sich 30 Minuten lang schnell ansiedeln, indem die Belüftung unterbrochen wird. Zysten, die zur Oberseite des Kanisters treiben, werden abgeschüttet und entsorgt und die Krebse werden durch geeignete Filter geschüttet und auf 30 ml mit gefiltertem Wasser aufgefüllt.

Fütterungsprotokoll

Tabelle 1 bietet eine Referenz hinsichtlich der Art und der Menge des während der Larvenexpositionsstadien verwendeten Futters. Die Tiere sollten drei Mal täglich Montag bis Freitag und einmal täglich an den Wochenenden gefüttert werden.

Tabelle 1

Fütterungsregime für *X. laevis*-Larven in Durchflussbedingungen

Zeit (*) (Nach der Befruchtung)	Startfutter für Regenbogenforellen: Algae/Tetra-Fin®(oder ähnliches)		Salinenkrebse	
	Wochentag (drei Mal pro Tag)	Wochenende (einmal pro Tag)	Wochentag (zweimal pro Tag)	Wochenende (einmal pro Tag)
Tage 4–14 (in Wochen 0–1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (ab Tag 8 bis 15) 1 ml (ab Tag 16)	0,5 ml (ab Tag 8 bis 15) 1 ml (ab Tag 16)
Woche 2	0,67 ml	2,4 ml		
Woche 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Woche 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml

Zeit (*) (Nach der Befruchtung)	Startfutter für Regenbogenforellen: Algae/Tetra-Fin®(oder ähnliches)		Salinenkrebse	
	Wochentag (drei Mal pro Tag)	Wochenende (einmal pro Tag)	Wochentag (zweimal pro Tag)	Wochenende (einmal pro Tag)
Woche 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
Woche 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Woche 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Wochen 8–10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) Tag 0 wird definiert als der Tag, an dem die hCG-Injektion vorgenommen wird.

Futterübergang von Larve zu Jungfisch

Wenn die Larven die Metamorphose abgeschlossen haben, erhalten sie die unten erläuterte Jungfischfutterformel. Während dieses Übergangs sollte das Larvenfutter reduziert werden, während das Jungfischfutter gesteigert wird. Dies kann erreicht werden, indem das Larvenfutter proportional reduziert wird, während das Jungfischfutter proportional gesteigert wird, während jede Gruppe der fünf Larven über das NF-Stadium 62 hinauswächst und sich dem Abschluss der Metamorphose in NF-Stadium 66 nähert.

Fütterung der Jungfische

Jungfischfutter

Sobald die Metamorphose abgeschlossen ist (Stadium 66) ändert sich das Fütterungsregime ausschließlich auf Futter für 3/32-Zoll Premium sinkendes Froschfutter (Xenopus Express™, FL, USA), oder ähnliches.

Vorbereitung von zerkleinerten Pellets für den Übergang von Larve zu Jungfisch

Die Pellets aus sinkendem Froschfutter werden in einer Kaffeemühle, einem Mixer oder einem Mörser mit Stößel zerkleinert, um die Größe der Pellets ungefähr 1/3 zu reduzieren. Eine zu lange Verarbeitung bringt Pulver hervor, wovon abgeraten wird.

Fütterungsprotokoll

Tabelle 2 bietet eine Referenz hinsichtlich der Art und der Menge des während der jungen und adulten Lebensstadien verwendeten Futters. Die Tiere sollten einmal täglich gefüttert werden. Es sollte angemerkt werden, dass Tiere, die die Metamorphose durchlaufen, weiterhin einen Anteil der Salinenkrebse erhalten, bis > 95% der Tiere die Metamorphose abgeschlossen haben.

Die Tiere sollten nicht an dem Tag der Beendigung des Tests gefüttert werden, damit das Futter die Gewichtsmessungen nicht beeinflusst.

Tabelle 2

Fütterungsregime für *X. laevis*-Jungfische in Durchflussbedingungen Es sollte angemerkt werden, dass nicht metamorphosierte Tiere, einschließlich jener, deren Metamorphose durch die chemische Behandlung verzögert wurde, keine unzerkleinerten Pellets essen können

Zeit (*) (Wochen nach dem medianen Metamorphosedatum)	zerkleinerte Pellets (mg pro Fröschlein)	ganze Pellets (mg pro Fröschlein)
Während die Tiere die Metamorphose abschließen	25	0
Wochen 0–1	25	28
Wochen 2–3	0	110
Wochen 4–5	0	165
Wochen 6–9	0	220

(*) Der erste Tag der Woche 0 ist das mediane Metamorphosendatum bei den Kontrolltieren.

Anlage 5

BESTIMMUNG DES GENETISCHEN GESCHLECHTS (GENETISCHE GESCHLECHTSBESTIMMUNG)

Die Methode zur Bestimmung des genetischen Geschlechts für *Xenopus laevis* basiert auf Yoshimoto *et al.*, 2008. Detaillierte Verfahren zur Genotypisierung können bei Bedarf aus dieser Veröffentlichung erhalten werden. Alternative Methoden (z. B. qPCR mit hohem Durchsatz) können angewandt werden, wenn sie als geeignet angesehen werden.

Primer für X. laevis

DM-W-Marker

Vorwärts: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Rückwärts: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Positivkontrolle

Vorwärts: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Rückwärts: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

DNA-Aufreinigung

DNA aus Muskel- oder Hautgewebe mithilfe von beispielsweise Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Kat. Nr. 69 506) oder einem ähnlichen Produkt gemäß den Anweisungen des Kits reinigen. Die DNA kann mit weniger Puffer aus den Spinsäulen herausgelöst werden, um konzentriertere Proben zu erhalten, wenn dies für PCR als erforderlich erachtet wird. Bitte beachten, dass die DNA nicht ganz stabil ist, also muss eine Kreuzkontaminierung sorgfältig vermieden wird, da sie zu einer falschen Charakterisierung von Männchen als Weibchen oder umgekehrt führen kann.

PCR

Ein mithilfe von JumpStart^{TM}*Taq* von Sigma erstelltes Probenprotokoll findet sich in **Tabelle 1**.

Tabelle 1

Probenprotokoll mithilfe von JumpStart^{TM}*Taq* von Sigma

Master-Mix	1x (µl)	[Abschluss]
NFW ([1])	11	—
10X Puffer	2,0	—
$MgCl_2$ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTPs (jeweils 10 mM)	0,4	200 µM
Marker für Primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Marker rev. Primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontrolle für Primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontrolle rev. Primer (8 µM)	0,8	0,3 µM

Master-Mix	1x (µl)	[Abschluss]
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 Einheiten/µl
DNA-Vorlage	1,0	~200 pg/µl

([1]) nukleasefreies WasserHinweis: Wenn Master-Mixes vorbereitet werden, muss eine zusätzliche Menge erzeugt werden, um Verluste beim Pipettieren auszugleichen (Beispiel: 25x sollte für nur 24 Reaktionen verwendet werden).

Reaktion:

Master-Mix	19,0 µl
Vorlage	1,0 µl
Gesamt	20,0 µl

Thermocycler-Profil:

Stufe 1.	94 °C	1 Min.
Stufe 2.	94 °C	30 Sek.
Stufe 3.	60 °C	30 Sek.
Stufe 4.	72 °C	1 Min.
Stufe 5.	Zu Stufe 2 gehen.	35 Zyklen
Stufe 6.	72 °C	1 Min.
Stufe 7.	4 °C	halten

PCR-Produkte können umgehend in einem Gel durchlaufen oder bei 4 °C gelagert werden.

Agarosegel-Elektrophorese (3 %)(Probenprotokoll)

50X TAE

Tris	24,2 g
Eisessig	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Wasser zu 100 ml hinzufügen

1X TAE

H_2O	392 ml
50X TAE	8 ml

3:1 Agarose

3 Teile NuSieve™ GTG™ Agarose

1 Teil Fisher Agarose niedrige Elektrophorese (EEO)

Methode

1. Ein 3 %-Gel herstellen, indem 1,2 g Agarosemischung zu 43 ml 1X TAE hinzugefügt werden. Verwirbeln, um große Klumpen aufzulösen.

2. Die Agarosemischung in der Mikrowelle erhitzen, bis sie sich komplett aufgelöst hat (Überkochen vermeiden). Leicht abkühlen lassen.

3. 1,0 µL Ethidiumbromid hinzufügen (10 mg/ml). Kolben verwirbeln. Bitte beachten, dass Ethidiumbromid mutagen ist, also sollten so weit wie technisch möglich alternative Chemikalien für diesen Schritt verwendet werden, um die Gesundheitsrisiken für die Arbeiter zu minimieren ([1]).

4. Mit Kamm Gel in die Form gießen. Vollständig abkühlen lassen.

5. Gel zu Apparatur hinzufügen. Gel mit 1X TAE bedecken.

6. 1 µl 6x Ladepuffer zu jeweils 10 µl PCR-Produkt hinzufügen.

7. Mit einer Pipette die Proben in Mulden tropfen.

8. Bei 160 konstanten Volt ~20 Minuten laufen lassen.

Ein Bild des Agarosegels, das die Bandmuster zeigt, die auf männliche und weibliche Tiere hindeuten lassen, ist in **Abbildung 1** dargestellt.

Abb. 1: Bild des Agarosesgels, das das Bandmuster zeigt, das auf ein männliches (♂) Tier (einzelnes Band ~203 bp: DMRT1) und auf ein weibliches (♀) Tier hinweist (zwei Bänder bei ~259 bp: DM-W und 203 bp:DMRT1).

Literaturhinweise

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: 2469-2474.

([1]) Im Einklang mit Artikel 4 Absatz 1 der Richtlinie 2004/37/EG des europäischen Parlaments und des Rates vom 29 April 2004 über den Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch Karzinogene oder Mutagene bei der Arbeit (Sechste Einzelrichtlinie im Sinne von Artikel 16 Absatz 1 der Richtlinie 89/391/EWG des Rates) (ABl. L 158 vom30.4.2004, S. 50).

Anlage 6

MESSUNG VON VITELLOGENIN

Die Messung von Vitellogenin (VTG) wird mithilfe einer Methode namens Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt, die ursprünglich für das VTG von Dickkopfelritzen entwickelt wurde (Parks *et al.*, 1999). Derzeit gibt es keine im Handel erhältlichen Antikörper für *X. laevis*. Hinsichtlich der Fülle an Informationen für dieses Protein und der Verfügbarkeit von kosteneffektiven handelsüblichen Antikörperproduktionsdiensten ist es jedoch zumutbar, dass Labore einfach ein ELISA entwickeln können, um diese Messung durchzuführen (Olmstead *et al.*, 2009). Außerdem bieten Olmstead *et al.* (2009) eine Beschreibung des Tests und wie er wie unten dargestellt für das VTG in *X. tropicalis* modifiziert wurde. Die Methode nutzt einen Antikörper gegen das VTG von *X. tropicalis*, aber es ist bekannt, dass er auch für das VTG von *X. laevis* wirkt. Es sollte angemerkt werden, dass auch nicht wettbewerbsfähige ELISAs verwendet werden können und dass diese niedrigere Erkennungsgrenzen besitzen könnten als die in der unten beschriebenen Methode.

Material und Reagenzien

— Präadsorbiertes 1. Antikörperserum (Ab)

— 1 Teil anti-*X. tropicalis* VTG 1. Ab-Serum mit 2 Teilen männlichem Kontrollplasma mischen und bei RT ~ 75 Minuten stehen lassen, 30 Minuten lang mit Eis kühlen, bei > 20K x G 1 Stunde lang bei 4 ^{o}C zentrifugieren, Tensid entfernen, aliquotieren, bei -20 ^{o}C lagern.

— 2. Antikörper

— Ziege anti-Kaninchen IgG-HRP-Konjugat (z. B. Bio-Rad 172–1019)

— VTG-Standard

— aufbereitetes VTG von *X. laevis* bei 3,3 mg/ml.

— TMB (3,3',5,5' Tetramethylbenzidin) (z. B. KPL 50-76-00; oder Sigma T0440)

— Normales Ziegenserum (NGS)(z. B. Chemicon® S26-100ml)

— EIA Styropor-Mikrotiterplatten mit 96 Mulden (z. B. ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher:07-200-35)

— 37 ^{o}C-Hybridisierungsofen (oder schnell ausgleichender Luftinkubator) für Platten, Wasserbad für Röhrchen

— Sonstige gängige Laborausrüstungen, Chemikalien und Materialien.

Rezepte

Beschichtungspuffer (50 mM Karbonatpuffer, pH-Wert 9,6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
Wasser	428 ml

10X PBS (0,1 M Phosphat, 1,5 M NaCl):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
Wasser	810 ml

Waschpuffer (PBST):

10X PBS	100 ml
Wasser	900 ml

pH-Wert auf 7,3 mit 1 M HCl anpassen, dann 0,5 ml Tween-20 hinzufügen

Test-Puffer:

Normales Ziegenserum (NGS)	3,75 ml
Waschpuffer	146,25 ml

Probennahme

Blut wird mit einem heparinisierten Mikrohämatokritröhrchen gesammelt und auf Eis gelegt. Nach einer 3-minütigen Zentrifugierung wird das Röhrchen ausgewertet, aufgebrochen und das Plasma in 0,6 ml-Mikrozentrifugenröhrchen gegossen, die 0,13 Einheiten lyophilisiertes Aprotinin enthalten. (Diese Röhrchen werden im Voraus vorbereitet, indem die geeignete Menge Aprotinin hinzugefügt wird, sie eingefroren werden und sie in einem Speedvac bei geringer Hitze bis sie trocken sind lyophilisiert werden.) Plasma bei -80 °C lagern, bis es analysiert wurde.

Verfahren für eine Platte

Beschichtung der Platte

20 µl des aufbereiteten VTG mit 22 ml Karbonatpuffer mischen (endgültig 3 µg/ml). 200 µl zu jeder Mulde einer Platte mit 96 Mulden hinzufügen. Die Platte mit Klebesiegelfolie abdecken 2 Stunden lang bei 37 °C (oder 4 °C über Nacht) inkubieren lassen.

Blockieren der Platte

Die Blockierungslösung wird hinzugefügt, indem 2 ml des normalen Ziegenserums (NGS) zu 38 ml des Karbonatpuffers hinzugefügt werden. Die Beschichtungslösung entfernen und trocken schütteln. 350 µl der Blockierungslösung in jede Mulde hinzufügen. Mit Klebesiegelfolie abdecken und 2 Stunden lang bei 37 °C inkubieren (oder bei 4 °C über Nacht).

Vorbereitung der Standards

5,8 µl des aufbereiteten VTG-Standards wird mit 1,5 ml des Test-Puffers in einem 12 x 75 mm großen Einweg-Teströhrchen aus Borosilikatglas gemischt. Dies ergibt 12 760 ng/ml. Dann wird eine serielle Verdünnung vorgenommen, indem 750 µl der vorherigen Verdünnung zu 750 µl des Test-Puffers hinzugefügt werden, um endgültige Konzentrationen von 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 und 50 ng/ml zu erreichen.

Vorbereitung der Proben

Mit einer 1:300- (z. B. 1 µl Plasma mit 299 µl Test-Puffer kombinieren) oder 1:30-Verdünnung von Plasma in Test-Puffer beginnen. Wenn eine große Menge VTG erwartet wird, können zusätzliche oder größere Verdünnungen erforderlich sein. Versuchen, B/B_o innerhalb des Bereichs der Standards zu halten. Für Proben ohne nennenswertes VTG, z. B. Kontroll-männchen und -weibchen (die allesamt unreif sind), ist die 1:30-Verdünnung zu verwenden. Proben, die weniger verdünnt sind als so, weisen ungewünschte Matrixeffekte auf.

Zusätzlich wird empfohlen, auf jeder Platte eine Positivkontrollprobe durchzuführen. Dies kommt aus einem Pool von Plasma mit hoch induzierten VTG-Niveaus. Der Pool wird ursprünglich in NGS verdünnt, in Aliquote aufgeteilt und bei -80 °C gelagert. Für jede Platte wird ein Aliquot aufgetaut, weiter in Test-Puffer verdünnt und ähnlich wie eine Testprobe durchlaufen.

Inkubation mit 1. Antikörper

Der 1. Ab wird vorbereitet, indem eine 1:2000-Verdünnung des präadsorbierten 1. Ab-Serum in Test-Puffer hergestellt wird (z. B. 8 µl auf 16 ml Test-Puffer). 300 µl der 1. Ab-Lösung mit 300 µl der Probe/des Standards in einem Glasröhrchen kombinieren. Das B_o-Röhrchen wird auf ähnliche Weise mit 300 µl Test-Puffer und 300 µl Antikörper vorbereitet. Zudem sollte ein NSB-Röhrchen mit ausschließlich 600 µl Test-Puffer vorbereitet werden, d. h. ohne Ab. Die Röhrchen mit Parafilm abdecken und vorsichtig schütteln, um sie zu mischen. 1 Stunde lang in einem 37 °C warmen Wasserbad inkubieren.

Waschen der Platte

Die Platte kurz vor Abschluss der 1. Ab-Inkubation waschen. Dies erfolgt durch Ausschütteln der Inhalte und Trockentupfen auf absorbierendem Papier. Anschließend die Mulden mit 350 µl der Waschlösung füllen, ausschütten und trocken tupfen. Hierfür sind eine Mehrkanal-Repetierpipette oder ein Plattenwäscher nützlich. Der Waschschritt wird weitere zwei Male wiederholt, damit insgesamt drei Mal gewaschen wurde.

Besatz der Platte

Nachdem die Platte gewaschen wurde, die Röhrchen aus dem Wasserbad entfernen und leicht schütteln. 200 µl jedes Proben-, Standard-, B_o- und NSB-Röhrchens hinzufügen, um die Mulden der Platte zu duplizieren. Die Platte mit Klebesiegelfolie abdecken und 1 Stunde lang bei 37 °C inkubieren lassen.

Inkubation mit dem 2. Antikörper

Am Ende der Inkubation aus dem vorherigen Schritt sollte die Platte drei Mal wie oben beschrieben erneut gewaschen werden. Der verdünnte 2. Ab wird vorbereitet, indem 2,5 µl des 2. Ab mit 50 ml Test-Puffer gemischt werden. 200 µl des verdünnten 2. Ab in jede Mulde hinzufügen, wie oben beschrieben versiegeln und 1 Stunde lang bei 37 °C inkubieren.

Zusatz von Substrat

Nachdem die Inkubation mit dem 2. Ab abgeschlossen ist, muss die Platte wie zuvor beschrieben drei Mal gewaschen werden. Anschließend 100 µl des TMB-Substrats zu jeder Mulde hinzufügen. Die Reaktion 10 Minuten lang fortschreiten lassen, vorzugsweise abseits von grellem Licht. Die Reaktion anhalten, indem 100 µl 1 M Phosphorsäure hinzugefügt werden. Dadurch ändert sich die Farbe von blau zu einem intensiven Gelb. Die Absorption bei 450 nm mithilfe eines Plattenlesers messen.

B/Bo berechnen

Den durchschnittlichen NSB-Wert von allen Messungen abziehen. Der B/B_o wird für jede Probe und jeden Standard berechnet, indem der Absorptionswert (B) durch die durchschnittliche Absorption der B_o-Probe geteilt wird.

Die Standardkurve ermitteln und unbekannte Mengen festlegen

Mithilfe einer Computergrafiksoftware (z. B. Slidewrite™ oder Sigma Plot®) eine Standardkurve erzeugen, die die Menge von B/B_o der Probe auf der Grundlage des B/B_o der Standards extrapoliert. Normalerweise ist die Menge auf einer log-Skala gepunktet und die Kurve hat eine sigmoide Form. Sie erscheint jedoch linear, wenn ein enger Standardbereich verwendet wird. Die Probenmengen für den Verdünnungsfaktor korrigieren und als mg VTG/ml Plasma melden.

Bestimmung der minimalen Erkennungsgrenzen (MDL)

Häufig ist es besonders bei normalen Männchen nicht klar, wie Ergebnisse von niedrigen Werten eingetragen werden sollen. In diesen Fällen sollten die 95 % „Konfidenzgrenzen" verwendet werden, um zu bestimmen, ob ein Wert als Null oder als andere Zahl eingetragen werden sollte. Wenn das Probenergebnis innerhalb des Konfidenzintervalls des Nullstandards liegt (B_o), sollte das Ergebnis als Null eingetragen werden. Das minimale Erkennungsniveau wird der niedrigste Standard sein, der sich konsistent vom Nullstandard unterscheidet; dies gilt nur, wenn die zwei Konfidenzintervalle sich nicht überschneiden. Für ein Probenergebnis, das innerhalb der Konfidenzgrenze des minimalen Erkennungsniveaus oder darüber liegt, wird der berechnete Wert eingetragen. Wenn eine Probe zwischen den Nullstandard und die Konfidenzintervalle des minimalen Erkennungsniveaus fällt, sollte eine Hälfte des minimalen Erkennungsniveaus für den Wert dieser Probe eingetragen werden.

Literaturhinweise

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.

Anlage 7

STATISTISCHE ANALYSE

Der LAGDA erzeugt drei Arten von Daten, die statistisch analysiert werden müssen: (1) Quantitative kontinuierliche Daten, (2) Zeit-bis-zum-Ereignis-Daten für Entwicklungsraten (Zeit bis NF-Stadium 62) und (3) ordinale Daten in Form der Schweregrade oder Entwicklungsstadien aus Histopathologiebewertungen. Der empfohlene Entscheidungsbaum der statistischen Analyse für den LAGDA wird in Abbildung 1 dargestellt. Zudem sind nachfolgend ein paar Anmerkungen aufgeführt, die eventuell zur Durchführung der statistischen Analyse für die Messungen aus dem LAGDA erforderlich sind. Für den Analyseentscheidungsbaum sollten die Ergebnisse der Messungen für Mortalität, Wachstum (Gewicht und Länge) und den lebersomatischen Index (LSI) gemäß dem Zweig „Weitere Endpunkte" analysiert werden.

Kontinuierliche Daten

Daten für kontinuierliche Endpunkte sollten zuerst auf Monotonie geprüft werden, indem der Rang der Daten geändert, diese in ein ANOVA-Modell eingepasst und die linearen und quadratischen Kontraste verglichen werden. Wenn die Daten monoton sind, sollte eine abstufende Jonckheere-Terpstra-Trendprüfung an den Medianen der Replikate durchgeführt werden und es sollten keine nachfolgenden Analysen angewandt werden. Eine Alternative zu Daten, die normal mit homogenen Varianzen verteilt werden, ist die abstufende Williams-Prüfung. Wenn die Daten nicht monoton sind (der quadratische Kontrast ist signifikant und der lineare ist nicht signifikant), sollten sie mithilfe eines ANOVA-Modells mit gemischten Effekten analysiert werden. Die Daten sollten dann auf Normalität (vorzugsweise mithilfe des Shapiro-Wilk- oder Anderson-Darling-Tests) und Varianzhomogenität (vorzugsweise mithilfe des Levene-Tests) beurteilt werden. Beide Tests werden mit den Residuen des ANOVA-Modells mit gemischten Effekten durchgeführt. Anstelle der Durchführung dieser förmlichen Tests auf Normalverteilung und Varianzhomogenität kann auch fachliches Ermessen angewendet werden; Tests sind jedoch zu bevorzugen. Ergibt sich eine Normalverteilung der Daten mit homogener Varianz, werden die Annahmen einer gemischten ANOVA-Wirkung erfüllt und mit dem Dunnett-Test wird eine signifikante Wirkung festgestellt. Wo Nichtnormalität oder Varianzheterogenität festgestellt wird, werden die Annahmen von Dunnett Test verletzt und eine normalisierende, varianzstabilisierende Transformation angestrebt. Wenn keine solche Transformation gefunden wird, wird ein signifikanter Behandlungseffekt mit einem Dunn-Test bestimmt. Wo möglich sollte ein einseitiger Tests anstatt eines zweiseitigen Tests durchgeführt werden, aber es erfordert eine fachkundige Beurteilung, um zu bestimmen, welche für einen gegebenen Endpunkt angemessen ist.

Mortalität

Die Mortalitätsdaten sollten für den Zeitraum, der den gesamten Test umfasst, analysiert und als Anteil formuliert werden, der in einem bestimmten Becken gestorben ist. Larven, die die Metamorphose nicht innerhalb des vorgegebenen Zeitrahmens abschließen, Larven, die sich in der larvalen Teilstichprobenkohorte befinden, Jungfrösche, die gekeult werden, und Tiere, die aufgrund eines Versuchsfehlers sterben, sollten als zensierte Daten behandelt und nicht in den Nenner der Prozentberechnung mit aufgenommen werden. Vor statistischen Analysen sollten die Mortalitätsanteile in Arcsin-Quadratwurzeln verwandelt werden. Alternativ kann der abstufende Cochran-Armitage-Test verwendet werden, mit einer Rao-Scott-Anpassung, während eine Überdispersion vorhanden ist.

Gewicht und Länge (Wachstumsdaten)

Männchen und Weibchen sind während der Metamorphose nicht sexuell dimorph, also sollten Wachstumsdaten zur larvalen Teilstichprobenahme unabhängig vom Geschlecht analysiert werden. Wachstumsdaten von Jungtieren sollten jedoch auf der Grundlage des genetischen Geschlechts getrennt voneinander analysiert werden. Eine log-Transformation kann für diese Endpunkte erforderlich sein, da die log-Normalität der Größendaten nicht unüblich ist.

Leber-somatischer Index (LSI)

Lebergewichte sollten als Anteile des gesamten Körpergewichts (d. h LSI) normalisiert und getrennt auf der Grundlage des genetischen Geschlechts analysiert werden.

Zeit bis zum NF-Stadium 62

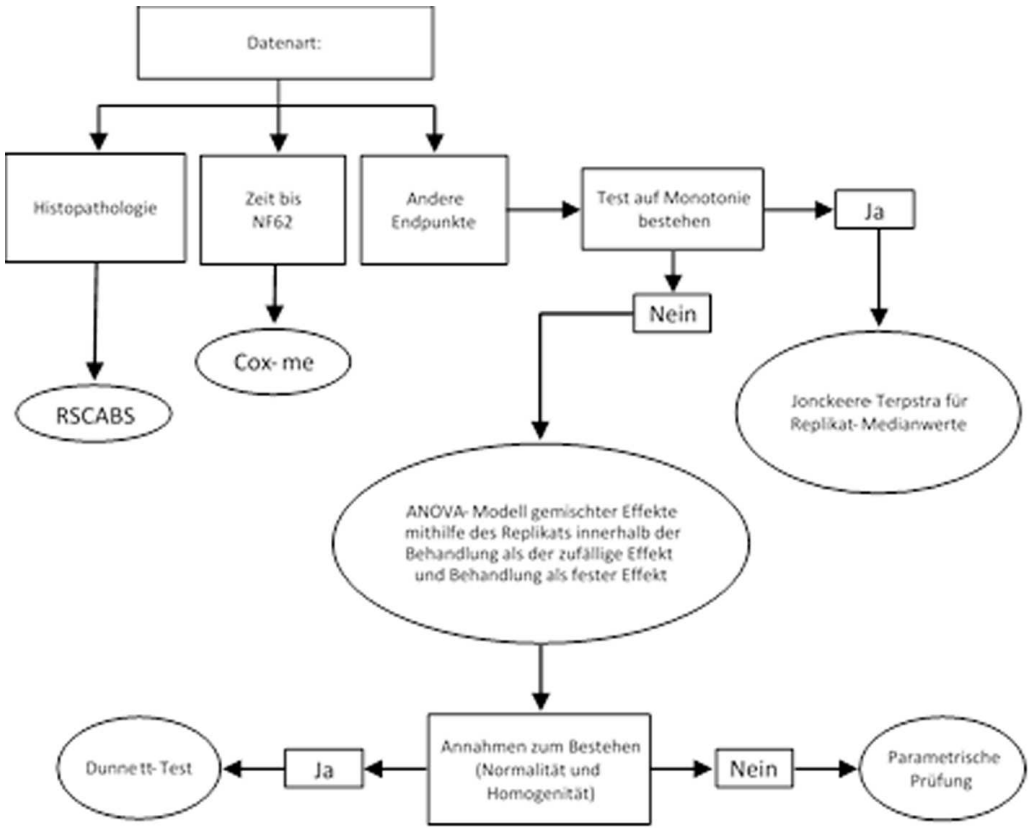
Zeit-zur-Metamorphose-Daten sollten wie Zeit-zum-Ereignis-Daten behandelt werden, wobei Mortalitäten oder Einzeltiere, die innerhalb von 70 Tagen nicht das NF-Stadium 62 erreichen, wie rechtszensierte Daten behandelt werden (d. h. der tatsächliche Wert ist größer als 70 Tage, aber die Studie endet, bevor die Tiere im NF-Stadium 62 in 70 Tagen erreicht hätten). Die mediane Zeit zum NF-Stadium 62, Abschluss der Metamorphose, bei Verdünnungswasserkontrollen sollte verwendet werden, um das Datum des Testendes zu bestimmen. Die mediane Zeit zum Abschluss der Metamorphose könnte anhand der Kaplan-Meier-Produktgrenzenschätzer bestimmt werden. Dieser Endpunkt sollte mithilfe eines proportionalen Gefahrenmodells nach Cox mit gemischten Effekten analysiert werden, das die Replikatstruktur der Studie berücksichtigt.

Histopathologiedaten (Schweregrade und Entwicklungsstadien)

Histopathologiedaten (Schweregrade und Entwicklungsstadien) Ein Test namens RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage nach Scheiben) nutzt eine abstufende, an Rao-Scott angepasste Cochran-Armitage-Trendprüfung auf jedem Schweregrad in einer histopathologischen Wirkung (Green *et al.*, 2014). Die Rao-Scott-Anpassung integriert das experimentelle Design des Replikatgefäßes im Test. Das Verfahren „nach Scheiben" nimmt die biologische Erwartung auf, dass die Schwere des Effekts mit steigenden Dosen oder Konzentrationen dazu neigt, höher zu werden, während die individuellen Subjektwerte beibehalten werden und die Schwere jedes gefundenen Effekts enthüllt wird. Das RSCABS-Verfahren bestimmt nicht nur, welche Behandlungen sich statistisch von den Kontrollen unterscheiden (d. h. eine schwerere Pathologie als die Kontrollen haben), sondern legt auch fest, bei welchem Schweregrad die Differenz auftritt, wodurch der Analyse dringend erforderlicher Kontext hinzugefügt wird. Im Falle einer entwicklungstechnischen Stufentrennung der Gonaden und Fortpflanzungsgänge sollten die Daten zusätzlich manipuliert werden, da eine Annahme von RSCABS darin besteht, dass die Schwere des Effekts sich mit der Dosis steigert. Der beobachtete Effekt könnte eine Verzögerung oder Beschleunigung der Entwicklung sein. Deshalb sollten die Daten zur entwicklungstechnischen Stufentrennung wie gemeldet analysiert werden, um eine Beschleunigung der Entwicklung zu erkennen und dann vor einer zweiten Analyse manuell umgekehrt werden, um eine Verzögerung der Entwicklung zu erkennen.

Abb. 1:

Entscheidungsbaum der statistischen Analyse für LAGDA-Daten.



LITERATURHINWEISE

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1 108-1 116.

Anlage 8

ERWÄGUNGEN ZUR NACHVERFOLGUNG UND MINIMIERUNG DES AUFTRETENS VON SKOLIOSE

Eine idiopathische Skoliose, die sich normalerweise bei *Xenopus laevis*-Larven als gebogener Schwanz manifestiert, kann die morphologischen und verhaltensbedingten Beobachtungen der Prüfpopulationen komplizieren. Es sollten Bemühungen unternommen werden, um das Auftreten von Skoliose im Besatz und unter Testbedingungen zu minimieren oder zu beseitigen. Im endgültigen Test wird empfohlen, dass die Prävalenz der mäßigen und schweren Skoliose weniger als 10 % beträgt, um das Vertrauen zu stärken, dass der Test konzentrationsbezogene Entwicklungseffekte in sonst gesunden Amphibienlarven erkennt.

Bei täglichen Beobachtungen während des endgültigen Tests sollten sowohl das Auftreten (Anzahl der Tiere) und die Schwere der Skoliose, falls vorhanden, dokumentiert werden. Die Art der Abnormalität sollte hinsichtlich der Stelle (z. B. vor oder hinter dem Rumpf) und Richtung der Krümmung (z. B. lateral oder dorsal-nach-ventral) beschrieben werden. Die Schwere kann wie folgt eingestuft werden:

(NR) Nicht bemerkenswert: keine Krümmung vorhanden

(1) Minimal: leichte laterale Krümmung hinter dem Rumpf; nur im Ruhezustand sichtbar

(2) Mäßig: laterale Krümmung hinter dem Rumpf; stets sichtbar, aber schränkt die Bewegung nicht ein

(3) Schwer:
laterale Krümmung vor dem Rumpf; ODER Krümmung, die die Bewegung einschränkt; ODER dorsale-nach-ventrale Krümmung

Ein US EPA FIFRA Scientific Advisory Panel (FIFRA SAP 2013) überprüfte die zusammengefassten Daten für Skoliose in fünfzehn Amphibienmetamorphose-Tests mit *X. laevis* (NF-Stadium 51 bis 60+) und stellte allgemeine Empfehlungen zur Reduzierung der Häufigkeit dieser Abnormalität in Prüfpopulationen bereit. Die Empfehlungen sind relevant für den LAGDA, obwohl dieser Test eine längere Entwicklungszeitleiste umfasst.

Historische Laichleistung

Allgemein sollten gesunde adulte Tiere von hoher Qualität als Brutpaare eingesetzt werden; wenn Brutpaare, die Nachkommen mit Skoliose hervorbringen, beseitigt werden, kann dies das Auftreten eventuell mit der Zeit minimieren. Besonders die Minimierung der Verwendung von wild gefischtem Brutbesatz kann hier von Vorteil sein. Die LAGDA-Expositionsdauer beginnt mit Embryos in NF-Stadium 8 bis 10 und es ist nicht praktikabel, zu Beginn des Tests zu bestimmen, ob die gegebenen Einzeltiere eine Skoliose aufweisen werden oder nicht. Deshalb sollte zusätzlich zur Nachverfolgung des Auftretens von Skoliose in Tieren, die am Test teilnehmen, die historische Legeleistung (einschließlich der Prävalenz von Skoliose in Larven, die sich entwickeln dürfen) dokumentiert werden. Es kann nützlich sein, den Anteil jedes Geleges, das nicht in einer gegebenen Studie verwendet wird, weiter zu überwachen und diese Beobachtungen zu melden (FIFRA SAP 2013).

Wasserqualität

Es ist wichtig, eine ausreichende Wasserqualität im Laborbesatz und während des Tests zu gewährleisten. Zusätzlich zu den Wasserqualitätskriterien, die regelmäßig für Wassertoxizitätsprüfungen bewertet werden, kann es nützlich sein, auf Nährstoffmängel (z. B. Mangel an Vitamin C, Kalzium, Phosphor) oder einen übermäßigen Gehalt an Selen und Kupfer, von denen gemeldet wurde, dass sie bei im Labor aufgezogenen *Rana* sp. und *Xenopus* sp. zu verschiedenen Graden Skoliose hervorrufen, zu überwachen und diese zu korrigieren (Marshall *et al*. 1980; Leibovitz *et al*. 1992; Martinez *et al*. 1992; wie in FIFRA SAP 2013 berichtet). Die Verwendung eines geeigneten Futters (siehe Anlage 4) und eine regelmäßige Beckenreinigung verbessern allgemein die Wasserqualität und die Gesundheit der Testproben.

Futter

Spezifische Empfehlungen für Futter, das sich bei LAGDA als erfolgreich erwies, werden in Anlage 4 aufgeführt. Es wird empfohlen, dass die Futterquellen auf biologische Giftstoffe, Herbizide und andere Pestizide überprüft werden, die bei *X. laevis* oder anderen Wassertieren bekanntermaßen eine Skoliose hervorrufen (Schlenk und Jenkins 2013). Beispielsweise wurde die Exposition gegenüber bestimmten Cholinesterasehemmern bei Fischen (Schultz *et al.* 1985) und Fröschen (Bacchetta *et al.* 2008) mit einer Skoliose assoziiert.

LITERATURHINWEISE

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara und 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 und R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. Toxicology 36: 185-198.

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

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

Schlenk, D. und 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.“