“PRILOG 1

METODE ISPITIVANJE FIZIČKIH I HEMIJSKIH SVOJSTAVA HEMIKALIJA

Dio 0 Međunarodne metode koje su priznate kao primjerene za dobijanje informacija o unutrašnjim svojstvima supstance

TABELA 1: ISPITNE METODE ZA FIZIČKO -HEMIJSKA SVOJSTVA supstance

Krajnja tačka	**Ispitna metoda**	**Odgovarajuće poglavlje u dijelu A ovog Priloga koje sadrži potpuni opis ispitne metode (brojevi u zagradama znače da je potpuni opis ispitne metode izbrisan iz dijela A, a prazno polje znači da u dijelu A ovog Priloga nema odgovarajuće ispitne metode)**
Tačka topljenja/tačka smrzavanja	OECD Test Guideline 102: Melting Point/Melting Range (1995)	A.1.
Tačka ključanja	OECD Test Guideline 103: Boiling point (1995)	A.2.
Gustina	OECD Test Guideline 109: Density of Liquids and Solids (2012)	(A.3.)
Napon pare	OECD Test Guideline 104: Vapour Pressure (2006)	(A.4.)
Površinski napon	OECD Test Guideline 115: Surface Tension of Aqueous Solutions (1995)	A.5.
Rastvorljivost u vodi	OECD Test Guideline 105: Water Solubility (1995)	A.6.
Koeficijent raspodjele n-	OECD Test Guideline 107: Partition Coefficient (n-	(A.8.)

oktanol/voda	octanol/water): Shake-Flask Method (1995)	
	OECD Test Guideline 123: Partition Coefficient (1-Octanol/Water): Slow-Stirring Method (2022)	A.23.
	OECD Test Guideline 117: Partition Coefficient (n-octanol/water): HPLC Method (2022)	A.24.
Konstanta disocijacije	OECD Test Guideline 112: Dissociation Constants in Water (1981.)	A.25.
Viskoznost	OECD Test Guideline 114: Viscosity of Liquids (2012)	
Paljenje	Test methods according to table 2.6.3 of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	
Donja i gornja granica eksplozivnosti	EN 1839:2017 – Determination of the explosion limits and the limiting oxygen concentration (LOC) for flammable gases and vapours	
Zapaljivost	Test methods according to section 2.2.4.1. of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	
	Test L.2: sustained combustibility test, Part III, section 32 of the UN RTDG Manual of Tests and Criteria	
	Test N.1: test method for readily combustible solids, Part III, sub-section 33.2.4 of the UN RTDG Manual of Tests and Criteria	
	Test N.5: test method for substances which in contact with water emit flammable gases, Part III, sub-section 33.5.4 of the UN RTDG Manual of Tests and Criteria	
Temperatura samozapaljenja (čvrste supstance)	Test N.4: test method for self-heating substances, Part III, sub-section 33.4.6 of the UN RTDG Manual of Tests and Criteria	
	EN 15188:2020 – Determination of the spontanous ignition	

	behaviour of dust accumulations	
Temperatura samozapaljenja (tečnosti, gasovi)	ISO/IEC 80079-20-1:2017 – Explosive atmospheres – Part 20-1: Material characteristics for gas and vapour classification - Test methods and data	
Temperatura razgradnje	Test Series H, part II, section 28, of the UN RTDG Manual of Tests and Criteria	
Eksplozivna svojstva	Test methods according to Test series 1–3, Part I, sections 11-13 of the UN RTDG Manual of Tests and Criteria	
	EU Test method A.14 Explosive Properties	A.14.
Svojstva oksidacije	Test method according to section 2.4.4. of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	
	Test O.2: test for oxidizing liquids, Part III, sub-section 34.4.2 of the UN RTDG Manual of Tests and Criteria	
	Test O.1: Test for oxidizing solids, Part III, sub-section 34.4.1 of the UN RTDG Manual of Tests and Criteria	
	Test O.3: Gravimetric test for oxidizing solids, Part III, sub-section 34.4 3 of the UN RTDG Manual of Tests and Criteria	
Pirofornost	Test N.3: test method for pyrophoric liquids, Part III, sub-section 33.3.1.5 of the UN RTDG Manual of Tests and Criteria	
	Test N.2: test method for pyrophoric solids, Part III, sub-section 33.3.1.4 of the UN RTDG Manual of Tests and Criteria	
Granulometrija/svojstva čestica	EU test method A.22. Length Weighted Geometric Mean Diameter of Fibres	A.22.
	ISO 13318 – Determination of Particle Size Distribution by Centrifugal Liquid Sedimentation Methods	

	ISO 21501 – Determination of Particle Size Distribution - Single Particle Light Interaction Methods	
	OECD Test Guideline 124: Determination of the Volume Specific Surface Area of Manufactured Nanomaterials (2022)	
	OECD Test Guideline 125: Particle Size and Particle Size Distribution of Nanomaterials (2022)	
pH	OECD Test Guideline 122: Determination of pH, Acidity and Alkalinity (2013)	
Svojstva polimera	OECD Test Guideline 118: Determination of the Number-Average Molecular Weight and the Molecular Weight Distribution of Polymers using Gel Permeation Chromatography (1996.)	A.18.
	OECD Test Guideline 119: Determination of the Low Molecular Weight Content of a Polymer Using Gel Permeation Chromatography (1996)	A.19.
	OECD Test Guideline 120: Solution/Extraction Behaviour of Polymers in Water (2000)	(A.20.)

TABELA 2.: METODE ZA TOKSIKOLOŠKA SVOJSTVA

Krajnja tačka	**Ispitna metoda**	**Odgovarajuće poglavlje u dijelu B ovog Priloga koje sadrži potpuni opis ispitne metode (brojevi u zagradama znače da je poglavlje koje sadrži potpuni opis ispitne metode izbrisano iz dijela B, a prazno polje znači da u dijelu B ovog Priloga nema odgovarajuće ispitne metode)**
Nagrizanje/nadraživanje kože	*In vitro:*	
	OECD Test Guideline 430: *In vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER) (2015)	B.40.

	OECD Test Guideline 431: *In vitro* Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Method (2019)	(B.40.bis)
	OECD Test Guideline 435: *In vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion (2015)	B.65.
	OECD Test Guideline 439: *In vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method (2021)	(B.46.)
	In vivo:	
	OECD Test Guideline 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion (2015)	B.4.
Teška povreda oka/nadraživanje oka	*In vitro:*	
	OECD Test Guideline 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage (2020)	(B.47.)
	OECD Test Guideline 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage (2018)	(B.48.)
	OECD Test Guideline 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants (2017)	(B.61.)
	OECD Test Guideline 491: Short Time Exposure *In Vitro* Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious	(B.68.)

	Eye Damage (2020)	
	OECD Test Guideline 492: Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Method for Identifying Chemicals Not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage (2019)	(B.69.)
	OECD Test Guideline 492B: Reconstructed Human Cornea-like Epithelium (RHCE) Test Method for Eye Hazard Identification (2022)	
	OECD Test Guideline 494: Vitrigel-Eye Irritancy Test Method for Identifying Chemicals Not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage (2021)	
	OECD Test Guideline 496: *In vitro* Macromolecular Test Method for Identifying Chemicals Inducing Serious Eye Damage and Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage (2019)	
	OECD Test Guideline 467: Defined Approaches for Serious Eye Damage and Eye Irritation (2022)	
	In vivo:	
	OECD Test Guideline 405: Acute Eye Irritation/Corrosion (2021)	(B.5.)
Preosjetljivost kože	*In vitro:*	
	OECD Test Guideline 442C: *In Chemico* Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) (2022)	(B.59.)
	OECD Test Guideline 442D: *In Vitro* Skin Sensitisation Assays Addressing the AOP Key Event on Keratinocyte Activation (2022)	(B.60.)

	OECD Test Guideline 442E: *In Vitro* Skin Sensitisation: *In Vitro* Skin Sensitisation Assays Addressing the Key Event on Activation of Dendritic Cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation (2022)	(B.71.)
	OECD Test Guideline 497: Defined Approaches on Skin Sensitisation (2021)	
	In vivo:	
	OECD Test Guideline 429: Skin Sensitisation – Local Lymph Node Assay (2010)	B.42.
	OECD Test Guideline 442 A: Skin Sensitisation – Local Lymph Node Assay: DA (2010)	B.50.
	OECD Test Guideline 442B: Skin Sensitisation – Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or –FCM (2018)	(B.51.)
	OECD Test Guideline 406: Skin Sensitisation Guinea Pig Maximisation Test and Buehler Test (2022)	(B.6.)
Mutagenost	*In vitro:*	
	OECD Test Guideline 471: Bacterial Reverse Mutation Test (2020)	(B.13./B.14.)
	OECD Test Guideline 476: *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test Using the Hprt and xprt Genes (2016)	(B.17.)
	OECD Test Guideline 490: *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene (2016)	B.67.
	OECD Test Guideline 473: *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test (2016)	B.10.
	OECD Test Guideline 487. *In vitro* Mammalian Cell	B.49.

	Micronucleus Test (2016)	
	In vivo:	
	OECD Test Guideline 475: Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test (2016)	B.11.
	OECD Test Guideline 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (2016)	B.12.
	OECD Test Guideline 483: Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test (2016)	B.23.
	OECD Test Guideline 488: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays (2022)	(B.58.)
	OECD Test Guideline 489: *In Vivo* Mammalian Alkaline Comet Assay (2016)	B.62.
	OECD Test Guideline 470: Mammalian Erythrocyte Pig-a Gene mutation Assay (2022)	
Akutna toksičnost	Oral:	
	OECD Test Guideline 420: Acute Oral Toxicity: Fixed Dose Procedure (2002)	B.1. bis.
	OECD Test Guideline 423: Acute Oral Toxicity: Acute Toxic Class Method (2002)	B.1. tris.
	OECD Test Guideline 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure (2022)	
	Dermal:	
	OECD Test Guideline 402: Acute Dermal Toxicity – Fixed Dose Procedure (2017)	(B.3.)
	Inhalation:	
	OECD Test Guideline 403: Acute Inhalation Toxicity (2009)	B.2.
	OECD Test Guideline 436: Acute Inhalation Toxicity – Acute Toxic Class Method	B.52.

	(2009)	
	OECD Test Guideline 433: Acute Inhalation Toxicity: Fixed Concentration Procedure (2018)	
Toksičnost kod ponavljanih doza	OECD Test Guideline 407: Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents (2008)	B.7.
	OECD Test Guideline 412: Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study (2018)	(B.8.)
	OECD Test Guideline 410: Repeated Dose Dermal Toxicity: 21/28-Day Study (1981)	B.9.
	OECD Test Guideline 422: Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test (2016)	B.64.
	OECD Test Guideline 408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents (2018)	(B.26.)
	OECD Test Guideline 409: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Non-Rodents (1998)	B.27.
	OECD Test Guideline 413: Subchronic Inhalation Toxicity: 90-Day Study (2018)	(B.29.)
	OECD Test Guideline 411: Subchronic Dermal Toxicity: 90-Day Study (1981)	B.28.
	OECD Test Guideline 452: Chronic Toxicity Studies (2018)	(B.30.)
	OECD Test Guideline 453: Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies (2018)	(B.33.)
Reproduktivna/razvojna toksičnost	OECD Test Guideline 443: Extended One-Generation Reproduction Toxicity Study (2018)	(B.56.)

	OECD Test Guideline 421: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test (2016)	B.63.
	OECD Test Guideline 422: Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test (2016)	B.64.
	OECD Test Guideline 414: Prenatal Developmental Toxicity Study (2018)	(B.31.)
Toksikokinetika	OECD Test Guideline 417: Toxicokinetics (2010)	B.36.
	OECD Test Guideline 428: Skin Absorption: *In Vitro* Method (2004)	B.45.
	OECD Test Guideline 427: Skin Absorption: *In Vivo* Method (2004)	B.44.
Karcinogenost	OECD Test Guideline 451: Carcinogenicity Studies (2018)	(B.32.)
	OECD Test Guideline 453: Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies (2018)	(B.33.)
	EU test method B.21. *In Vitro* Mammalian Cell Transformation Test	B.21.
(Razvojna) neurotoksičnost	OECD Test Guideline 424: Neurotoxicity Study in Rodents (1997)	B.43.
	OECD Test Guideline 426: Developmental Neurotoxicity Study (2007)	B.53.
	OECD Test Guideline 418: Delayed Neurotoxicity of Organophosphorus Substances Following Acute Exposure (1995)	B.37.
	OECD Test Guideline 419: Delayed Neurotoxicity of Organophosphorus Substances: 28-day Repeated Dose Study (1995)	B.38.

Svojstva endokrine disrupcije	*In vitro*	
	OECD Test Guideline 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonistsals (2021)	(B.66.)
	OECD Test Guideline 456: H295R Steroidogenesis Assay (2022)	B.57.
	OECD Test Guideline 458: Stably Transfected Human Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (2020)	
	OECD Test Guideline 493: Performance-Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hrER) *In Vitro* Assays to Detect Chemicals with ER Binding Affinity (2015)	B.70.
	In vivo	
	OECD Test Guideline 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents A short-term screening test for oestrogenic properties (2007)	B.54.
	OECD Test Guideline 441: Hershberger Bioassay in Rats, A Short-term Screening Assay for (Anti)Androgenic Properties (2009)	B.55.
Fototoksičnost	OECD Test Guideline 432: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test (2019)	(B.41.)
	OECD Test Guideline 495: Ros (Reactive Oxygen Species) Assay for Photoreactivity (2019)	
	OECD Test Guideline 498: *In*	

	Vitro Phototoxicity Test Method Using the Reconstructed Human Epidermis (RhE) (2021)	

TABELA 3.: ISPITNE METODE ZA EKOTOKSIKOLOŠKA SVOJSTVA

Krajnja tačka	**Ispitna metoda**	**Odgovarajuće poglavlje u dijelu C ovog Priloga koje sadrži potpuni opis ispitne metode (brojevi u zagradama znače da je poglavlje koje sadrži potpuni opis ispitne metode izbrisano iz dijela C, a prazno polje znači da u dijelu C ovog Priloga nema odgovarajuće ispitne metode)**
Toksičnost za vodenu životnu sredinu	OECD Test Guideline 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test (2011)	C.3.
	OECD Test Guideline 209: Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation) (2010)	C.11.
	OECD Test Guideline 224: Determination of the Inhibition of the Activity of Anaerobic Bacteria (2007)	C.34.
	OECD Test Guideline 244: Protozoan Activated Sludge Inhibition Test (2017)	
	OECD Test Guideline 221: Lemna sp. Growth Inhibition Test (2006)	C.26.
	OECD Test Guideline 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test (2004)	C.2.
	OECD Test Guideline 211: Daphnia magna Reproduction Test (2012)	C.20.
	OECD Test Guideline 203: Fish, Acute Toxicity Test (2019)	(C.1.)
	OECD Test Guideline 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test (2013)	C.47.
	OECD Test Guideline 215: Fish, Juvenile Growth Test (2000)	C.14.
	OECD Test Guideline 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (2013)	C.49.
	OECD Test Guideline 249: Fish Cell Line Acute Toxicity – the RTgill-W1 Cell Line Assay (2021)	
	OECD Test Guideline 242: Potamopyrgus antipodarum	

	Reproduction Test (2016)	
	OECD Test Guideline 243: Lymnaea stagnalis Reproduction Test (2016)	
Razgradnja	OECD Test Guideline 111: Hydrolysis as a Function of pH (2004)	C.7.
	OECD Test Guideline 301: Ready Biodegradability (1992)	C.4.
	OECD Test Guideline 302 A: Inherent Biodegradability: Modified SCAS Test (1981)	C.12.
	OECD Test Guideline 302B: Inherent Biodegradability: Zahn-Wellens/EMPA Test (1992)	(C.9.)
	OECD Test Guideline 302C: Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II) (2009)	
	OECD Test Guideline 303: Simulation Test – Aerobic Sewage Treatment – A: Activated Sludge Units; B: Biofilms (2001)	C.10.
	OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (1981)	
	OECD Test Guideline 306: Biodegradability in Seawater (1992)	C.42.
	OECD Test Guideline 307: Aerobic and Anaerobic Transformation in Soil (2002)	C.23.
	OECD Test Guideline 308: Aerobic and Anaerobic Transformation in Aquatic Sediment Systems (2002)	C.24.
	OECD Test Guideline 309: Aerobic Mineralisation in Surface Water – Simulation Biodegradation Test (2004)	C.25.
	OECD Test Guideline 310: Ready Biodegradability - CO_2 in sealed vessels (Headspace Test) (2014)	C.29.
	OECD Test Guideline 311: Anaerobic Biodegradability of Organic Compounds in Digested Sludge: by Measurement of Gas Production (2006)	C.43.
	OECD Test Guideline 314: Simulation Tests to Assess the Biodegradability of Chemicals	

	Discharged in Wastewater (2008)	
	OECD Test Guideline 316: Phototransformation of Chemicals in Water – Direct Photolysis (2008)	
	EU test method C.5. Degradation – Biochemical Oxygen Demand	C.5.
	EU test method C.6. Degradation – Chemical Oxygen Demand	C.6.
Sudbina i ponašanje u životnoj sredini	OECD Test Guideline 305: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure (2012)	C.13.
	OECD Test Guideline 315: Bioaccumulation in Sediment-Dwelling Benthic Oligochaetes (2008)	C.46.
	OECD Test Guideline 317: Bioaccumulation in Terrestrial Oligochaetes (2010)	C.30.
	OECD Test Guideline 318: Dispersion Stability of Nanomaterials in Simulated Environmental Media (2017)	
	OECD Test Guideline 121: Estimation of the Adsorption Coefficient (Koc) on Soil and on Sewage Sludge using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (2001)	C.19.
	OECD Test Guideline 106: Adsorption – Desorption Using a Batch Equilibrium Method (2000)	C.18.
	OECD Test Guideline 312: Leaching in Soil Columns (2004)	C.44.
	OECD Test Guideline 313: Estimation of Emissions from Preservative – Treated Wood to the Environment (2007)	C.45.
	OECD Test Guideline 319 A: Determination of In Vitro Intrinsic Clearance Using Cryopreserved Rainbow Trout Hepatocytes (RT-HEP) (2018)	
	OECD Test Guideline 319B: Determination of In Vitro Intrinsic Clearance Using Rainbow Trout Liver S9 Sub-Cellular Fraction (RT-S9) (2018)	

	OECD Test Guideline 320: Anaerobic Transformation of Chemicals in Liquid Manure (2022)	
Efekti na kopnene organizme	OECD Test Guideline 216: Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test (2000)	C.21.
	OECD Test Guideline 217: Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test (2000)	C.22.
	OECD Test Guideline 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests (1984)	C.8.
	OECD Test Guideline 222: Earthworm Reproduction Test (Eisenia fetida/Eisenia andrei) (2016)	(C.33.)
	OECD Test Guideline 220: Enchytraeid Reproduction Test (2016)	(C.32.)
	OECD Test Guideline 226: Predatory Mite (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) Reproduction Test in Soil (2016)	(C.36.)
	OECD Test Guideline 232: Collembolan Reproduction Test in Soil (2016)	(C.39.)
	OECD Test Guideline 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test (2006)	C.31.
	OECD Test Guideline 227: Terrestrial Plant Test: Vegetative Vigour Test (2006)	
Efekti na organizme koji žive u sedimentu	OECD Test Guideline 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment (2004)	C.27.
	OECD Test Guideline 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water (2004)	C.28.
	OECD Test Guideline 233: Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment (2010)	C.40.
	OECD Test Guideline 235: Chironomus sp., Acute Immobilisation Test (2011)	
	OECD Test Guideline 225: Sediment-Water Lumbriculus Toxicity	C.35.

	Test Using Spiked Sediment (2007)	
	OECD Test Guideline 238: Sediment-Free Myriophyllum Spicatum Toxicity Test (2014)	C.50.
	OECD Test Guideline 239: Water-Sediment Myriophyllum Spicatum Toxicity Test (2014)	C.51.
Efekti na ptice	OECD Test Guideline 205: Avian Dietary Toxicity Test (1984)	
	OECD Test Guideline 206: Avian Reproduction Test (1984)	
	OECD Test Guideline 223: Avian Acute Oral Toxicity Test (2016)	
Efekti na insekte	OECD Test Guideline 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test (1998)	C.16.
	OECD Test Guideline 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test (1998)	C.17.
	OECD Test Guideline 237: Honey Bee (Apis Mellifera) Larval Toxicity Test, Single Exposure (2013)	
	OECD Test Guideline 245: Honey Bee (Apis Mellifera L.), Chronic Oral Toxicity Test (10-Day Feeding) (2017)	
	OECD Test Guideline 246: Bumblebee, Acute Contact Toxicity Test (2017)	
	OECD Test Guideline 247: Bumblebee, Acute Oral Toxicity Test (2017)	
	OECD Test Guideline 228: Determination of Developmental Toxicity to Dipteran Dung Flies (Scathophaga stercoraria L. (Scathophagidae), Musca autumnalis De Geer (Muscidae)) (2016)	
Svojstva endokrine disrupcije	OECD Test Guideline 230: 21-Day Fish Assay (2009)	C.37.
	OECD Test Guideline 229: Fish Short Term Reproduction Assay (2012)	C.48.
	OECD Test Guideline 231: Amphibian Metamorphosis Assay (2009)	C.38.

	OECD Test Guideline 234: Fish Sexual Development Test (2011)	C.41.
	OECD Test Guideline 240: Medaka Extended OneGeneration Reproduction Test (MEOGRT) (2015)	C.52.
	OECD Test Guideline 241: The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA) (2015)	C.53.”
	OECD Test Guideline 248: Xenopus Eleutheroembryonic Thyroid Assay (XETA) (2019)	
	OECD Test Guideline 250: EASZY assay – Detection of Endocrine Active Substances, Acting Through Estrogen Receptors, Using Transgenic tg(cyp19a1b:GFP) Zebrafish embrYos (2021)’	
	OECD Test Guideline 251: Rapid Androgen Disruption Activity Reporter (RADAR) Assay (2022)”;	

A.1. METODE ISPITIVANJA FIZIČKIH I HEMIJSKIH SVOJSTAVA HEMIKALIJA

TEMPERATURA TOPLJENJA/MRŽNJENJA

DIO I

1. Metoda ispitivanja

Metoda ispitivanja temperature topljenje/mržnjenja zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD1 (Organizacija za ekonomsku kooperaciju i razvoj).

1.1. Uvod

Metode iz tačke 1.4. primjenjuju se za određivanje temperature topljenja supstanci, bez ograničenja u pogledu stepena čistoće.
Izbor metode zavisi od prirode supstance koja se ispituje. Ograničavajući faktor je da li se supstanca može sprašiti lako, teško ili se ne može sprašiti.

1.2. Definicije i mjerne jedinice

Temperatura topljenja je temperatura na kojoj se odvija fazni prelaz iz čvrstog u tečno stanje na atmosferskom pritisku. Fazni prelaz iz čvrstog u tečno stanje mnogih supstanci dešava se u temperaturnom opsegu, pa se on često opisuje kao opseg topljenja.

Prevođenje jedinica (K u °C): t = T -273,15 gdje je: t temperatura u stepenima Celzijusa (C) ǐ T termodinamička temperatura u stepenima Kelvina (K).

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance se ne koriste svaki put kada se ispituje nova supstanca, već služe za povremenu provjeru metode i da omoguće poređenje sa rezultatima dobijenim drugim metodama.

1.4. Princip metode

Osnovni princip metode je određivanje temperature (temperaturnog opsega) faznog prelaza iz čvrstog u tečno stanje ili iz tečnog u čvrsto stanje.
U praksi se određuju temperature početne i finalne faze topljenja/mržnjenja, zagrijavanjem/hlađenjem uzorka supstance koja se ispituje na atmosferskom pritisku.

1.4.1. Metoda određivanja temperature topljenja u kapilari

1.4.1.1. Uređaji za određivanje temperature topljenja u kupatilu sa tečnošću

Mala količina fino sprašene supstance stavlja se u kapilaru i sabije. Kapilara se zagrijeva, zajedno sa termometrom, a porast temperature se podešava na manje od oko 1 K/min za vrijeme topljenja, i određuje se početna i završna temperatura topljenja.

1.4.1.2. Temperatura topljenja u uređajima sa metalnim blokom

Temperatura topljenja u uređajima sa metalnim blokom određuje se u postupku datom u tački
1.4.1.1. ove metode, osim što se kapilarna cijev i termometar stavljaju u metalni blok koji se zagrijeva i posmatraju se kroz otvore u bloku.

1.4.1.3. Fotoćelijska detekcija

Uzorak supstance se nalazi u kapilari i zagrijeva se automatski u metalnom cilindru. Zrak svijetlosti se usmjerava kroz supstancu kroz otvor na cilindru, na precizno kalibrisanu fotoćeliju. Optičke osobine većine supstanci se prilikom topljenja mijenjaju od neprovidnosti do providnosti. Intenzitet svijetlosti koja dolazi do fotoćelije raste i šalje signal za zaustavljanje na digitalni indikator gdje se očitava temperatura sa rezistentnog (otpornog) termometra od platine koji je smješten u komori za zagrijavanje. Ova metoda nije pogodna za jako obojene supstance.

1.4.2. Metoda ploče za grijanje sa postepenim zagrijavanjem

1.4.2.1. Određivanje temperature topljenja po Kofleru

Za određivanje temperature topljenja po Kofleru koriste se dvije metalne šipke različite termičke provodljivosti, koje se zagrijavaju pomoću električne struje. Poluga je izvedena na

način da je temperaturni gradijent uglavnom linearan na cijeloj njenoj dužini. Temperatura vrele poluge može biti između 283 K i 573 K sa specijalnim uređajem za očitavanje temperature, koji uključuje i klizač sa pokazivačem i indikatorom napravljenim specijalno za tu polugu. Da bi se odredila temperatura topljenja, supstanca se u tankom sloju nanosi direktno na površinu vrele poluge. U roku od nekoliko sekundi pojavljuje se oštra linija razdvajanja između tečnosti i čvrste faze. Temperatura na liniji razdvajanja očitava se na način da se pokazivač podesi na liniju u mirnom položaju.

1.4.2.2. Mikroskop za određivanje temperature topljenja

Mikroskopi sa pločama za grijanje sa postepenim zagrijavanjem koriste se kada se određuju temperature topljenja malih količina supstanci. Kod većine ploča za grijanje temperatura se mjeri osjetljivim termoelementom, a ponekad se koriste i termometri sa živom. Tipičan uređaj za određivanje temperature topljenja na ploči za grijanje sa postepenim zagrijavanjem sa mikroskopom ima komoru za zagrijavanje unutar koje se nalazi metalna ploča na koju se nanosi uzorak na pokrivnoj (kliznoj) staklenoj pločici. U centru metalne ploče nalazi se otvor kroz koji prolazi svijetlost sa osvjetljenog ogledala mikroskopa. Kada se koristi, komora je zatvorena staklenom pločom koja sprječava prodor vazduha do uzorka. Zagrijavanje uzorka se reguliše reostatom. Za veoma precizna mjerenja optički anizotropnih supstanci može se koristiti polarizovano svijetlo.

1.4.2.3. Menisk metoda

Menisk metoda se koristi za poliamide. Temperatura na kojoj se istiskuje menisk silikonskog ulja, koje je zatvoreno između ploče za grijanje i staklenog poklopca i uz pomoć uzorka poliamida koji se ispituje, određuje se vizuelno.

1.4.3. Metoda određivanja temperature mržnjenja

Uzorak supstance se stavlja u posebnu cijev (epruvetu) za ispitivanje i smješta se u aparat za
određivanje temperature mržnjenja. Uzorak se polako i neprestano miješa za vrijeme hlađenja, a temperatura se mjeri u odgovarajućim intervalima. Kada temperatura postane konstantna u nekoliko očitavanja, ta temperatura (korigovana za vrijednost greške termometra) bilježi se kao temperatura mržnjenja. Prehlađivanje se izbjegava održavanjem ravnoteže između čvrste i tečne faze.

1.4.4. Metoda termalne analize

1.4.4.1 Diferencijalna termalna analiza (DTA)

Diferencijalnom termalnom analizom (DTA) bilježe se razlike u temperaturama supstance i referentnog materijala, u funkciji od temperature, kada se supstanca i referentni materijal podvrgavaju istom kontrolisanom temperaturnom programu. Kada uzorak prolazi fazni prelaz, dolazi do promjene entalpije, a ta promjena se očitava putem endotermnog (za topljenje) ili egzotermnog (za mržnjenje) odstepena zabilježene temperature od bazne linije.

1.4.5. Metoda određivanja temperature tečenja

Metoda određivanja temperature tečenja se koristi za naftna ulja i kod uljastih supstanci koje imaju niske temperature topljenja. Poslije pripremnog zagrijevanja, uzorak se hladi po specifičnom režimu i u intervalima od 3 K ispituju se karakteristike protoka. Najniža temperatura pri kojoj se uočava kretanje supstance bilježi se kao temperatura tečenja.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Primjenljivost i preciznost različitih metoda koje se koriste za određivanje temperature topljenja/opsega topljenja date su u Tabelama 1, 2, 3 i 4.

Tabela 1: Metoda određivanja temperature topljenja u kapilarii

Metoda mjerenja	Supstance koje se mogu fino sprašiti	Supstance koje nisu fino sprašene	Temperaturni opseg	Procijenjena preciznost[1]
Uređaji sa kupatilom sa tečnošću	da	mali broj	273 K do 573 K	±0,3 K
Uređaji sa metalnim blokom II	da	mali broj	933 K do > 573 K	±0,5 K
Fotoćelijska detekcija	da	veći broj uz uređaja za primjenu	253 K do 573 K	±0,5 K

Tabela 2. Metoda grejne ploče sa postepenim zagrijavanjem i metoda određivanja temperature mržnjenja

Metoda mjerenja	Supstance koje se mogu fino sprašiti	Supstance koje nisu fino sprašene	Temperaturni opseg	Procijenjena preciznost[2]
Koflerova III metoda	da	ne	283 K do > 573 K	± 1K

[1] Zavisi od vrste instrumenta i od stepena čistoće supstance

[2] Zavisi od vrste instrumenta i od stepena čistoće supstance

[3] Zavisi od vrste instrumenta i od stepena čistoće supstance

[2] Zavisi od vrste instrumenta i od stepena čistoće supstance

[4] Zavisi od vrste instrumenta i od stepena čistoće supstance

Mikroskopske metode	da	mali broj	293 K do > 573 K	± 0,5 K
Menisk metoda	ne	specifična za poliamide	293 K do > 573 K	± 0,5 K
Temperatura mržnjenja	da	da	223 K do 573 K	± 0,5 K

Tabela 3. Metoda termalne analize

Metoda mjerenja	Supstance koje se mogu fino sprašiti	Supstance koje nisu fino sprašene	Temperaturni opseg	Procijenjena preciznost[3]
Diferencijalna termalna analiza	da	da	173 K do 1723 K	do 600 K ± 0,5 K Od 600 K do 1273 K ± 2,0 K
Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija	da	da	173 K do 1723 K	do 600 K ± 0,5 K Od 600 K do 1273 K ± 2,0 K

Tabela 4. Metoda određivanja temperature tečenja

Metoda mjerenja	Supstance koje se mogu fino sprašiti	Supstance koje nisu fino sprašene	Temperaturni opseg	Procijenjena preciznost[4]
Temperatura tečenja	za naftne proizvode I uljaste supstance	za naftne proizvode I uljaste supstance	223 do 323 K	± 0,3 K

1.6. Opis metoda

Metode ispitivanja zasnivaju se na standardima datim u Dijelu II – „Dodatni tehnički podaci‖ .

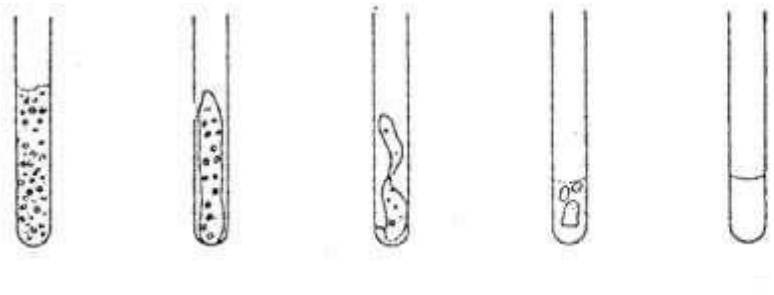
1.6.1. Metoda određivanja temperature topljenja u kapilari

Sprašene supstance kada se izlože sporijem rastu temperature obično prolaze kroz faze topljenja date na **Slici 1**. (faza A (početak topljenja) - faza u kojoj sitne kapljice jednolično prianjaju na unutrašnji zid kapilarne cijevi; faza B -faza u kojoj se javlja prostor između uzorka i unutrašnjeg zida usled sakupljanja istopljene materije; faza C -faza u kojoj sakupljeni uzorak počinje da pada naniže i da prelazi u tečno stanje; faza D jeste faza u

[3] Zavisi od vrste instrumenta i od stepena čistoće supstance

[4] Zavisi od vrste instrumenta i od stepena čistoće supstance

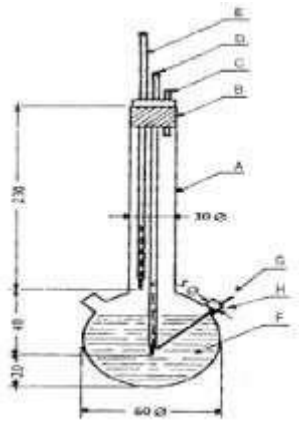
kojoj se na površini formira menisk, iako izvjesna količina uzorka i dalje ostaje u čvrstom stanju; faza E - završna faza topljenja u kojoj nema čvrstih čestica)



Tokom određivanja temperature topljenja, temperature se bilježe na početku topljenja (faza A) i u završnoj fazi (faza E).

1.6.1.1. Uređaji za određivanje temperature topljenja u kupatilu sa tečnošću

Na Slici 2. dat je standardni aparat od stakla za određivanje temperature topljenja. Sve dimenzije date su u milimetrima.



Slika 2. (A - sud za mjerenje; B - zapušač; C - oduška; D – termometar X; E - pomoćni termometar; F - kupatilo sa tečnošću; G - staklena kapilara dužine 80 mm do 100 mm, unutrašnjeg prečnika 1,0 mm 0,2 mm, debljine zida 0,2 mm do 0,3 mm; H - bočna cijev)

Kupatilo sa tečnošću

Za kupatilo sa tečnošću je potrebnoizabrati odgovarajuću tečnost. Izbor tečnosti zavisi od temperature topljenja koja se određuje, npr. tečni parafin za temperature topljenja ispod 473 K, silikonsko ulje za temperature topljenja ispod 573 K. Za temperaturee topljenja iznad 523 K, koristi se smješa koja se sastoji od tri dijela sumporne kiseline i dva dijela kalijum-sulfata (maseni odnosi). Pri korišćenju ovakve smješe potrebno je preduzeti sve mjere predostrožnosti.

Postupak

Suva supstanca se fino spraši u posudi i ubacuje se u kapilaru, zatvorenu na jednom kraju, tako da nivo punjenja bude oko 3 mm nakon što se čvrsto napakuje. Da se dobije homogeno

spakovani uzorak, kapilarna cijev se ispušta vertikalno kroz staklenu cijev, sa visine od oko 700 mm, na sahatno staklo. Napunjena kapilara se stavlja u kupatilo tako da srednji deo rezervoara sa živom termometra dodiruje kapilaru u dijelu u kom je smješten uzorak. Obično se kapilara stavlja u aparat na oko 10 K ispod temperature topljenja. Kupatilo sa tečnošću se zagrijava tako da temperatura raste približno 3 K/min. Tečnost treba miješati. Na oko 10 K ispod očekivane temperature topljenja brzina rasta temperature se podešava na maksimalno 1 K/min.

Izračunavanje

Izračunavanje temperature topljenja vrši se na sljedeći način:

$$T = TD + 0{,}00016\ (TD - TE)\ n$$

gdje je: T korigovana temperatura topljenja u K; TD temperatura očitana na termometru D u K; TE temperatura očitana na termometru E u K; n broj podeoka živinog stuba na termometru D sa Slike 2. čije je stablo uronjeno u kupatilo.

1.6.1.2 Uređaji za određivanje temperature topljenja sa metalnim blokom

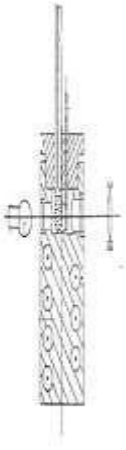
Aparatura

Aparatura se sastoji od:

- Cilindričnog metalnog bloka, čiji je gornji dio šupalj i formira komoru (Slika 3); Metalnog poklopca, sa dva ili više otvora kroz koje se mogu ubaciti cijevi u metalni blok; Sistema za grijanje metalnog bloka snabdjevenim npr. električnim otpornikom smještenim u bloku;
- Reostata (otpornika) za regulaciju struje, ukoliko se koristi grijanje na struju;
- Četiri prozora od stakla otpornog na toplotu na bočnim zidovima komore, koji su međusobno postavljeni pod pravim uglom. Ispred jednog od prozora postavljen je okular za posmatranje kapilarne cijevi. Ostala tri prozora su postavljena radi osvjetljavanja unutrašnjosti pomoću lampi;
- Kapilarne cijevi od stakla otpornog na toplotu, zatvorene na jednom kraju.

Termometar

Za termometre se primjenjuju standarde iz Dijela II – „Dodatni tehnički podaci‖ i termo-električni mjerni uređaji sa uporedivom (sličnom) tačnošću.



Slika 3.

1.6.1.3. Fotoćelijska detekcija

Aparatura i procedura

Aparatura se sastoji od metalne komore sa automatskim sistemom grijanja. Tri kapilare se pripremaju u skladu sa dijelom 1.6.1.1. ove metode i stavljaju se u peć. Za kalibraciju aparata na rapolaganju je nekoliko linearnih povećanja temperature (temperaturnih programa). Odgovarajući porast temperature se električno podešava na osnovu prethodno izabrane konstantne i linearne brzine. Pokazivači bilježe i pokazuju trenutnu temperaturu u peći i temperature supstance u kapilarama.

1.6.2. Metoda ploče za grijanje sa postepenim zagrijavanjem

1.6.2.1. Određivanje temperature topljenja po Kofleru

Određivanje temperature topljenja po Kofleru je u skladu sa Dijelom II „Dodatni tehnički podaci‖ .

1.6.2.2. Mikroskop za određivanje temperature topljenja

Za mikroskop za određivanje temperature topljenja primjenjuju se standardi iz Dijela II „Dodatni tehnički podaci‖ .

1.6.2.3. Menisk metoda (za poliamide)

Menisk metoda (za poliamide) je u skladu sa Dijelom II „Dodatni tehnički podaci‖ i brzina zagrijevanja oko temperature topljenja je manja od 1 K/min.

1.6.3. Metoda određivanja temperature mržnjenja

Metoda određivanja temperature mržnjenja je u skladu sa Dijelom II „Dodatni tehnički podaci‖ .

1.6.4. Metoda termalne analize

1.6.4.1. Diferencijalna termalna analiza Diferencijalna termalna analiza je u skladu sa Dijelom II „Dodatni tehnički podaci‖ .

1.6.4.2. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija je u skladu sa Dijelom II „Dodatni tehnički podaci‖ .

1.6.5. Metoda određivanja temperature tečenja Metoda određivanja temperature tečenja je u skladu sa Dijelom II „Dodatni tehnički podaci‖ .

2. Podaci

U nekim slučajevima neophodno je izvršiti korekciju termometra.

3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:

- korišćenoj metodi;
- preciznom opisu supstance (identitet i nečistoće) i korake prethodnih prečišćavanja, ukoliko ih je bilo;

- procjeni preciznosti.

Srednja vrijednost najmanje dva mjerenja koja su u opsegu procjenjene preciznosti (tabela) navodi se kao temperatura topljenja. Ukoliko je razlika između temperature na početku i na kraju završne faze topljenja u granicama preciznosti metode, temperatura u završnoj fazi topljenja se uzima kao temperatura topljenja. Ukoliko navedena razlika nije u granicama preciznosti metode, u izvještaju se navode dve temperature.

Ukoliko se supstanca razloži ili sublimuje pre postizanja temperature topljenja, navodi se temperatura na kojoj je uočen efekat. U izvještaju se navode svi podaci i primjedbe važne za tumačenje rezultata, naročito podaci o nečistoćama i fizičkom stanju supstance.

DODATNI TEHNIČKI PODACI
DIO II

Dodatni tehnički podaci sadržani su u sljedećim standardima:

1. Metoda grejne ploče sa postepenim zagrijavanjem

1.1. Određivanje temperature topljenja po Kofleru

MEST ANSI/ASTM D 3451- 76 - Standarna preporučena praksa za testiranje polimernih premaza u prahu

2. Metoda određivanja temperature mržnjenja

MEST ISO 2207 - Vosak: određuje temperaturu smrzavanja
MEST ISO 1392 - Metoda za određivanje tačke zamrzavanja

3. Metoda određivanje temperature tečenja

MEST ISO 3016 - Određivanje stinjavanja nafte

A.2. TEMPERATURA KLJUČANJA

DIO I

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

Metode iz tačke 1.4. primjenjiuju se na tečne supstance i supstance sa niskom temperaturom topljenja, pod uslovom da ne podliježu hemijskoj reakciji na temperaturama ispod temperature ključanja (npr. autooksidacija, premještanja, razlaganje itd.). Metode se primjenjuju na tečne supstance koje su čiste, kao i na one koje sadrže nečistoće.

Naglasak je na metodama koje koriste fotoćelijsku detekciju i termalnu analizu, jer metode omogućavaju određivanje temperatura topljenja, kao i temperatura ključanja. Mjerenja mogu da se vrše automatski. Dinamička metoda koja je data u ovom prilogu ima prednost da se može primjenjivati i za određivanje napona pare i nije neophodno vršiti korekciju temperature

ključanja na normalni pristisak (101,325 kPa), jer se normalan pritisak može podešavati pomoću manostata za vrijeme mjerenja.[5]

1.2. Definicije i mjerne jedinice

Normalna temperatura ključanja je temperatura pri kojoj je napon pare tečnosti 101,325 kPa. Ukoliko se temperatura ključanja ne mjeri pri normalnom atmosferskom pristisku, zavisnost temperature od pritiska pare opisuje se preko Klauzijus– Klapejronove jednačine:

$$\text{Log } p = \frac{\Delta H_v}{2.3RT} + konst.$$

gdje je: p pritisak pare supstance u paskalima; Hv jeste toplota isparenja u J mol-1; R univerzalna gasna konstanta koja iznosi 8,314 J mol^{-1} K^{-1}; T termodinamička temperatura u stepenima Kelvina
(K); Temperatura ključanja se navodi uz uzimanje u obzir ambijentalnog pritiska za vrijeme mjerenja.

Prevođenje jedinica:

Pritisak (mjerna jedinica: kPa): 100 kPa = 1; bar = 0,1 MPa (Dozvoljava se korišćenje mjerne jedinice „bar—, ali se ne preporučuje). 133 Pa = 1 mm; Hg = 1 Torr (Ne dozvoljava se korišćenje mjerne jedinice „mm Hg— i „Torr‖). 1 atm = standaradna atmosfera = 101 325 Pa (Ne dozvoljava se korišćenje mjerne jedinice „atm‖). Temperatura (mjerna jedinica: K): t = T - 273,15 gdje je: t temperatura u stepenima Celzijusa (C); T termodinamička temperatura u stepenima Kelvina (K).

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance se ne koriste svaki put kada se ispituje nova supstanca i prvenstveno služe za povremenu provjeru metode i da omoguće poređenje sa rezultatima dobijenim drugim metodama.

1.4. Princip metode

1.4.1. Mjerenje temperature ključanja

1.4.1.1. Određivanje temperature ključanja upotrebom ebuliometra

Ebuliometri su izvorno razvijeni za određivanje molekulske težine na osnovu povećanja tačke ključanja, ali su pogodni i za mjerenja tačne ključanja. Tečnost se zagrijava u ovom aparatu, pri ravnotežnim uslovima, na atmosferskom pritisku sve do ključanja.

1.4.1.2. Dinamička metoda

[5] Uticaj nečistoća na određivanje temperature ključanja u velikoj mjeri zavisi od prirode nečistoće. Kada su u uzorku prisutne isparljive nečistoće koje mogu uticati na rezultat, supstanca se može prečistiti.

Ova metoda obuhvata mjerenje temperature pri kojoj dolazi do ponovne kondenzacije pare pomoću odgovarajućeg termometra u povratnom toku za vrijeme ključanja. Kod ove metode može biti varijacija u pritisku.

1.4.1.3. Metoda destilacije za određivanje temperature ključanja

Ova metoda obuhvata destilaciju tečnosti i mjerenje temperature pri kojoj dolazi do ponovne kondenzacije pare i određivanje količine destilata.

1.4.1.4. Metoda određivanja temperature ključanja po Sivolobofu

Uzorak se zagrijava u cijevi (epruveti) za uzorak, koja je uronjena u tečnost kupatila za grijanje. Zatopljena kapilara, koja ima vazdušni mjehur u donjem dijelu, spušta se u cijev (epruvetu) za uzorke.

1.4.1.5. Fotoćelijska detekcija

Radi na principu metode određivanja temperature ključanja po Sivolobofu uz automatsko fotoelektrično mjerenje rastućih mehura.

1.4.2. Termalna analiza

1.4.2.1. Diferencijalna termalna analiza

Diferencijalnom termalnom analizom bilježi se temperaturna razlika između supstance i referentnog materijala kao funkcije temperature, dok se supstanca i referentni materijal izlažu istom kontrolisanom temperaturnom programu. Kada uzorak prolazi fazni prelaz, dolazi do promjene entalpije, a ta promjena se očitava putem endotermnog odstepena (ključanje) zabilježene temperature od bazne linije.

1.4.2.2. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

Diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom bilježi se razlika u promjeni energije (toplote) u supstanci i referentnom materijalu u funkciji od temperature, dok se supstanca i referentni materijal izlažu istom kontrolisanom temperaturnom programu. Ova energija je energija neophodna za uspostavljanje nulte temperaturne razlike između supstance i referentnog materijala. Kada uzorak prođe fazni prelaz, praćen promjenom entalpije, takva promjena se prikazuje endotermnim odstepenem ključanje) zabilježenog protoka toplote od bazne linije.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Primjenljivost i preciznost različitih metoda koje se koriste za određivanje temperature ključanja/opsega ključanja navedeni su u Tabeli 1.

Tabela 1. Poređenje metoda

Metoda mjerenja	Procijenjena tačnost
Ebuliometar	± 1,4 K (do 373 K) ± 2,5 K (do 600 K)

Dinamička metoda	± 0,5 K (do 600 K)
Destilacija	± 0,5 K (do 600 K)
Metoda po Sivolobofu	± 2 K (do 600 K)
Fotoćelijska detekcija	± 0,3 K (do 373 K)
Diferencijalna termalna analiza	± 0,5 K (do 600 K) ± 2,0 K (do 1273 K)
Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija	± 0,5 K (do 600 K) ± 2,0 K (do 1273 K

1.6. Opis metoda

Metode ispitivanja zasnivaju se na standardima datim u Dijelu II – —Dodatni tehnički podaci‖ .

1.6.1. Mjerenje temperature ključanja

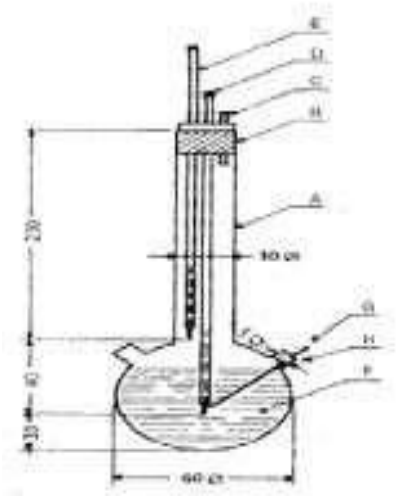
1.6.1.1. Određivanje temperature ključanja upotrebom ebuliometra

Određivanje temperature ključanja upotrebom ebuliometra je u skladu sa standardima datim u Dijelu II – —Dodatni tehnički podaci‖ .

1.6.1.2. Dinamička metoda

Dinamička metoda je u skladu sa metodom ispitivanja A.4. za određivanje napona pare koja je data u ovom prilogu i bilježi se temperatura ključanja uočena na primjenjenom pritisku od 101,325 kPa.

1.6.1.3. Metoda destilacije za određivanje temperature ključanja (opsega ključanja)
Metoda destilacije za određivanje temperature ključanja (opsega ključanja) je u skladu sa standardima datim u Dijelu II – —Dodatni tehnički podaci‖ .



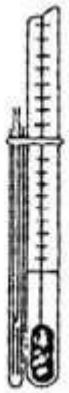
gdje je: A sud za mjerenje; B zapušač; C oduška; D termometar; E pomoćni termometar; F kupatilo sa tečnošću; G staklena kapilara za uzorak poljnjeg prečnika maksimalno 5 mm,

dužine približno 100 mm, unutrašnjeg prečnika 1 mm i debljine zida 0,2 mm do 0,3 mm; H bočna cijev.

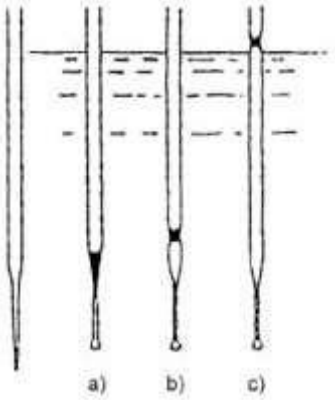
1.6.1.4. Metoda određivanja temperature ključanja po Sivolobofu

Uzorak supstance se zagrijava u aparatu za određivanje tačke topljenja u staklenoj kapilari za uzorke, prečnika oko 5 mm (Slika1.). Na slici 1. Dat je tip standardizovanih aparata za određivanje temperatura topljenja i ključanja. Aparati su napravljeni od stakla. Sve dimenzije na slici 1. date su u milimetrima.

Kapilara (za kapilarno ključanje) zatopljena na oko 1 cm iznad donjeg dijela stavlja se u kapilaru za uzorak. Nivo do kojeg se dodaje supstanca koja se ispituje je takav da je zatopljeni dio unutrašnje kapilare ispod površine tečnosti. Kapilara za uzorke koja sadrži kapilaru za ključanje pričvršćuje se za termometar gumenim kaišem ili se fiksira držačima sa strane (Slika 2.).



Slika 2. Postupak prema Sivolobofu



Slika 3. Modifikovani postupak

Tečnost za kupatilo bira se u skladu sa temperaturom ključanja. Za temperature do 573 K može se koristiti silikonsko ulje. Tečni parafin se koristiti samo do 473 K. Grijanje kupatila sa tečnošću se podesi na početku na porast temperature od 3 K/min. Tečnost u kupatilu se miješa. Na oko 10 K ispod očekivane temperature ključanja grijanje se smanjuje, tako da porast temperature bude manji od 1 K/min. Po postizanju temperature ključanja, iz kapilare za ključanje se brzo pojavljuju mjehurići.

Temperatura ključanja je ona temperatura pri kojoj uz momentalno hlađenje niz mjehurića se prekida i tečnost počne da se penje u kapilaru. Odgovarajuća očitana temperatura na termometru predstavlja tačku ključanja supstance. Kod modifikovanog principa (Slika 3.) temperatura ključanja se određuje u kapilari za određivanje temperature topljenja. Kapilara se sužava do završne tačke u dužini od oko 2 cm (a) i unosi se mala količina uzorka. Otvoreni kraj kapilare je zatopljen tako da na dnu zaostaje mali mjehur vazduha. Zagrijavanjem uzorka mjehur vazduha se širi (b). Temperatura ključanja je temperatura na kojoj supstanca dostigne nivo tečnosti u kupatilu (c). 1.6.1.5. Fotoćelijska detekcija

Uzorak supstance se zagrijava u kapilarnoj cijevi unutar zagrijanog metalnog bloka.

Snop svijetlosti se usmerava kroz supstancu, kroz odgovarajuće otvore u bloku, na precizno kalibrisanu fotoćeliju.

U toku porasta temperature uzorka pojavljuju se pojedinačni mjehurići iz kapilare za ključanje. Kada se postigne temperatura ključanja, broj mjehurića naglo raste. Ovo uzrokuje promjenu u intenzitetu svijetlosti, što bijeleži fotoćelija i indikatoru daje signal za zaustavljanje, uz očitavanje temperature na platinskom otpornom termometru koji se nalazi u bloku.

Ova metoda omogućava određivanja temperature ključanja ispod sobne temperature i do 253,15 K
(-20 °C) bez promjena u aparatu. Samo je potrebno instrument smještiti u kupatilo za hlađenje.

1.6.2. Termalna analiza

1.6.2.1. Diferencijalna termalna analiza

Metoda diferencijalne termalne analize zasniva se na standardima datim u Dijelu II – —Dodatni tehnički podaci‖ .

1.6.2.2. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

Metoda diferencijalne skenirajuće kalorimetrije zasniva se na standardima datim u Dijelu II – —Dodatni tehnički podaci‖ .

2. Podaci

Pri malim odstepenima od normalnog pritiska (maksimalno ± 5 kPa), temperature ključanja se normalizuju do T_n pomoću sljedeće Sidni Jangove jednačine sa vrijednošću brojeva: $T_n = T + (f_T \times \Delta p)$

gdje je: Δp razlika: 101,325 - p (obratiti pažnju na znak +/-); p izmjereni pritisak u kPa; f_T j brzina promjene temperature ključanja sa pritiskom u K/kPa; T izmjerena temperatura ključanja u stepenima Kelvina (K); T_n temperatura ključanja korigovana na normalan pritisak u stepenima Kelvina (K).

Faktori korekcije temperature (f_T) i jednačine za njihovu aproksimaciju uključeni su u međunarodne i nacionalne standarde za mnoge supstance.

Tabela 2: Faktori korekcije temperature f_T

Temperatura T (K)	Faktor korekcije f_T (K/kPa)
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,43
548,15	0,45
573,15	0,47

3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju, sadrži podatke o:

- korišćenoj metodi;
- preciznom opisu supstance (identitet i nečistoće) i koracima prethodnih prečišćavanja, ukoliko ih je bilo;
- procjeni preciznosti.

Srednja vrijednost najmanje dva mjerenja koja su u opsegu procijenjene tačnosti (Tabela 1) navodi se kao temperatura ključanja. Navode se izmjerene temperature ključanja i njihove srednje vrijednosti, a pritisak, odnosno pritisci pri kojima su izvršena mjerenja navode se u kPa.

Pritisak je blizu normalnog atmosferskog pritiska.

U izvještaju se navode svi podaci i napomene relevantne za tumačenje rezultata, naročito one koje se odnose na nečistoće i fizičko stanje supstance.

DODATNI TEHNIČKI PODACI
DIO II

Dodatni tehnički podaci sadržani su u sljedećim standardima:

1. Metoda destilacije za određivanje temperature ključanja (opseg ključanja)

MEST ISO/R 918 - Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range)

A.3. RELATIVNA GUSTINA

DIO I

1. Metoda ispitivanja

Metode ispitivanja zasnivaju se na Uputstvu za ispitivanje OECD1. Ekvivalentna međunarodna ispitna metoda ili druge primjenjive ispitne metode za predmetnu krajnju tačku navedene su u tabeli 1 dijela 0.

1.1. Uvod

Metode iz tačke 1.4 za određivanje relativne gustine mogu se primjenjivati na čvrste i tečne supstance, bez ograničenja u pogledu njihovog stepena čistoće.

1.2. Definicije i mjerne jedinice

Relativna gustina D^{20}_4 za čvrste ili tečne supstance je odnos između mase, zapremine supstance koja se ispituje (određene na 20° C) i mase iste zapremine vode (određene na 4°C). Relativna gustina nema dimenziju.

Gustina (ρ) supstance je količnik mase (m) i zapremine (v) supstance. Gustina (ρ) supstance se u MeĐunarodnom sistemu jedinica (SI) izražava u kg/m^3.

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance ne koriste se svaki put kada se ispituje nova supstanca. One prvenstveno služe za povremenu provjeru metode i da omoguće poređenje sa rezultatima dobijenim drugim metodama.

1.4. Princip metode

1.4.1. Metoda potiska

1.4.1.1. Areometar (za tečne supstance)

Dovoljno tačno i brzo određivanje gustine dobija se pomoću plutajućih areometara, kod kojih se gustina tečnosti može utvrditi na osnovu dubine prastvaranja koja se očitava na graduisanoj skali.

1.4.1.2. Hidrostatička vaga (za tečne i čvrste supstance)

Razlika između težine ispitivanog uzorka mjerenog u vazduhu i mjerenog u odgovarajućoj tečnosti (npr. u vodi) može se koristiti za određivanje gustine ispitivanog uzorka.

Za određivanje gustine čvrste supstance, izmjerena gustina je reprezentativna gustina samo za ispitivani uzorak. Za određivanje gustine tečnosti, prvo se mjeri masa tijela poznate zapremine (V) u vazduhu, a zatim u tečnosti.

1.4.1.3. Metoda uranjanja tijela (za tečne supstance)

Po ovoj metodi gustina tečnosti određuje se iz razlike rezultata mjerenja mase tečnosti prije i nakon zaranjanja tijela poznate zapremine u tečnost koja se ispituje.

1.4.2. Metoda piknometra

Za čvrste ili tečne supstance koriste se piknometri različitih oblika sa poznatim zapreminama. Gustina se određuje iz razlike u masi između punog i praznog piknometra i njegove poznate zapremine.

1.4.3. Vazdušni uporedni piknometar (za čvrste supstance)

Gustina čvrste supstance u bilo kom obliku mjeri se na sobnoj temperaturi sa gasnim uporednim piknometrom. Zapremina supstance mjeri se u vazduhu ili u inertnom gasu u cilindru promjenljive kalibrisane zapremine. Za proračun gustine uzima se jedno mjerenje mase, nakon mjerenja zapremine.

1.4.4. Oscilujući mjerač gustine

Gustina tečnosti može se izmjeriti pomoću oscilujućeg mjerača gustine. Mehanički oscilator, napravljen u obliku cijevi latiničnog slova U (U), vibrira na frekvenciji rezonance oscilatora koja zavisi od njegove mase. Unošenje uzorka mijenja frekvenciju rezonance oscilatora. Aparat se kalibriše pomoću dvije tečne supstance poznate gustine. Ove supstance se biraju na način da njihove gustine obuhvataju opseg koji se mjeri.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Primjenljivost različitih metoda koje se koriste za određivanje relativne gustine date su u Tabeli 1.

1.6. Opis metoda

U drugom dijelu ove metode dati su standardi kao primjer koji treba konsultovati za dodatne tehničke podatke. Izvode se najmanje dva mjerenja na temperaturi od 20°C.

2. Podaci

Podaci su dati u Dijelu II ove metode.

3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

- korišćenoj metodi;
- preciznom opisu supstance (identitet i nečistoće) i koracima prethodnih prečišćavanja, ukoliko ih je bilo.

Relativna gustina (D^{20}_4) se u izvještaju navodi u skladu sa definicijom datom u dijelu 1.2. ove metode, zajedno sa fizičkim stanjem mjerene supstance.

U izvještaju se navode svi podaci i primjedbe važne za tumačenje rezultata, naročito podaci o nečistoćama i fizičkom stanju supstance.

Tabela: Primjenljivost metoda

Metoda mjerenja	Gustina		Maksimalan mogući dinamički viskozitet
	čvrsto	tečno	
Areometar[6]		da	5 Pa s
7 Hidrostatička vaga			
a) hemikalije u čvrstom stanju	da		
b) tečnosti		da	5 Pa s
Metoda uranjanja tijela[8]		da	20 Pa s
Metoda piknometra[9]			500 Pa s

[6] ISO 387, ISO 649-2,
[7] ISO 1183 (A), ISO 901 i 758

a) hemikalije u čvrstom stanju	da		
b) tečnosti		da	
10 Vazdušni uporedni piknometar	da		
Oscilujući mjerač gustine		da	5 Pa s

DODATNI TEHNIČKI PODACI
DIO II

Dodatni tehnički podaci mogu se pronaći u sljedećim standardima:

1. Metoda potiska

1.1. Areometar

MEST ISO 649-2 - Gustina hidrometra za opšte namjene

1.2. Hidrostatička vaga

1.2.1. Za čvrste supstance

MEST ISO 901 ISO 758

1.2.2. Za tečne supstance

MEST ISO 901 ISO 758

2. Metoda piknometra

2.1. Za tečne supstance

MEST ISO 3507 - Piknometri
MEST ISO 758 - Određivanje tečnih hemijskih proizvoda ;Određivanje gustine na 20 ˚C

2.2. Za čvrste supstance

MEST ISO 1183 Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics

3. Vazdušni uporedni piknometar

ISO 1183 (B), ISO 758

A.4. NAPON PARE

DIO I

1. Metoda ispitivanja

Metoda ispitivanja zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD. Ekvivalentna međunarodna ispitna metoda ili druge primjenjive ispitne metode za predmetnu krajnju tačku navedene su u tabeli dijela 0.

1.1. Uvod

Za ispitivanje napona pare treba imati podatke o strukturi, tački topljenja i tački ključanja supstance.

Ne postoji jedinstven postupak mjerenja koji se može primjeniti na cjelokupan opseg napona pare. Preporučuje se nekoliko metoda za mjerenje napona pare od < 10^{-4} Pa do 10^{5} Pa. Nečistoće obično utiču na napon pare u mjeri koja zavisi od vrste nečistoće. Kada u uzorku postoje isparljive nečistoće koje mogu uticati na ishod, supstanca se može prečistiti. Preporučuje se navoĐenje napona pare za tehničke materijale. Neke od opisanih metoda koriste aparature sa metalnim djelovima, što treba uzeti u obzir kada se ispituju korozivne supstance.

2. Definicije i mjerne jedinice

Napon pare supstance je pritisak zasićene pare iznad čvrste ili tečne supstance. Pri termodinamičkoj ravnoteži, napon pare čiste supstance zavisi samo od temperature. U MeĐunarodnom sistemu jedinica, SI jedinica za pritisak koja se koristi za ove potrebe jeste paskal (Pa). Mjerne jedinice koje su se ranije koristile, zajedno sa faktorima njihovog presupstancaanja su: 1 torr (≡1 mmHg) = 1,333x10^{2} Pa; 1 atmosfera = 1,013 x 10^{5} Pa; 1 bar = 10^{5} Pa. SI jedinica za temperaturu je kelvin (K). Univerzalna gasna konstanta R iznosi 8,314 J mol^{-1} K^{-1}. Temperaturna zavisnost napona pare opisana je Klauzijus-Klajperonovom jednačinom:

$$\text{Log p} = \frac{\Delta H_v}{2.3RT} + \text{konst.}$$

gdje je ΔH_v toplota isparavanja u $Jmol^{-1}$; R univerzalna gasna konstanta u $Jmol^{-1}$ K^{-1}; T j termodinamička temperatura u K.

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance se ne koriste svaki put kada se ispituje nova supstanca. One prvenstveno služe za povremenu provjeru metode i da omoguće poređenje sa rezultatima dobijenim drugim metodama.

1.4. Princip metode

Za određivanje napona pare predlaže se sedam metoda koje se mogu primjenjivati u različitim opsezima napona pare. Za svaku metodu napon pare se utvrđuje na različitim temperaturama. U ograničenom temperaturnom rasponu, logaritam napona pare čiste supstance je obrnuto proporcionalan temperaturi.

1.4.1. Dinamička metoda Kod dinamičke metode mjeri se temperatura ključanja na određenom pritisku. Preporučeni opseg: od 10^3 Pa do 10^5 Pa. Metoda se preporučuje i za određivanje tačke ključanja i koristi se do 600 K.

1.4.2. Statička metoda

Kod statičke metode, pri termodinamičkoj ravnoteži, određuje se napon pare postignut u zatvorenom sistemu pri određenoj temperaturi. Ova metoda je pogodna za jednokomponentne i višekomponentne čvrste i tečne supstance. Preporučeni opseg: od 10 Pa do 10^5 Pa. Metoda se može koristiti i u opsegu od 1 Pa do 10 Pa i radi se pod odgovarajućim uslovima.

1.4.3. Izotenzioskop

Izotenzioskop je standardizovana metoda, statička metoda, ali nije pogodna za višekomponentne sisteme. Preporučeni opseg: od 100 Pa do 10^5 Pa.

1.4.4. Metoda efuzije: Mjerenje napona pare

Metodom efuzije mMjerenje napona pare) određuje se količina supstance koja napušta ćeliju u jedinici vremena kroz otvor poznate veličine u uslovima vakuuma, tako da je povraćaj supstance u ćeliju zanemarljiv (npr. mjerenjem nastalog impulsa na osjetljivoj vagi mjerenjem mlaza pare ili mjerenjem gubitka mase). Preporučeni opseg: od 10^{-3} Pa to 1 Pa.

1.4.5. Metoda efuzije: Pomoću gubitka mase ili hvatanjem isparenja

Metodom efuzije (pomoću gubitka mase ili hvatanjem isparenja) zasniva se na procjeni mase ispitivane supstance koja ističe u jedinici vremena iz Knudzenove ćelije u formi pare kroz mikro otvor u uslovima visokog vakuuma. Masa izdvojene pare se dobija određivanjem gubitka mase ćelije ili kondenzacijom pare na niskoj temperaturi i određivanjem količine isparene supstance hromatografskom analizom. Napon pare se iizračunava preko Herc-Knudzenove relacije. Preporučeni opseg: od 10^{-3} Pa do 1 Pa.

1.4.6. Metoda zasićenja gasa

Struja inertnog nosećeg gasa pušta se preko supstance na takav način da on postaje zasićen njenom parom. Količina materijala koji se prenosi poznatom količinom nosećeg gasa mjerljiva je putem sakupljanja u odgovarajućem trapu ili nekom od analitičkih tehnika.

Ona se zatim koristi za proračun napona pare pri datoj temperaturi. Preporučeni raspon: od 10^{-4} Pa do 1 Pa. Metoda se može koristiti i u rasponu od 1 Pa do 10 Pa, pod strogo kontrolisanim uslovima.

1.4.7. Metoda sa rotirajućom kuglicom

U mjernom instrumentu sa rotirajućom kuglicom, mjerni element je čelična kuglica koju drži magnetno polje i koja se rotira velikom brzinom. Pritisak gasa se utvrđuje na osnovu usporavanja kuglice koje zavisi od pritiska. Preporučeni raspon: od 10^{-4} Pa do 0,5 Pa.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Porede se razne metode određivanja napona pare u smislu primjene, sposobnosti ponavljanja, reproduktivnosti, rasponu mjerenja, postojećeg standarda, datih u Tabeli:

Metoda mjerenja	Supstance		Procijenjena ponovljivost[6]	Procijenjena mjerna ponovljivost	Preporučeno područje
	čvrste	tečne			
1.4.1. Dinamička metoda	sa niskom tačkom topljenja	da	do 25 %	do 25 %	10^3 Pa do 2 x 10^3 Pa
[7]			1 do 5 %	1 do 5 %	2 x 10^3 Pa do 10^5 Pa
12 1.4.2. Statička metoda	da	da	5 do 10 %	5 do 10 %	10 Pa do 10^5 Pa **(2)**
1.4.3. Izotenzioskop[8]	da	da	5 do 10 %	5 do 10 %	10^2 Pa do 10^5 Pa
1.4.4. Metoda efuzije[9]: Mjerenje pritiska pare	da	da	5 do 20 %	5 do 50 %	10^{-3} Pa do 1 Pa
1.4.5. Metoda efuzije: gubitak mase	da	da	10 do 30 %	-	10^{-3} Pa do 1 Pa
1.4.6. Metoda zasićenja gasa	da	da	10 do 30 %	do 50 %	10^{-4} Pa do 1 Pa **(2)**
1.4.7. Metoda sa rotirajućom kuglicom	da	da	10 do 20 %	-	10^{-4} Pa do 0,5 Pa

1.6. Opis metoda

1.6.1. Dinamička metoda

1.6.1.1. Aparatura

[6] U zavisnosti od čistoće.

[7] NF T 20-048 AFNOR (Sept. 85). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10-1 to 105 Pa – Static method

[8] ASTM D 2879 -86, Standard test method for vapour pressure-temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.

[9] NF T 20-047 AFNOR (Sept. 85). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10-3 to 1 Pa – Vapour pressure balance method

Mjerna aparatura se sastoji od: suda za ključanje sa dodatim hladnjakom od stakla ili metala (Slika 1), opreme za mjerenje temperature i opreme za regulaciju i mjerenje pritiska. Tipična mjerna aparatura data na ovoj slici napravljena je od stakla otpornog na toplotu i sastoji se od pet djelova:

1. Velika cijev, u pojedinim dielovima sa duplim zidom, sastoji se od: šlifovanog jedinjenjea, hladnjaka, posude za hlaĐenje i ulaznog otvora.
2. Stakleni cilindar sa Kotrelovom "pumpom" povezuje se na dio za ključanje i ima grubu površinu od drobljenog stakla da bi se izbieglo neravnodnosno ključanje.
3. Temperatura se mjeri odgovarajućim senzorom za temperaturu (npr. otporni termometar, termopar) koji se uranja u aparaturu do tačke mjerenja (broj 5 na Slici 1) kroz odgovarajući ulazni otvor (npr. muškog šlifa).
4. Uređaj se povezuje sa regulatorom pritiska i mjernom opremom.
5. Balon, koji ima ulogu sigurnosnog trapa, povezan je sa mjernom aparaturom pomoću kapilarne cijevi.

Sud za ključanje se zagrijeva a pomoću grejnog tijela (kertridž grijač) ubačenog u staklenu aparaturu sa donje strane. Struja potrebna za zagrijavanje podešava se i reguliše preko termopara. Vakuum pumpa proizvodi potrebni vakuum između 10^2 Pa i približno 10^5 Pa. Za mjerenje vazduha ili azota za regulaciju pritiska (mjerni raspon približno od 10^2 Pa do 10^5 Pa) i ventilaciju koristi se odgovarajući ventil. Pritisak se mjeri manometrom.

1.6.1.2. Postupak mjerenja

Napon pare se mjeri određivanjem tačke ključanja uzorka pri određenim različitim pritiscima između 10^3 Pa i 10^5 Pa. Stabilna temperatura pri konstantnom pritisku ukazuje na to da je postignuta temperatura ključanja. Supstance koje pjene ne mjere ovom metodom.

Supstanca se stavlja u čist i suv sud za uzorkovanje. Problemi se mogu javiti kada se radi sa čvrstim supstancama koje nisu u sprašenom obliku, ali se ti problemi mogu riješiti zagrijavanjem obloge hladnjaka. Kada se sud napuni, aparatura se zasupstancaa na prirubnici i supstanca se oslobaĐa od gasova. Zatim se podešava najniži željeni pritisak i uključuje se grijjanje. U isto vrijeme, temperaturni senzor se povezuje sa pisačem. Ravnoteža se postiže kada se očitava konstantna temperatura ključanja pri konstantnom pritisku. Posebno se pazi da se izbjegne neravnodnosno ključanje. Supstanca se kondenzuje u hladnjaku. Kada se određuje napon pare vrstih supstanci sa niskom tačkom topljenja, potrebno je paziti da se izbjegne zapušavanje kondenzatora. Nakon bilježenja tačke u kojoj se postiže ravnoteža, podešava se viši pritisak. Proces se ponavlja na isti način sve do postizanja 10^5 Pa (približno 5 do 10 mjernih tačaka ukupno). Radi provjere, potrebno je ponavljati tačke ravnoteže nekoliko puta uz opadajući pritisak.

1.6.2. Statička metoda

1.6.2.1. Aparatura

Aparatura se sastoji od: suda za uzorak, sistema za grijanje i hlaĐenje uzorka i mjerenje temperature. Aparatura obuhvata i instrumente za podešavanje i mjerenje pritiska. Slike 2a i 2b daju osnovne primijenjene principe. Komora za uzorke (Slika 2a) je sa jedne strane povezana odgovarajućim visokovakuumskim ventilom. Cijev u obliku slova "U" napunjena odgovarajućim manometarskim fluidom pričvršćenja je na drugoj strani. Jedan kraj cijevi "U" grana se na vakuum pumpu, bocu sa azotom ili ventilacioni ventil i na manometar.

Umjesto "U" cijevi koristi se mjerač pritiska sa indikatorom pritiska (Slika 2b). Da bi se regulisala temperatura uzorka, sud za uzorkom sa ventilom i "U" cijevi 0,2 K. ili mjeračem pritiska prastvara se u kupatilo konstantne temperature od ± Temperatura se mjeri sa poljne strane suda koji sadrži uzorak ili unutar samog suda. Za vakuumiranje aparata koristi se vakuum pumpa sa ohlađenim trapom prije pumpe. Kod metode koja je data na Slici 2a, napon pare supstance mjeri se indirektno pomoću nultog indikatora. Na ovaj način se uzima u obzir činjenica da se gustina fluida u "U" cijevi mjjenja sa većim promjenama temperature.

Sljedeći fluidi su pogodni za korišćenje u nultim indikatorima za "U" cijev, u zavisnosti od opsega pritiska i od hemijskog ponašanja supstance: silikonski fluidi, ftalati. Ispitivana supstanca ne reaguje sa fluidom niti se značajno rassupstancaa u fluidu. Za manometar se može koristiti živa u rasponu normalnih pritisaka vazduha do 10^2 Pa, dok su silikonski fluidi i ftalati pogodni za upotrebu pri pritisku manjem od 10^2 Pa i niže do 10 Pa. Membranski manometri sa membranom koja se može zagrijevati mogu se koristiti i niže od 10^{-1} Pa. Postoje i drugi mjerači pritiska koji se mogu koristiti za pritiske ispod 10^2 Pa.

1.6.2.2. Postupak mjerenja

Svi djelovi aparature date na Slici 2 prije mjerenja se detaljno peru i suše.

Kod metode koja je data na Slici 2a, "U" cijev je potrebno napuniti odabranom tečnošću, iz koje se odstranjuju gasovi pri povišenoj temperaturi prije očitavanja podataka. Supstanca koja se ispituje stavlja se u aparaturu, koja se potom zasupstancaa, a temperatura se smanjuje radi degasiranja.
Temperatura je dovoljno niska da se osigura izvlačenje vazduha, ali, u slučaju višekomponentnog sistema, ne smije se mijenjati sastav materijala. Ukoliko je potrebno, ravnoteža se može brže uspostaviti miješanjem.

Uzorak se prehlađuje npr. tečnim azotom (vodeći računa da se izbjegne kondenzacija vazduha ili fluida iz pumpe), ili smješom etanola i suvog leda. Za mjerenja pri niskoj temperaturi, koristi se kupatilo sa regulacijom temperature priključeno na ultra kriomat. Osupstancaanjem ventila na sudu za uzorkovanje, nekoliko minuta se vakuumira radi uklanjanja vazduha. Venil se potom zasupstancaa, a temperatura uzorka smanjuje na najmanji željeni nivo. Ukoliko je potrebno, operacija odstranjivanja gasa se ponavlja više puta. Kada se uzorak zagrije, napon pare raste. Na ovaj način se mijenja ravnoteža fluida u "U" cijevi. Da bi se to kompenzovalo, pomoću odgovarajućeg ventila u aparaturu se uvode azot ili vazduh sve dok indikator pritiska fluida ne pokaže vrijednost nula. Potreban pritisak za postizanje ravnoteže može se očitavati preciznim manometrom na sobnoj temperaturi. Ovaj pritisak odgovara naponu pare supstance na temperaturi mjerenja. Metoda koja je data na Slici 2b je slična, ali se kod nje napon pare očitava direktno. Zavisnost temperature i pritiska pare utvrđuje se u adekvatno malim intervalima (otprilike 5 do 10 mjernih tačaka ukupno) do željenog maksimuma. Očitavanja pri niskoj temperaturi se ponavljaju radi provere.

Ukoliko se vrijednosti dobijene očitavanjima ne podudaraju sa krivom dobijenom povećanjem temperature, razlog može biti:

1. uzorak i dalje sadrži vazduh (npr. materijali visoke viskoznosti) ili supstance koje imaju nisku tačku ključanja, koje se otpuštaju tokom zagrijavanja i odstranjuju se vakuumiranjem praćenim daljim hlađenjem;
2. temperatura hlađenja nije dovoljno niska. U tom slučaju se kao fluid za hlađenje koristi tečni azot;
3. ukoliko nijedan od ovih razloga nije uzrok odstepena, mjerenje se ponavlja.

Supstanca podliježe hemijskoj reakciji u ispitivanom temperaturnom opsegu (npr. razlaganje, polimerizacija).

1.6.3. Izotenzioskop[10]

Princip rada mjernog uređaja dat je na Slici 3. Slično statičkoj metodi datoj u dijelu 1.6.2. ove metode, izotenzioskop odgovara za ispitivanje čvrstih, ali i tečnih supstanci. Kada se radi sa tečnostima, sama supstanca služi kao fluid u pomoćnom manometru. Količina tečnosti, dovoljna da popuni balon i kraći krak manometra, stavlja se u izotenzsioskop. Izotenzsioskop se povezuje na vakuum, evakuiše, a zatim puni azotom. Evakuacija i ispiranje sistema ponavlja se dvaput da bi se odstranili tragovi kiseonika. Napunjen izotenzioskop se postavlja u horizontalni položaj tako da se uzorak širi u tanak sloj u kuglu za uzorak i u delu manometra ("U" deo). Pritisak u sistemu smanjuje se do 133 Pa, a uzorak se blago zagrijeva do ključanja (odstranjivanje rastvorenih zarobljenih gasova). Izotenzioskop se potom postavlja tako da se uzorak vraća u kuglu i kraći krak manometra, tako da su oba navedena dijela potpuno napunjena tečnošću. Pritisak se održava kao kod odstranjivanja gasa. Izvučeni dio kugle za uzorkovanje zagrijeva se pomoću malog plamena sve dok se para uzorka ne raširi dovoljno da potisne dio uzorka iz gornjeg dela kugle i kraka manometra u manometarski dio izotenzioskopa, formirajući prostor ispunjen parom, bez azota.

Izotenzioskop se zatim stavlja u kupatilo konstantne temperature, a pritisak azota se podešava sve dok se njegov pritisak ne izjednači sa pritiskom uzorka. Ravnoteža pritiska se očitava na manometru izotenzioskopa. U stanju ravnoteže, napon pare azota je isti kao i napon pare supstance.

Kod čvrstih supstanci, u zavisnosti od opsega temperature i pritiska, koriste se manometarske tečnosti iz dijela 1.6.2.1. ove metode. Degasirana manometarska tečnost stavlja se u proširenje na dužem kraku manometra izotenzioskopa. Čvrsta supstanca koja se ispituje stavlja se u kuglu i degasira pri povišenoj temperaturi. Izotenzioskop se nakon toga naginje da bi se omogućilo da tečnost iz manometra teče u "U" cijev. Mjerenje napona pare kao funkcije temperature vrši se shodno dijelu 1.6.2. ove metode.

1.6.4. Metoda efuzije: Mjerenje napona pare

1.6.4.1. Aparatura

Za apateruru je dato više verzija u literaturi[11]. Na slici 4. su date osnovne komponente aparature, uključujući i visokovakuumski sud od nerĐajućeg čelika ili stakla, opremu za stvaranje i mjerenje vakuuma i ugrađene komponente za mjerenje napona pare u ravnoteži. Aparatura se sastoji od ugrađenih komponenti:

- Peć isparivača sa prirubnicama i rotacionim ulaznim otvorom. Peć isparivača je cilindrični sud od npr. bakra ili hemijski otporne legure dobre termičke provodljivosti. Može se koristiti i stakleni sud sa bakarnim zidom. Peć je prečnika oko 3 cm do 5 cm i visine od 2 cm do 5 cm. Na njoj se nalazi između jednog i tri otvora različitih veličina za odvođenje pare. Peć se zagreva spiralnim grijačem sa poljne strane. Da bi se spriječio gubitak toplote prema postolju, grejač se spaja na postolje pomoću metala niske termičke provodljivosti (nikal-srebro ili hrom-nikal čelik), npr. pomoću cijevčice od nikal-srebra jedinjenjeene na rotacioni

[10] ASTM D 2879 -86, Standard test method for vapour pressure-temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope

[11] OECD, Paris, 1981., Testing Guideline 104, Decision of the Council C(81) 30 final.

ulazni otvor, ukoliko se koristi peć sa više otvora. Ovakav raspored ima prednost što omogućava uvođenje bakarne šipke. Time se omogućava hlađenje polja uz upotrebu kupatila za hlađenje.

- Ako na poklopcu bakarne peći ima tri otvora različitih prečnika pod uglom od 90°, time se mogu obuhvatiti različiti rasponi pritisaka u okviru ukupnog mjernog opsega (otvori prečnika između otprilike 0,30 mm i 4,5 mm). Veliki otvori se koriste za niske napone pare i obrnuto. Rotacijom peći može se podešavati željeni otvor ili međupoložaj (otvor peći - štit - vaga), a mlaz molekula se pušta ili odbija kroz otvor peći na mjerni panel. Da bi se izmjerila temperatura supstance, koristi se termopar ili termometar sa opornikom koji se postavlja u odgovarajućoj položaj.

- Iznad štita nalazi se tas vage koji je dio visokoosjetljive mikrovage. Tas vage ima prečnik oko 30 mm. Pozlaćeni aluminijum je pogodan materijal za izradu tasa.

- Tas vage je okružen cilindričnim kućištem za hlađenje od bronze ili bakra. U zavisnosti od tipa vage, kućište ima otvore za struju pare, a na štitu se nalazi otvor za protok molekula, čime se garantuje da se sva kondenzacija pare vrši na tasu vage. Rasipanje toplote ka poljašnjosti osigurava se npr. bakarnom šipkom povezanom sa posudom za hlađenje. Šipka prolazi kroz postolje, a termička izolacija se postiže uz pomoć cijevi od npr. hrom-nikl čelika. Šipka je potopljena u Djuarov sud napunjen tečnim azotom koji se nalazi ispod postolja ili tečni azot cirkuliše kroz šipku. Na ovaj način se posuda za hlađenje održava na oko -120 °C. Tas vage se hladi isključivo zračenjem i zadovoljavajući je za opseg pritiska koji se ispituje (hladi se oko 1 sat prije početka mjerenja).

- Vaga se postavlja iznad posude za hlađenje. Odgovarajući vage su npr. visokoosjetljive elektronske mikrovage sa dva kraka[8] ili visokoosjetljivi instrumenti sa pokretnom spiralom[12]

- Postolje ima integrisane konektore za termoparove (ili otporne termometre) i spiralni grijač.

- Vakuum u sudu se ssupstancaa pomoću parcijalne vakuum pumpe ili visokovakuumske pumpe (potreban vakuum je oko 1 Pa do 2 x 10^{-3} Pa, koji se postiže nakon 2 sata pumpanja). Pritisak se reguliše odgovarajućim jonizujućim manometrom.

1.6.4.2. Postupak mjerenja

Postupak mjerenja započinje punjunjem suda supstancom koja se ispituje, a zatim se zasupstancaa poklopac. Štit i posuda za hlađenje stavljaju se preko peći. Aparatura se zasupstancaa i uključuju se vakuum pumpe. Krajnji pritisak pre očitavanja mjerenja treba da bude oko 10^{-4} Pa. Hlađenje posude za hlađenje počinje na 10^{-2} Pa.

Kada se postigne potrebni vakuum, počinje serija kalibracija pri najnižoj potrebnoj temperaturi. Podešava se odgovarajući otvor na poklopcu, para prolazi kroz štit direktno iznad otvora i udara u ohlađeni tas vage. Tas vage mora biti dovoljno veliki da osigura da celokupna para koja prolazi kroz štit udara na njega. Udar pare Dijeluje kao sila na tas vage i molekuli kondenzuju na njegovoj hladnoj površini. Sila i istovremena kondenzacija proizvode signal na snimaču. Procjena signala daje dva podatka:

[12] Testing Method B.44. Skin Absorption: In vivo Method

1. U aparaturi napon pare se određuje direktno iz impulsa na tasu vage (za to nije potrebno znati molekulsku masu[2]). Geometrijski faktori kao što su otvori na peći i ugao pod kojim para pada na tas vage se uzimaju u obzir pri ocjeni očitavanja.

2. U isto vrijeme se mjeri i masa kondenzata, a iz toga se iizračunava brzina isparavanja. Napon pare se iizračunava iz brzine isparavanja i molekulske mase Hercovom jednačinom[2]:

$$p = G\sqrt{\frac{2\pi RTx10^{3}}{M}}$$

gdje je: *G* brzina isparavanja (kg s^{-1} m^{-2}); *M* molarna masa (g mol^{-1}); *T* temperatura (K); *R* univerzalna molarna gasna konstanta (J $mol^{-1}K^{-1}$); *p* napon pare (Pa).

Po postizanju potrebnog vakuuma, počinje se sa serijom mjerenja i to na najnižoj željenoj mjernoj temperaturi. Za naredna mjerenja, temperatura se povećava u malim intervalima do postizanja maksimalne željene temperaturne vrijednosti. Uzorak se potom hladi i zabilježi se druga kriva napona pare. Ukoliko drugi krug ne potvrdi rezultate iz prvog kruga, moguće je da se supstanca razlaže u temperaturnom opsegu u kom je mjereno.

1.6.5. Metoda efuzije: Pomoću gubitka mase ili hvatanjem isparenja

1.6.5.1. Aparatura

Aparatura za određivanje napona pare efuzijom sastoji se od sljedećih osnovnih djelova:

1. Rezervoara koji je termostatiran i vakuumiran, u kom su smještene efuzione ćelije;
2. Visokovakuumske pumpe (npr. difuzione ili turbomolekularne pumpe) sa mjeračem vakuuma;
3. Trapa koji koristi suvi led ili tečni azot.

Aluminijumski vakuumski tank sa četiri efuzione ćelije od nerĐajućeg čelika, sa električnim grijanjem dat je primjera radi na Slici 5. Folija od nerĐajućeg čelika debljine oko 0,3 mm ima efuzioni otvor prečnika od 0,2 mm do 1,0 mm i pričvršćenja je za efuzionu ćeliju pomoću poklopca sa navojem.

1.6.5.2. Postupak mjerenja

Referentna supstanca i supstanca koja se ispituje stavljaju se u efuzione ćelije. Metalna dijafragma sa otvorima obezbjeđuje se poklopcem sa navojima, a težina svake ćelije se mjeri u opsegu tačnosti od 0,1 mg. Ćelija se postavlja u aparaturu sa termostatom, koja se vakuumira do nivoa ispod jedne desetine očekivanog pritiska. U definisanim vremenskim intervalima od 5 sati do 30 sati, u aparaturu se pušta vazduh. Gubitak mase efuzione ćelije utvrđuje se ponovnim mjerenjem težine. Da bi se osiguralo da na rezultate ne utiču isparljive nečistoće, ćelija se ponovo mjeri u definisanim vremenskim intervalima da bi se izvršila provjera da li je brzina isparavanja konstantna u najmanje dva vrijemenska intervala. Napon pare p u efuzionoj ćeliji određuje se pomoću:

$$p = \frac{m}{KAt}\sqrt{\frac{2\pi RT}{M}}$$

gdje je: *p* napon pare (Pa); *m* masa supstance koja napušta ćeliju u vremenu t (kg); *t* vrijeme (s); *A* površina otvora (m^2); *K* korektivni faktor; *R* univerzalna gasna konstanta (J mol^{-1} K^{-1}); *T* temperatura (K); *M* molarna masa (kg mol^{-1}).

Korektivni faktor (*K*) zavisi od odnosa dužine i radijusa cilindričnog otvora:

odnos	0,1	0,2	0,6	1,0	2,0
K	0,952	0,909	0,771	0,672	0,514

Napon pare može se odrediti i na osnovu sljedeće jednačine:

$$p = \frac{Em}{tM}\sqrt{\frac{T}{}}$$

gdje je: *E* konstanta efuzione ćelije.

$$E = \frac{1}{KA}\sqrt{2\pi R}$$

Konstanta efuzione ćelije (*E*) se određuje i referentnim supstancama[2, 9], pomoću jednačine:

$$E = \frac{p(r)t}{mT}\sqrt{\frac{M(r)}{}}$$

gdje je: *p(r)* pritisak pare referentne supstance (Pa); *M(r)* molarna masa referentne supstance (kg mol^{-1}).

1.6.6. Metoda zasićenja gasa

1.6.6.1. Aparatura

Tipična aparatura koja se koristi za ovo ispitivanje sadrži više djelova datih na Slici 6a1.

Inertni gas
Noseći gas ne reaguje hemijski sa supstancom koja se ispituje i koristi se azot, ponekad mogu neki drugi gasovi[10]. Gas koji se koristi je suv (Sliku 6a, legenda 4, senzor relativne vlage).

Kontrola protoka
Potreban je odgovarajući sistem za kontrolu protoka gasa kako bi se osigurao konstantan određeni protok kroz kolonu za zasićenje.

Trapovi za "sakupljanje" pare
Trapovi za "sakupljanje" pare zavise od karakteristika uzorka i izabrane metode analize. Para treba da se zadržava kvantitativno u obliku koji omogućava dalju analizu. Za neke ispitivane supstance pogodni su trapovi koje sadrže tečnosti kao što su heksan ili etilen-glikol. Za druge ispitivane supstance mogu se koristiti čvrsti sorbenti.

Kao alternativa sakupljanju pare i daljoj analizi, koriste se povezane analitičke tehnike (kao što je hromatografija) kojima se kvantitativno određuje količina materijala koju prenosi poznata količina nosećeg gasa. Može se mjeriti gubitak mase.

Izmjenjivač toplote
Za mjerenja pri različitim temperaturama može biti potrebna primjena izmjenjivača toplote.

Kolona za zasićenje
Ispitivana supstanca se deponuje iz rastvora na odgovarajući inertni nosač. Nosač sa deponovanom supstancom postavlja se u kolonu za zasićenje čije dimenzije i protok treba da budu takvi da garantuju potpuno zasićenje nosećeg gasa. Kolona za zasićenje je termostatirana. Za mjerenja iznad sobne temperature oblast između kolone za zasićenje i trapa se zagreva da bi se spriječila kondenzacija ispitivane supstance.

Radi smanjenja prenosa mase usled difuzije može se staviti kapilarna cijev iza kolone za zasićenje (Slika 6b).

1.6.6.2. Postupak mjerenja

Priprema kolone za zasićenje
Dodaje se rastvor ispitivane supstance u lako isparljivom rassupstancaaču na odgovarajući inertni nosač. Dodaje se dovoljno ispitivane supstance da bi se tokom ispitivanja održalo zasićenje. Rassupstancaač se potpuno ispari na vazduhu ili u rotacionom vakuum isparivaču, a dobro pomiješan materijal se dodaje u kolonu za zasićenje. Nakon termostatiranja uzorka, kroz aparaturu se pušta suvi azot.

Mjerenje
Trap ili direktni detektor se povezuju sa linijom efluenta sa kolone i bilježi se vrijeme. Brzina protoka se pomoću mjerača mjehura provjerava na početku i u redovnim intervalima tokom eksperimenta (ili se provjerava neprekidno pomoću mjerača protoka mase). Mjeri se pritisak na izlazu sa kolone, i to:

a) ubacivanjem mjerača pritiska između kolone za zasićenje i trapa (ovo možda nije zadovoljavajuće jer povećava mrtvi prostor i adsorpcionu površinu) ili
b) utvrĐivanjem padova pritiska kroz određeni sistem trapova koji se koriste, u funkciji od brzine protoka u odvojenom eksperimentu (ovo možda ne bude zadovoljavajuće za trapove ispunjene tečnošću).

Vrijeme neophodno za sakupljanje količine ispitivane supstance koja je potrebna za različite metode analize, određuje se preliminarnim ispitivanjima ili procjenom. Kao alternativa sakupljanju supstance za dalju analizu, može se koristiti direktno vezana kvantitativna analitička tehnika (npr. hromatografija). Prije proračuna napona pare pri datoj temperaturi, preliminarnim ispitivanjima se utvrđuje maksimalna brzina protoka kod koje će noseći gas biti u potpunosti zasićen parom supstance. Ovo se utvrđuje tako što se noseći gas pušta kroz saturator dovoljno sporo tako da dalje smanjenje protoka ne daje veću vrijednost proračunatog napona pare. Analitička metoda određena je prirodom supstance koja se ispituje (npr. gasna hromatografija ili gravimetrija). Određuje se količina supstance preneta poznatom količinom nosećeg gasa.

1.6.6.3. Proračun napona pare

Napon pare se računa iz gustine pare (M/V) pomoću jednačine:

$$mRT$$

$$p = \frac{}{VM}$$

gdje je: *p* napon pare (Pa); *M* j masa isparene ispitivane supstance (g); *V* zapremina zasićenog gasa (m^3); *R* univerzalna gasna konstanta (J mol^{-1} K^{-1}); *T* temperatura (K); *M* jeste molarna masa ispitivane supstance (g mol^{-1}).

Mjerena zapremina se korigujui za razliku pritiska i temperature između mjerača protoka i termostatirane kolone za zasićenje. Ako je mjerač protoka postavljen nakon trapa za paru, mogu biti potrebne korekcije radi uzimanja u obzir nekih isparenih sastojaka iz trapa[1].

1.6.7. Metoda sa rotirajućom kuglicom[13]

1.6.7.1. Aparatura

Metoda sa rotirajućom kuglicom se primjenjuje upotrebom viskozimetra na rotoru koji se vrti, (Slika 8). Shematski prikaz eksperimentalne postavke dat je na Slici 7.

Mjerna aparatura se sastoji od rotora sa mjernom glavom, smještenog u kućištu termostata (sa regulacijom u okviru 0,1 °C). Sud za uzorak je smješten u kućište sa termostatom (regulacija u okviru 0,1 °C), a svi ostali djelovi se održavaju na višoj temperaturi da bi se spriječila kondenzacija. Uređaj sa visokovakuumskom pumpom je povezan sa sistemom pomoću visokovakuumskih ventila.

Mjerna glava spin rotora sastoji se od čelične kugle (4 mm do 5 mm u prečniku) u cijevi. Kuglu drži i stabilizuje magnetno polje, koje koristi kombinaciju stalnih magneta i kontrolnih namotaja. Kugla se okreće rotacijom polja koje ssupstancaaju namotaji. Ovi namotaji ("*Pick up*" namotaji) mjere stalno prisutnu lateralnu (bočnu) magnetizaciju kugle, što omogućava mjerenje brzine obrtanja.

1.6.7.2. Postupak mjerenja

Kada kugla postigne datu brzinu rotacije (v(o)) (oko 400 obrtaja u sekundi), prekida se dalji dotok energije i počinje usporavanje usled trenja gasa. Pad brzine rotacije mjeri se kao funkcija vremena. Trenje izazvano magnetnom suspenzijom zanemarljivo je u poreĐenju sa trenjem gasa, pa se pritisak gasa (p) određuje na sljedeći način:

$$p = \frac{\pi \sigma^r \rho}{\sigma 10t} x \ln \frac{v(t)}{v(0)}$$

gdje je: *c* prosječna brzina molekula gasa; *r* polupreČnik kugle; ρ gustina mase kugle;σ koeficijent prenosa tangentnog impulsa (ε = 1 za idealno okruglu površinu kugle); *t* vrijeme; *v(t)* brzina rotacije po vremenu t*, v(o)* početna brzina rotacije.

Napon pare može se izračunati i sljedećom formulom:

[13] G. Messer, Rohl, G. Grosse and W. Jitschin. J. Vac. Sci. Technol.(A), 1987, Vol. 5 (4), str. 2440
G. Comsa, J.K. Fremerey and B. Lindenau. J. Vac. Sci. Technol., 1980, vol. 17 (2), str. 642

J.K. Fremerey. J. Vac. Sci. Technol.(A), 1985, vol. 3 (3), str. 1715.

$$p = \frac{\pi cr\rho}{\sigma} x \frac{tn - tn-1}{10t \quad t_n x t_{n-1}}$$

gdje je: t_n, t_{n-1} vrijeme potrebno za dati broj N obrtaja. Ovi vremenski intervali t_n i t_{n-1} jsmjenjuju jedan drugog i pri tom je $t_n > t_{n-1}$.

Prosječna brzina molekula gasa (c) data je kao:

$$c = \frac{8RT\ 1/\ 2}{\pi M}$$

gdje je: T temperatura; R univerzalna gasna konstanta; M molarna masa.

2. Podaci

Napon pare jednom od navedenih metoda treba odreĐivati za najmanje dvije temperature. Poželjne su tri ili više temperatura u opsegu od 0 °C do 50 °C, da bi se provjerila linearnost krive napona pare.

3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o:

- korišćenoj metodi;
- preciznoj specifikaciji supstance (identitet i nečistoće) i koracima prečišćavanja, ukoliko ga je bilo;
- najmanje po dvije vrijednosti napona pare i temperature, poželjno u rasponu 0
- °C do 50 °C; sve neobraĐene podatke; krivu log p prema 1/T; procjeni napona
- pare na 20 °C ili 25 °C.
- Ukoliko se primjeti prelazno stanje (izmjena stanja, razlaganje), potrebno je
- navesti i podatke o:
- prirodi promjene;
- temperaturi pri kojoj je nastala promjena na atmosferskom pritisku;
- naponu pare na 10 °C i 20 °C ispod prelazne temperature i 10 °C i 20 °C iznad te temperature (ukoliko prelaz nije iz čvrstog u gasovito stanje).

U izvještaju se navode svi podaci i primjedbe važne za tumačenje rezultata, naročito podaci o nečistoćama i fizičkom stanju supstance.

METODA PROCJENE
DIO II

1. Uvod

Vrijednosti proračuna napona pare koriste se:

- za donošenje odluke o odgovarajućoj eksperimentalnoj metodi;
- za procjenu ili određivanje graničnih vrijednosti u slučajevima u kojima se eksperimentalna metoda ne može primjeniti iz tehničkih razloga (uključujući i slučajeve u kojima je napon pare veoma nizak);

- kao pomoć u identifikaciji slučajeva u kojima je opravdano izostavljanje eksperimentalnog mjerenja jer je izvjesno da je napon pare < 10^{-5} Pa pri ambijentalnoj temperaturi.

2. Metoda procjene

Napon pare tečnosti i čvrstih supstanci može se procjeniti primjenom modifikovane Votsonove korelacije. Jedini potreban podatak je normalna tačka ključanja. Metoda je primjenljiva u rasponu pritiska od 10^5 Pa do 10^{-5} Pa. [14]

3. Postupak proračuna

Prema literaturi[20] napon pare se računa na sljedeći način:

$$\ln Pvp = \frac{\Delta Hvb}{\Delta ZbRTb} 1 \frac{3 - 2\frac{T^m}{T^b}}{\frac{T}{T_b}} - 2m3 - 2\frac{T^{m-1}}{T_b} \ln \frac{T}{T_b}$$

gdje je: T izabrana temperatura; T_b normalna tačka ključanja; P_{vp} napon pare pri temperaturi T; ΔH_{vb} toplota vaporizacije; ΔZ_b faktor kompresibilnosti (procenjen na 0,97); m empirijski faktor zavistan od fizičkog stanja na izabranoj temperaturi. I:

$$\frac{\Delta Hvb}{} = Kf\,(8.75R\ln T^b)\,Tb$$

gdje je: K_F empirijski faktor u odnosu na polaritet supstance. Za nekoliko tipova jedinjenja. K_F faktori dati su u literaturi. Podaci se mogu naći i tački ključanja pri smanjenom pritisku. U tom slučaju, prema navodima literature, napon pare se računa na sljedeći način:

$$\ln Pvp = \ln P1 + \frac{\Delta Hv1}{\Delta ZbRT1} - - \frac{T}{T1} - \frac{T^1}{T} = 2m3 - 2\frac{T^{m-1}}{T1} \ln \frac{T}{T1}$$

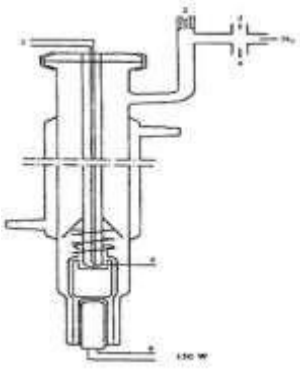
gdje je: T_1 tačka ključanja pri smanjenom pritisku P_1.

4. Izvještaj

Kod primjene metode procjene, izvještaj čini sastavni dio cjelokupne dokumentacije proračuna.

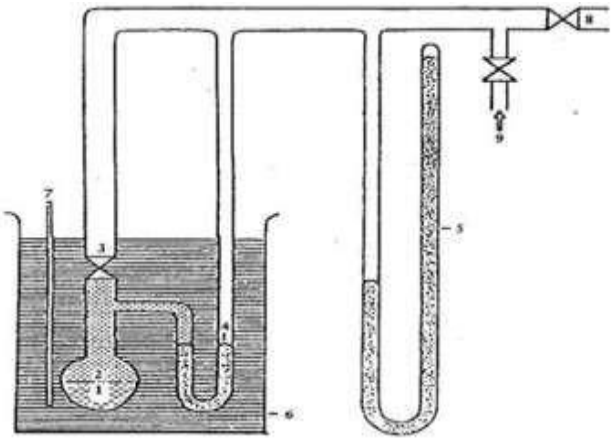
DIO III

[14] W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt. Handbook of Chemical Property Estimation Methods, Mc Graw-Hill, 1982. [20] W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt. Handbook of Chemical Property Estimation Methods, Mc Graw-Hill, 1982.



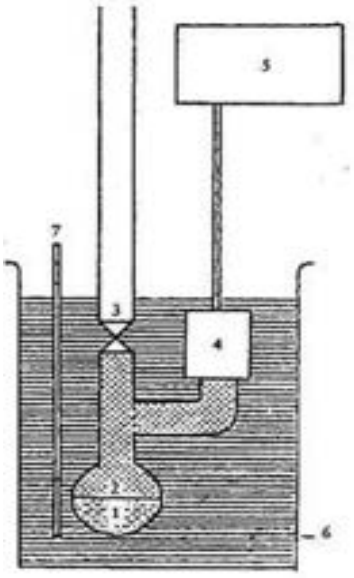
Slika 1: Aparatura za određivanje krive napona pare dinamičkom metodom

Gdje je: 1. Termopar; 2. Zapremina vakuum zaštite; 3. Mjerač pritiska; 4. Vakuum; 5. Tačka mjerenja; 6. Element za grijanje (150 W).



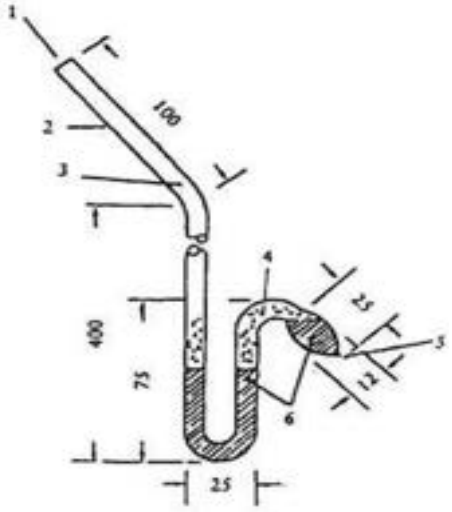
Slika 2a: Aparatura za određivanje krive napona pare statičkom metodom (upotrebom manometra
sa "U" cijevi)

gdje je: 1. Ispitivana supstanca; 2. Parna faza; 3. Ventil za visoki vakuum; 4. "U" cijev (pomoćni materijal); 5. Manometar; 6. Termostatsko kupatilo; 7. Uređaj za mjerenje temperature; 8. Izvod prema vakuum pumpi; 9. Ventilacija.



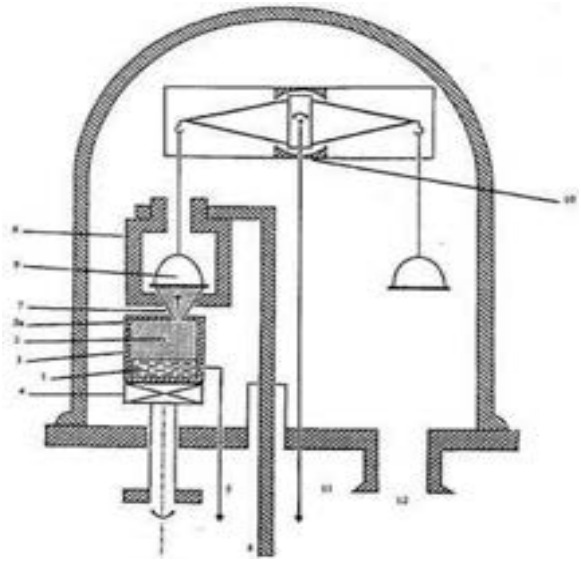
Slika 2b: Aparatura za određivanje krive napona pare statičkom metodom (korišćenjem indikatora
pritiska)

gdje je: 1. Ispitivana supstanca; 2. Parna faza; 3. Ventil za visoki vakuum; 4. Mjerač pritiska; 5. Pokazivač pritiska; 6. Termostatsko kupatilo; 7. Uređaj za mjerenje temperature.



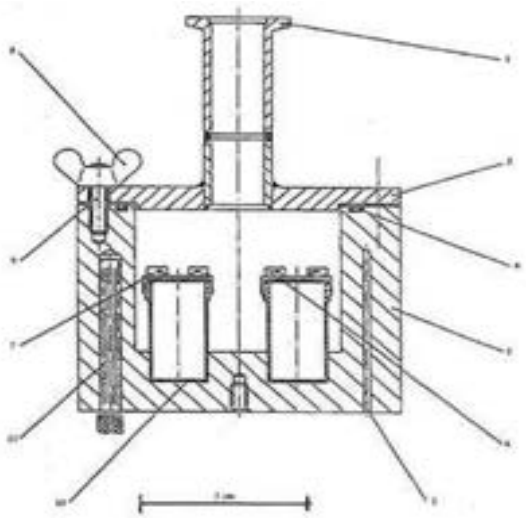
Slika 3: Izotenzioskop

gdje je: 1. Izvod prema sklopu za mjerenje i regulaciju pritiska; 2. Cijev poljašnjeg prečnika 8 mm;
3. Suvi azot u sistemu pritiska; 4. Uzorak pare; 5. izvučeni dio kugle; 6. Tečni uzorak.



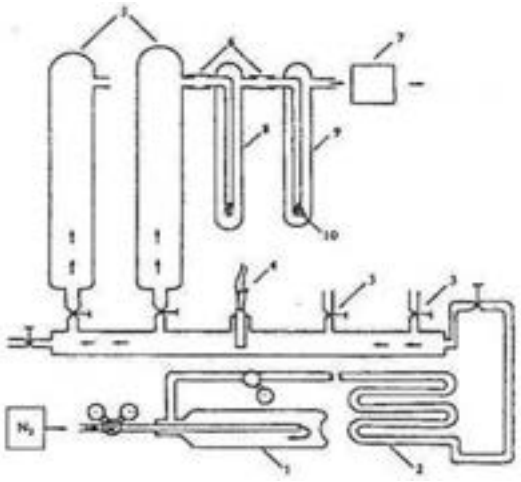
Slika 4: Aparatura za određivanje krive napona pare metodom mjerenja napona pare

gdje je:1. Ispitivana supstanca 2. Gasna faza sa parom 3. Peć za isparavanje sa pokretnim otvorom 4. Zagrijavanje (hlađenje) peći 5. Mjerenje temperature uzorka 6. Kućište za hlađenje 7. Štitnik 8. Šipka za hlađenje 9. Tas vage 10. Mikrovaga 11. Veza sa pisačem 12. Prema vakuum pumpi



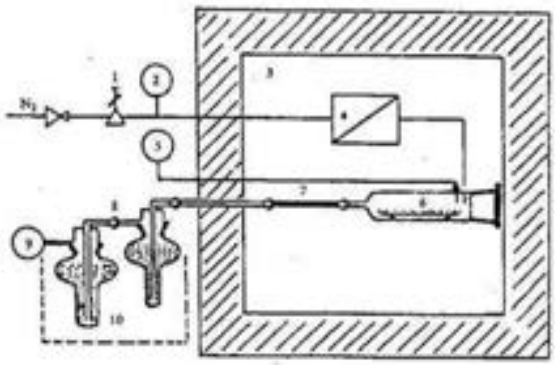
Slika 5: Primjer uređaja za isparavanje pri niskom pritisku metodom efuzije sa efuzionom ćelijom zapremine 8 cm^3

gdje je: 1. Priključak na vakuum 2. Navoj za platinske otporne termometre 3. Poklopac rezervoara za vakuum 4. O-prsten 5. Aluminijumski rezervoar za vakuum 6. Uređaj za postavljanje i demontažu efuzione ćelije 7. Poklopac sa navojem 8. Leptir matice 9. Vijci 10. Efuzione ćelije od nerđajućeg čelika 11. Kertridž griača



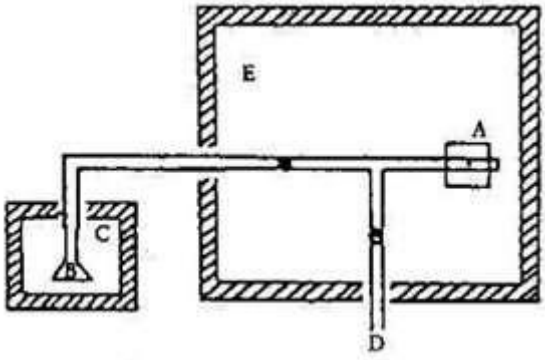
Slika 6a: Primjer sistema za određivanje napona pare metodom zasićenja gasa

gdje je: 1. Regulator protoka 2. Izmjenjivač toplote 3. Igličasti ventili 4. Senzor vlage 5. Kolona za zasićenje 6. Teflonske zaptivke 7. Mjerač protoka 8. Trap 9. Uljni trap 10. Cijevčica za stvaranje mehurova



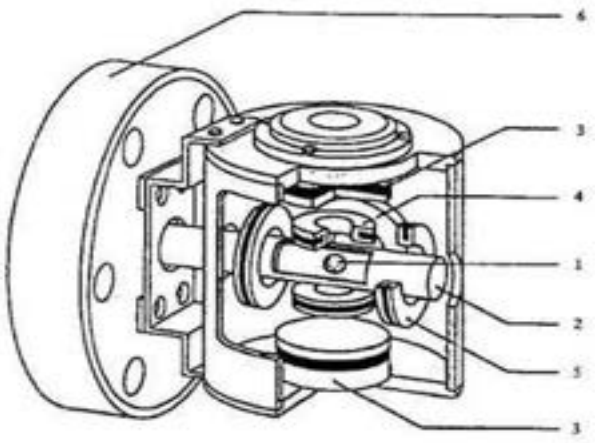
Slika 6b: Primjer sistema za određivanje napona pare metodom zasićenja gasa sa kapilarom postavljenom iza komore za zasićenje

gdje je: 1. Mjerač protoka; 2. Manometar; 3. Komora sa regulisanom temperaturom; 4. Termostat za noseći gas; 5. Termometar (Pt 100); 6. Komora za zasićenje gasa; 7. Kapilara; 8. Posuda za adsorpciju; 9. Mjerač gasa; 10. OhlaĐeni trap.



Slika 7: Primjer sistema za određivanje napona pare metodom sa rotirajućom kuglicom

gdje je: A - Glava senzora na rotoru; B - Ćelija sa uzorkom; C - Termostat; D - Vakuumski vod do turbomolekularne pumpe; E - Termostat za vazduh.



Slika 8: Primjer mjerne glave na rotoru

gdje je: 1. Kuglica; 2. Evakuisano cijevno produženje pozicije 6; 3. Trajni magneti; 4. Namotaji za vertikalnu stabilizaciju; 5. Pogonski namotaji; 6. Priključna glava.

A.5. POVRŠINSKI NAPON

1. Metoda ispitivanja

Metode ispitivanja zasnivaju se na Uputstvu za ispitivanje OECD. [15]

1.1. Uvod

Metode date u tački 1.6. primjenjuju se kod mjerenja površinskog napona vodenih rastvora. Prije ispitivanja supstance korisno je imati podatke o njenoj: rastvorljivosti u vodi, strukturi, sposobnosti da hidrolizuje i vrijednosti kritične koncentracije za formiranje micela. Opisane metode se primjenjuju za većinu supstanci, bez ograničenja u pogledu stepena njihove čistoće. Mjerenje površinskog napona metodom prstenastog tenziometra ograničeno je na vodene rastvore dinamičkog viskoziteta manjeg od 200 mPa s.

1.2. Definicije i mjerne jedinice

Površinski napon je entalpija slobodne površine po jedinici površine. Površinski napon se izražava kao: N/m u MeĐunarodnom sistemu jedinica (SI) ili mN/m MeĐunarodnom sistemu jedinica (SI podjedinica); gdje je: 1 N/m = 10^3 din/cm ili 1 mN/m = 1 din/cm u zastarelom sistemu.

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance se ne koriste svaki put kada se ispituje nova supstanca. One prvenstveno služe za povremenu provjeru metode i da omoguće poređenje sa rezultatima

[15] R. Weissberger ed.: Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed.,Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter XIV.

dobijenim drugim metodama. Referentne supstance koje pokrivaju širok opseg površinskih napona date su u literaturi.

1.4. Princip metode

Metode iz tačke 1.6. se zasnivaju na mjerenju maksimalne sile koju je neophodno vertikalno usmjeriti na stremen (uzengiju) ili prsten u kontaktu sa površinom tečnosti koja se ispituje i koja se nalazi u mjernoj posudi, da bi se odvojili od te površine ili je usmjeriti na ploču čija je ivica u kontaktu sa površinom radi izvlačenja formiranog tankog filma. Supstance koje su rastvorne u vodi pri najmanjoj koncentraciji od 1 mg/L ispituju se u vodenom rastvoru pri samo jednoj koncentraciji.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Ove metode daju veću preciznost od preciznosti koja se može očekivati sa aspekta zahtijeva koji se odnose na životnu sredinu.

1.6. Opis metoda

Pripremi se rastvor supstance u destilovanoj vodi. Koncentracija rastvora treba da bude 90% zasićenog rastvora supstance u vodi. Kada koncentracija prelazi 1 g/L, za ispitivanje se koristi koncentracija od 1 g/L. Supstance čija je rastvorljivost u vodi manja od 1 mg/L ne treba ispitivati. **1.6.4. Metoda prstena harmonizovana sa OECD**

1.6.4.1. Aparat

Za mjerenje odgovarajući su komercijalno dostupni tenziometri. Oni se sastoje od sljedećih elemenata: pokretnog stola za uzorak; sistema za mjerenje sile; mjernog tijela (prsten); posude za mjerenje.

1.6.4.1.1. Pokretni sto za uzorak

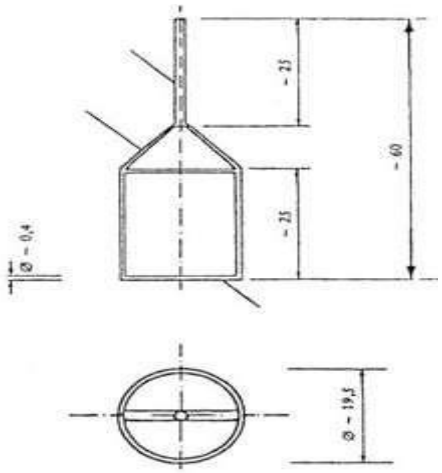
Pokretni sto za uzorak koji se koristi kao nosač temperaturno kontrolisane posude za mjerenje u kojoj se nalazi tečnost koja se ispituje, postavlja se na postolje zajedno sa sistemom za mjerenje sile.

1.6.4.1.2. Sistem za mjerenje sile

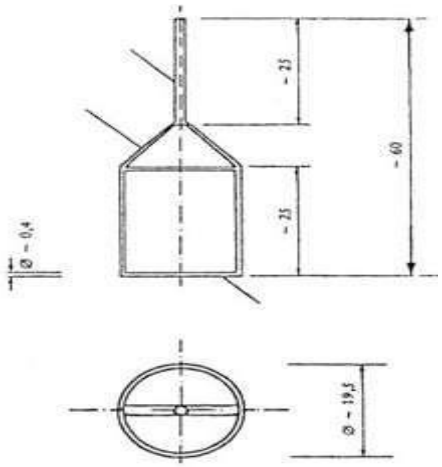
Sistem za mjerenje sile (Slika) nalazi se iznad stola za uzorak. Greška u mjerenju sile ne prelaziti $\pm 10^{-6}$ N, što odgovara grešci od ±0,1 mg kod mjerenja mase. U većini slučajeva, mjerna skala komercijalno dostupnih tenziometara kalibrisana je u mN/m tako da se površinski napon direktno očitavati u mN/m sa tačnošću od 0,1 mN/m.

1.6.4.1.3. Mjerno tijelo (prsten)

Prsten je obično napravljen od žice od platine i iridijuma debljine oko 0,4 mm i srednjeg obima od 60 mm. Žičani prsten visi horizontalno sa metalne igle i podupirača (konzole) za postavljanje žice i ssupstancaa vezu sa sistemom za mjerenje sile (Slika 1).



Slika 1. *Pribor za mjerenje - sve dimenzije su u milimetrima*



Mjerno tijelo (sve dimenzije date su u milimetrima)

1.6.4.1.4. Posuda za mjerenje

Posuda za mjerenje u kojoj se nalazi rastvor koji se ispituje je od stakla sa mogućnošću kontrole temperature. Posuda je tako napravljena da za vrijeme mjerenja temperatura tečnosti rastvora koji se ispituje i gasne faze iznad površine ostaje konstantna tako da uzorak ne može ispariti. Prihvataju se cilindrični stakleni sudovi čiji unutrašnji prečnik nije manji od 45 mm.

1.6.4.2. Priprema aparata

1.6.4.2.1. Čišćenje

Stakleni sudovi se pažljivo čiste. Ukoliko je neophodno, prati ih vrelom hrom-sumpornom kiselinom, a nakon toga fosfornom kiselinom (83% do 98% masenih H_3PO_4). Zatim se stakleni sudovi detaljno ispiraju vodom sa česme i na kraju se ispiraju bidestilovanom vodom do neutralne reakcije, nakon čega se suše ili ispiraju dijelom uzorka tečnosti za mjerenje. Prsten se prvo obilno ispira vodom da se uklone sve supstance koje su rastvorne u vodi. Prsten se zatim kratko prastvori u hrom-sumpornu kiselinu, ispere se bidestilovanom vodom do neutralne reakcije i na kraju se kratko zagrije iznad plamena metanola.

1.6.4.2.2. Kalibracija aparata

Validacija aparata sastoji se od verifikacije i podešavanja nulte tačke tako da pokazivač instrumenta omogućava pouzdano određivanje u mN/m. Aparat se niveliše postavljanjem npr. libele na bazu tenziometra, uz podešavanje zavrtnjeva kojima se reguliše nivo postolja. Nakon postavljanja prstena na aparat prije prastvaranja u tečnost, pokazivač tenziometra podesi se na nulu, a prsten podesiti paralelno sa površinom tečnosti. U tu svrhu, površina tečnosti služi kao ogledalo.

Kalibracija se sprovodi pomoću dva postupka:

a) Korišćenjem mase: procedura koja koristi jahače poznatih masa između 0,1 g i 1,0 g na prstenu. Faktor kalibracije (Fa), sa kojim se sva očitavanja množe, određuje se pomoću jednačine:

$\Phi = \frac{\sigma_r}{\sigma_a}$ gdje je:

$\sigma_r = \frac{mg}{2b}$ mN / m gdje je: m masa jahača (dopune), izražena u g; g gravitaciono ubrzanje (981 cm s^{-2} na nivou mora); b srednji obim prstena, izražen u cm;σ_a očitavanje tenziometra nakon postavljanja jahača na prsten, izraženo u mN/m.

b) Korišćenjem vode: postupak koji koristi čistu vodu čiji je površinski napon na npr. temperaturi od 23°C jednak 72,3 mN/m. Ovaj postupak se obavlja brže od kalibracije masom, ali uvjek postoji opasnost da je površinski napon vode lažan usled ostataka kontaminacije surfaktantima.

Kalibracioni faktor (Φ_b) sa kojim se množe sva očitavanja sa instrumenta, određuje se pomoću jednačine:

$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_s}$ gdje je: σ_o vrijednost za površinski napon vode (mN/m); σ_g izmjerena vrijednost površinskog napona vode (mN/m), obije pri istoj temperaturi.

1.6.4.3. Priprema uzoraka

Od supstanci koje se ispituju pripremaju se vodeni rastvori u zahtjevima koncentracijama. Ne sadrže nikakve nerastvorne supstance. Rastvor se održava na konstantnoj temperaturi (±0,5°C). Pošto se površinski napon rastvora u mjernom sudu mijenja vremenom, vrši se nekoliko mjerenja u različitim vremenskim intervalima, pri čemu iscrtana kriva pokazuje površinski napon kao funkciju vremena. Kada promjene prestanu da se dešavaju, postiže se stanje ravnoteže. Kontaminacija prašinom i gasovima sa drugih supstanci utiče na mjerenje. Zbog navedenog mjerenje se odvija ispod zaštitnog poklopca.

1.6.5. Uslovi ispitivanja

Mjerenje se vrši na temperaturi od približno 20°C i kontroliše se u okviru ± 0,5°C.

1.6.6. Ispitivanje

Rastvori koji se mjere se prenose u pažljivo opranu posudu za mjerenje, vodeći računa da se izbjegne stvaranje pjene, nakon čega se posuda za mjerenje postavlja na sto aparata za ispitivanje. Vrh table sa mjernim sudom se zatim izdiže sve dok prsten ne zaroni ispod površine rastvora koji se mjeri. Nakon toga, vrh table se postepeno i ravnodnosno spušta (brzinom od oko 0,5 cm/min) da bi se prsten odvojio od površine do postizanja maksimalne sile. Tečni sloj koji je zalijepljen na prsten se odvaja od prstena. Nakon završenog mjerenja, prsten se ponovo zaranja ispod površine, a mjerenje se ponavlja dok se ne postigne konstantna vrijednost površinskog napona. Za svako određivanje bilježi se vrijeme od prenošenja rastvora u mjerni sud. Očitavanje se vrši pri maksimalnoj sili potrebnoj da se prsten odvoji od površine tečnosti.

2. Podaci

Radi izračunavanja površinskog napona, očitana vrijednost u mN/m na aparatu se prvo pomnoži sa faktorom kalibracije Φ_a ili Φ_b (u zavisnosti od toga koji postupak kalibracije je korišćen).
Navedeni postupak daje vrijednost koja se primjenjuje samo približno, te stoga zahtijeva korekciju. Harkins i Džordan su empirijski utvrdili faktore korekcije za vrijednosti površinskog napona izmjerene metodom prstena, koji zavise od: dimenzija prstena, gustine tečnosti i njenog površinskog napona. Iz tabela Harkinsa i Džordana[16] je teško utvrditi faktor korekcije za svako individualno mjerenje, te se za proračun površinskog napona za vodene rastvore koristi i pojednostavljena procedura očitavanja korektivnih vrijednosti površinskog napona direktno iz tabele. Za očitavanja koja se nalaze između tabelarnih vrijednosti koristi se interpolacija.

Tabela 1: *Korekcija izmjerenog površinskog napona*

r	9,55 mm (prosečan poluprečnik prstena)
r	0,185 mm (poluprečnik žice prstena)

Samo za vodene rastvore, ρ = 1 g/cm^3

Eksperimentalna vrijednost (mN/m)	Korigovana vrijednost (mN/m)	
	Kalibracija jahačem (dio 1.6.4.2.2.a) ove metode)	Kalibracija vodom (dio 1.6.4.2.2.b) ove metode)
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2

[16] Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc., 1930, vol. 52, p. 1751.

42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8

Tabela je izraĐena na osnovu Harkins-Džordanove korekcije. Alternativno, bez prethodne kalibracije, površinski napon se iizračunava prema formuli:[17]

$\sigma = \frac{F}{4\pi R} f$ gdje je: *F* sila izmjerena dinamometrom u tački prekida prevlake (filma); *R* poluprečnik prstena; *f* korektivni faktor.

3. Izvještaj

3.1. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju, sadrži podatke o: korišćenoj metodi;

- vrsti vode ili rastvora koji je korišćen; tačnom opisu supstance (identitet I nečistoće);
- rezultatima mjerenja: površinskog napona (očitavanje) sa navedenim pojedinačnim očitavanjima i njihovom aritmetičkom srednjom vrijednošću, kao i sa korigovanom srednjom vrijednošću (uzimajući u obzir faktor opreme i tabelu korekcije);
- koncentraciji rastvora;
- temperaturi ispitivanja;
- starosti korišćenog rastvora; naročito vrijeme između pripreme i mjerenja rastvora;
- opisu vremenske zavisnosti površinskog napona nakon prenosa rastvora u mjerni sud.

U izvještaju se navode svi podaci i primjedbe važne za tumačenje rezultata, naročito podaci o nečistoćama i fizičkom stanju supstance.

3.2. Tumačenje rezultata

Imajući u vidu da destilovana voda ima površinski napon 72,75 mN/m na temperaturi od 20°C, supstance koje imaju površinski napon niži od 60 mN/m u uslovima ove metode smatraju se površinski aktivnim.

A.6. RASTVORLJIVOST U VODI

DIO I

[17] Slična je tabeli koja je data u DIN standardu (DIN 53914) za vodu i vodene rastvore (gustine = 1 g/cm3) i za komercijalno dostupan prsten dimenzija R = 9,55 mm (srednji poluprečnik prstena) i r = 0,185 mm (poluprečnik žice prstena). Tabela sadrži korigovane vrednosti za merenja površinskog napona nakon kalibracije jahaćem ili vodom.

1. Metoda ispitivanja

Metode ispitivanja zasnivaju se na Uputstvu za ispitivanje OECD.

1.1. Uvod

Za ispitivanje rastvorljivosti u vodi treba imati podatke o: strukturnoj formuli, naponu pare, konstanti disocijacije i hidrolizi (u funkciji pH vrijednosti) supstance koja se ispituje. Pojedinačne metode ne obuhvataju cio opseg rastvorljivosti u vodi. Dvije metode ispitivanja pokrivaju cio opseg rastvorljivosti u vodi, ali se ne primjenjuju na isparljive supstance:

- jedna metoda se primjenjuje na čiste supstance koje imaju malu rastvorljivost ($<10^{-2}$ g/L) i koje su stabilne u vodi, a naziva se: "Metoda eluiranja sa kolone";
- druga metoda se odnosi na čiste supstance sa većom rastvorljivošću ($>10^{-2}$ g/L) i koje su stabilne u vodi, a naziva se: "Metoda staklenog suda". Prisustvo nečistoća značajno utiče na rastvorljivost ispitivane supstance u vodi.

1.2. Definicije i mjerne jedinice

Rastvorljivost supstance u vodi određena je masenom koncentracijom supstance u zasićenom vodenom rastvoru na određenoj temperaturi.

Rastvorljivost u vodi izražava se jedinicama mase po zapremini rastvora. Merna jedinica u MeĐunarodnom sistemu jedinica (SI) sistema je kg/m^3 (mogu se koristiti i g/L).

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance ne moraju da se koriste svaki put kada se ispituje nova supstanca. One prvenstveno služe za povremenu provjeru metode i da omoguće poređenje sa rezultatima dobijenim drugim metodama.

1.4. Princip metode

Preliminarnim ispitivanjima treba utvrditi približnu količinu uzorka i vrijeme neophodno da se postigne koncentracija zasićenog rastvora.

1.4.1. Metoda eluiranja sa kolone

Ova metoda zasniva se na eluiranju ispitivane supstance vodom iz mikrokolone koja je napunjena inertnim materijalom, kao što su granule stakla ili Pijesak, koji je prekriven supstancom koja se ispituje. Rastvorljivost u vodi određuje se kada masena koncentracija eluata postane konstantna. Rezultati se navode kao plato koncentracije u funkciji vremena

1.4.2. Metoda staklenog suda

Kod ovog postupka, supstanca (čvrste supstance moraju biti sprašene) se rassupstancaa u vodi na temperaturi nešto višoj od temperature ispitivanja. Kada doĐe do zasićenja, smješa se hladi i ostavlja da stoji na temperaturi na kojoj se vrši ispitivanje, uz miješanje dok se ne postigne ravnoteža. Mjerenje se može izvršiti i direktno na temperaturi na kojoj se ispituje, ukoliko se odgovarajućim uzorkovanjem može potvrditi da je postignuto ravnotežno

zasićenje. Nakon toga, primjenom odgovarajuće analitičke metode, utvrđuje se masena koncentracija supstance u vodenom rastvoru koji ne sme sadržavati nerastvorne čestice.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

1.5.1. Ponovljivost

Kod metode eluiranja sa kolone može se dobiti rezultat < 30 %, a kod metode staklenog suda očekivani rezultat je < 15 %.

1.5.2. Osjetljivost

Osjetljivost zavisi od metode analize, ali moguće je odrediti masene koncentracije do 10^{-6} g/L.

1.6. Opis metoda

1.6.1. Uslovi ispitivanja

Ispitivanje supstance se najčešće sprovodi na temperaturi od 20°C ± 0,5°C. Ukoliko se posumnja da rastvorljivost zavisi od temperature (>3% po °C), rastvorljivost se ispituje na još dve temperature koje moraju biti najmanje za 10°C niže ili više od početne temperature. U tom slučaju kontrola temperature treba da bude u opsegu ± 0,1°C. Izabrana temperatura treba da bude konstantna u svim važnim djelovima opreme.

1.6.2. Preliminarna ispitivanja

Približno 0,1 g uzorka (čvrste supstance moraju biti sprašene) prenese se u graduisanu menzuru sa staklenim zapušačem (zapremine 10 mL) i dodaju se postepeno povećane zapremine destilovane vode na sobnoj temperaturi u koracima datim u tabeli:

0,1 g rastvoren u 'x' mL vode	0,1	0,5	1	2	10	100	>100
Približno utvrĐena rastvorljivost (g/L)	>1000	1000 do 200	200 do 1000	100 do 50	50 do 10	10 do 1	<1

Nakon svakog dodavanja navedene količine vode, smješa se snažno mućka 10 minuta i treba vizuelno provjeriti da li ima nerastvornih djelova uzorka. Ukoliko nakon dodavanja 10 mL vode uzorak ili neki njegovi delovi ostaju nerastvoreni, eksperiment treba ponoviti u menzuri zapremine
100 mL sa većim zapreminama vode. Kod supstanci koje su slabo rastvorne u vodi vrijeme koje je neophodno da bi se rastvorila supstanca može biti znatno duže (najmanje 24 sata). Približna vrijednost rastvorljivosti iz Tabele odnosi se na zapreminu vode koja je nešto malo ispod one vrijednosti pri kojoj dolazi do potpunog rassupstancaanja supstance. Ukoliko je očigledno da se supstanca nije do kraja rastvorila, treba je ostaviti da se rassupstancaa duže od 24 sata (maksimum 96 sati) ili treba vršiti dalja razblaživanja kako bi se potvrdilo da li je za korišćenje pogodnija metoda eluiranja sa kolone ili metoda staklenog suda.

1.6.3. Metoda eluiranja sa kolone

1.6.3.1. Nosač, rassupstancaač i eluent

Nosač koji se koristi kod metode eluiranja sa kolone treba da bude inertan. Materijali koji se mogu koristiti su staklene kuglice i Pijesak. Za nanošenje uzorka na nosač koriste se isparljivi rassupstancaači analitičke čistoće. Za eluiranje se koristi bidestilovana voda koja je destilovana u staklenoj ili kvarcnoj aparaturi.

Napomena: Demineralizovana voda koja dolazi sa organskog jonoizmenjivača ne sme se koristiti.

1.6.3.2. Nanošenje supstance na nosač

Oko 600 mg nosača izmjeri se i unese u balon sa okruglim dnom zapremine 50 mL. Odgovarajuća, precizno izmjerena količina supstance koja se ispituje rastvori se u izabranom rassupstancaaču. Odgovarajuća količina ovog rastvora dodaje se na nosač. Rassupstancaač se mora u potpunosti upariti npr. upotrebom rotacionog vakuum uparivača. U suprotnom, ne može se postići optimalna vlažnost podloge zbog efekta raspodjele na površini nosača.
Punjenje nosača može proizvesti probleme (netačne rezultate) ukoliko se supstanca koja se ispituje deponuje u obliku ulja ili u različitoj kristalnoj fazi. Ovaj problem treba ispitati kroz eksperimente i sačiniti detaljan Izvještaj o tome.
Nosač se ostavi da se natapa oko dva sata u 5 mL vode, a potom se suspenzija prenosi u mikrokolonu. Alternativno, u mikrokolonu, koja je napunjena vodom, može se sipati osušeni nosač koji se ostavi u koloni oko dva sata da se uravnoteži.

Postupak ispitivanja:

Eluiranje supstance sa nosača može se izvesti:
- pomoću recirkulacione pumpe (Slika 1) ili
- pomoću suda za nivelisanje (Slika 4).

1.6.3.3. Metoda eluiranja sa kolone pomoću recirkulacione pumpe

Aparatura
Shematski prikaz opreme dat je na Slici 1. Odgovarajuća mikrokolona data je na Slici 2, iako je prihvatljiva bilo koja veličina koja ispunjava kriterijume koji se odnose ne reproduktivnost i osjetljivost. Kolona treba da ima dovoljno mjesta za najmanje pet zapremina vode i da može da izdrži pet uzoraka. Veličina kolone se može smanjiti ukoliko se koristi pripremljeni rastvor koji zamenjuje pet zapremina koje se koriste za uklanjanje nečistoća.

Kolona treba da bude povezana sa recirkulacionom pumpom sa kontrolisanim protokom oko 25 mL/h. Pumpa se povezuje pomoću politetrafluoretilenskih (u daljem tekstu: PTFE) i/ili staklenih konektora. Kolona i pumpa, kada se sastave, moraju da imaju mogućnost uzorkovanja efluenta i izjednačavanja pritiska. Materijal u koloni zadržava mali čep (5 mm) od staklene vune koji služi i kao filter za čestice nečistoća. Pumpa može biti peristaltička pumpa ili membranska puma (mora se voditi računa da ne doĐe da zagaĐenja i/ili apsorpcije materijala iz cijevi).

Mjerenje
Početi protok kroz kolonu. Preporučuje se da se koristi protok od oko 25 mL/h (to odgovara 10 zapremina/h za kolonu koja je opisana). Prvih pet zapremina (minimum) odbaciti kako bi se sa njima izdvojile nečistoće rastvorne u vodi. Nakon toga pumpa se ostavlja da radi sve dok se ne postigne ravnoteža. Smatra se da je uspostavljena ravnoteža kada se u pet nasumično uzetih uzastopnih uzoraka koncentracije ne razlikuju za više od ± 30 %. Ovi

uzorci treba da budu razdvojeni jedni od drugih po vremenskim intervalima koji odgovaraju prolasku najmanje 10 zapremina eluenta.

1.6.3.4. Metoda eluiranja sa kolone pomoću suda za nivelisanje

Aparatura
Kod metode eluiranja sa kolone pomoću suda za nivelisanje koristi se aparatura data na slikama 3 i 4.

Sud za nivelisanje: Spajanje sa sudom za nivelisanje vrši se upotrebom šlifovanog jedinjenjea koji je povezan pomoću cijevi od PTFE. Preporučuje se da se koristi protok od oko 25 mLl/h. Prikupljene frakcije analiziraju se izabranom metodom.

Mjerenje
Frakcije koje pripadaju srednjem opsegu elucije, kada su koncentracije konstantne (± 30%) u najmanje pet uzastopnih frakcija, koriste se da bi se odredila rastvorljivost u vodi.
U oba slučaja (kada se koristi pumpa ili posuda za nivelisanje) treba ispitati rastvorljivost sa upola manjim protokom u odnosu na prvo ispitivanje. Ukoliko se rezultati dva ispitivanja slažu, rezultat je zadovoljavajući. Ukoliko je rastvorljivost očigledno veća pri manjem protoku, mora se nastaviti prepolovljavanje brzine protoka sve dok dva sukcesivna ispitivanja ne daju približne rezultate.

U oba slučaja (kada se koristi pumpa ili posuda za nivelisanje) frakcije treba provjeriti na sadržaj koloidnih čestica Tindalovim efektom (raspršavanjem snopa svijetlosti). Prisustvo koloidnih čestica menja rezultate i ispitivanje treba ponoviti uz poboljšano filtriranje kroz kolonu.

Potrebno je izmjeriti pH vrijednost svakog uzorka. Ispitivanje pri manjem protoku izvodi se pri istoj temperaturi.

1.6.4. Metoda staklenog suda

1.6.4.1. Oprema
Za primjenu metode staklenog suda potrebno je:
- uobičajeno laboratorijasko posuĐe od stakla i instrumenti;
- uređaj pogodan za miješanje rastvora pri kontrolisanim konstantnim
- temperaturama; centrifuga (poželjno termostatirana), ukoliko se radi sa emulzijama;
- oprema za analitičko određivanje.

1.6.4.2. Mjerenje

Količina potrebnog materijala da bi se postiglo zasićenje željene zapremine vode utvrđuje se na osnovu preliminarnog ispitivanja. Zapremina vode koja je neophodna zavisi od primjenjene analitičke metode i opsega rastvorljivosti. Količina materijala (oko pet puta veća od one koja je utvrĐena preliminarnim ispitivanjem) odmjeri se i stavi u svaku od tri staklene posude koje imaju staklene zapušače (npr. epruvete ili kivete za centrifugiranje, baloni). Određena količina vode dodaje se u svaku posudu i one se čvrsto zatvore. Zatvorene posude potom se miješaju na temperaturi od 30°C. (Treba koristiti uređaj koji može da miješa pri konstantnoj temperaturi, npr magnetno miješanje u termostatiranom vodenom kupatilu). Nakon jednog dana, jedna od posuda se uklanja i ostavi se, uz povrijemeno miješanje, na temperaturi na kojoj se izvodi ispitivanje tokom 24 sata da bi se uspostavila

ravnoteža. Sadržaj posude se zatim centrifugira na temperaturi na kojoj se vrši ispitivanje i određuje se koncentracija supstance u vodenoj fazi upotrebom odgovarajuće analitičke metode. Preostale dve posude prolaze kroz isti postupak nakon početnog ujednačavanja pri temperaturi od 30°C u roku od dva odnosno tri dana. Ukoliko se koncentracije iz najmanje dve posude slažu sa željenom ponovljivošću, smatra se da je ispitivanje zadovoljilo kriterijume. Ispitivanje treba ponoviti, uz duže vrijeme uspostavljanja ravnoteže, ukoliko rezultati iz posuda 1, 2 i 3 pokazuju tendenciju povećanja vrijednosti.
Mjerenje se može vršiti bez perioda inkubacije na temperaturi od 30°C. Da bi se odredila brzina uspostavljanje ravnoteže zasićenja, uzorci se uzimaju do trenutka kada vrijeme miješanja više ne utiče na koncentraciju ispitivanog rastvora.

Potrebno je zabilježiti pH vrijednost svakog uzorka.

1.6.5. Analiza

Pri ovim odreĐivanjima za svaku određenu supstancu potrebno je primjeniti analitičku metodu koja je za nju odgovarajuća, s obzirom da male količine rastvorenih nečistoća mogu dovesti do velikih grešaka u odreĐivanju rastvorljivosti. Metode koje se primjenjuju mogu biti: gasna ili tečna hromatografija, metode titracije, fotometrijske metode, voltametrijske metode.

2. Podaci

2.1. Metoda eluiranja sa kolone

Potrebno je izračunati srednju vrijednost za najmanje pet uzastopnih uzoraka uzetih iz posude u kojoj se nalaze zasićeni rastvori, kao i vrijednost standardne devijacije. Rezultati treba da budu dati u jedinicama mase po zapremini rastvora.
Srednje vrijednosti izračunate za dva ispitivanja u kojima se koriste različite brzine protoka se upoređuju i treba da imaju ponovljivost manju od 30%.

2.2. Metoda staklenog suda

Treba prikazati pojedinačne rezultate za svaku od posuda i ukoliko su ovi rezultati konstantni
(ponovljivost manja od 15%), treba izračunati njihovu srednju vrijednost i izraziti je u jedinicama masa po zapremini rastvora. Ovo može zahtijevati presupstancaanje masenih jedinica u zapreminske jedinice, korišćenjem gustine kada je rastvorljivost veoma velika (>100 g/L).

3. Izvještaj

3.1. Metoda eluiranja sa kolone

Izvještaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži podatke o: rezultatima

- preliminarnih ispitivanja; preciznom opisu supstance (identitet i nečistoće);
- pojedinačnim koncentracijama, brzini protoka i pH vrijednosti za svaki uzorak;
- srednjoj vrijednosti i standardnoj devijaciji najmanje pet uzoraka iz područja zasićenja za svako ispitivanje;
- prosječnoj vrijednosti dva uzastopna, prihvatljiva ispitivanja; temperaturi vode
- pri pravljenju zasićenog rastvora; korišćenoj metodi analize; materijalu nosača;
- načinu nanošenja uzorka na nosač; korišćenom rassupstancaaču;
-
-
-
-

evidenciji, ako je došlo do hemijske nestabilnosti supstance za vrijeme ispitivanja i korišćenoj metodi.

U izvještaju se navode svi podaci i primjedbe važne za tumačenje rezultata, naročito podaci o nečistoćama i fizičkom stanju supstance.

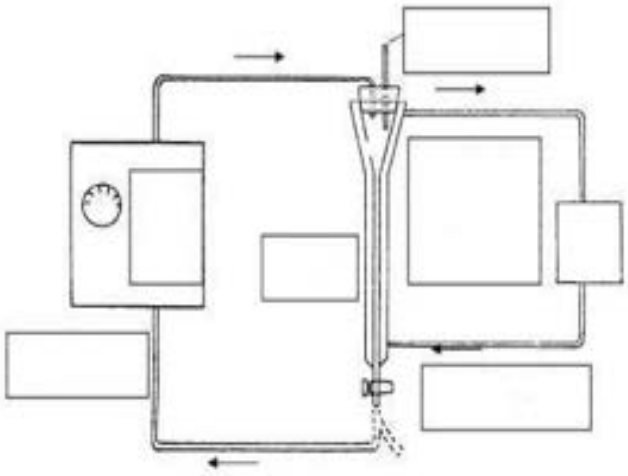
3.2. Metoda staklenog suda

Izvještaj o ispitivanju, sadrži podatke o:

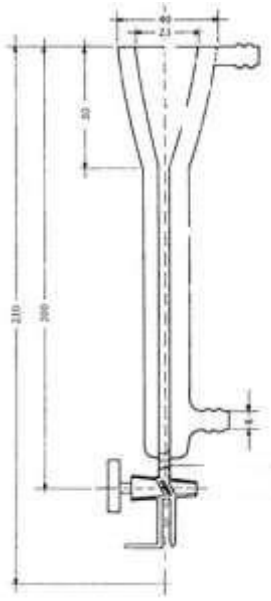
- rezultatima preliminarnog ispitivanja; preciznom opisu supstance (identitet i nečistoće);
- pojedinačnim analitičkim odreĐivanjima i srednjoj vrijednosti kada je određeno više od jedne vrijednosti za svaku posudu;
- pH vrijednosti svakog uzorka; temperaturi na kojoj je vršeno ispitivanje;
- prosječnoj vrijednosti rezultata od različitih posuda, a koji su u saglasnosti; korišćenoj analitičkoj metodi;
- evidenciji, ako je došlo do hemijske nestabilnosti supstance za vrijeme ispitivanja i korišćenoj metodi.

U izvještaju se navode svi podaci i primjedbe važne za tumačenje rezultata, naročito podaci o nečistoćama i fizičkom stanju supstance.

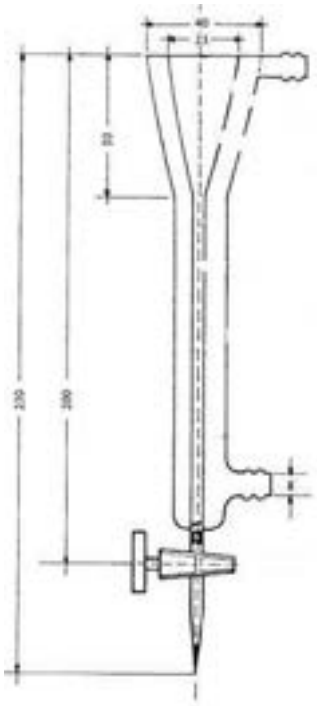
Drugi dio



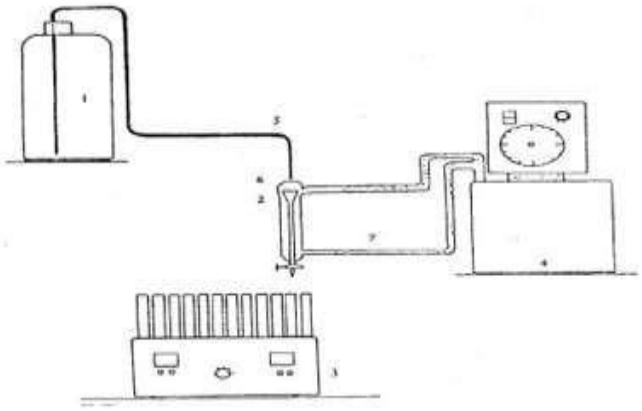
Slika 1: Metoda eluiranja sa kolone pomoću recirkulacione pumpe



Slika 2: Tipična mikrokolona (sve dimenzije date su u milimetrima*)*



Slika 3*: Tipična mikrokolona (sve dimenzije date su u milimetrima)*



Slika 4: Metoda eluiranja sa kolone pomoću suda za nivelisanje

gdje je: 1. Posuda za nivelaciju (npr. boca zapremine 2,5 L); 2. Kolona (Slika 3); 3. Kolektor frakcija; 4. Termostat; 5. Teflonska cijev; 6. Šlifovani jedinjenje; 7. Cijev za vodu (između termostata i kolone, unutrašnjeg prečnika: približno 8 mm).

A.8. KOEFICIJENT RASPODJELE

DIO I

1. Metoda ispitivanja

Metoda mućkanja u staklenom balonu zasniva se na Uputstvu za ispitivanje OECD. Ekvivalentna međunarodna ispitna metoda ili druge primjenjive ispitne metode za predmetnu krajnju tačku navedene su u tabeli dijela 0.

1.1. Uvod

Za metodu koeficijenta raspodjele potrebno je imati preliminarne podatke o: strukturnoj formuli, konstanti disocijacije, rastvorljivosti u vodi, hidrolizi, rastvorljivosti u n-oktanolu i površinskom naponu supstance koja se ispituje. Kod supstanci koje jonizuju ispitivanja se sprovode na njihovim nejonizovanim oblicima (slobodne kiseline ili slobodne baze) što se postiže upotrebom odgovarajućeg pufera čija je pH vrijednost najmanje za jednu jedinicu ispod (slobodne kiseline) ili iznad (slobodne baze) pH. Ova metoda ispitivanja obuhvata dvije različite metode: metodu mućkanja u staklenom balonu i visoko efikasnu tečnu hromatografiju (High performance liquid chromatography, u daljem tekstu: HPLC). Metoda mućkanja u staklenom balonu koristi se kada se vrijednost log P_{ow} (objašnjenje dato u ovoj metodi) nalazi u opsegu od -2 do 4. Metoda tečne hromatografije koristi se kada se vrijednost log P_{ow} nalazi u opsegu od 0 do 6. Prije nego što se pristupi sprovođenju bilo koje od ove dvije metode potrebno je odrediti preliminarne procjene koeficijenta raspodjele.

Metoda mućkanja u staklenom balonu primjenjuje se samo za čiste supstance rastvorne u vodi i noktanolu. Metoda se ne primjenjuje za površinski aktivne supstance (za njih se daje izračunati ili procjenjeni koeficijent raspodjele koji se zasniva na rastvorljivosti u vodi i u n-oktanolu).

Metoda tečne hromatografije (u daljem tekstu: HPLC metoda) ne primjenjuje se na jake kiseline i baze, komplekse metala, površinski aktivne supstance i supstance koje reaguju sa eluentom. Za ove supstance mora se izračunati ili procjeniti koeficijent raspodjele koji se zasniva na rastvorljivosti u vodi i u n-oktanolu. Metoda tečne hromatografije manje je osjetljiva na prisutne nečistoće u ispitivanom jedinjenju u odnosu na postupak mućkanja u staklenom balonu. Ponekad prisustvo nečistoća utiče na tumačenje rezultata jer položaj pikova postaje nesiguran. Kod smješa kod kojih se ne razdvajaju trake u hromatogramu, treba navesti gornji i donji limit logP.

1.2. Definicije i mjerne jedinice

Koeficijent raspodjele (P) je odnos ravnotežnih koncentracija (c_i) rastvorene supstance u dvofaznom sistemu koji se sastoji od dva rastvarača koji se ne miješaju. U slučaju n-oktanola i vode:

$$P = \frac{C_{n\text{-oktanola}}}{C_{vode}}$$

Koeficijent raspodjele (P) je količnik dvije koncentracije, koji se uobičajeno izražava u vidu logaritamske vrijednosti sa osnovom 10 (log P).

1.3. Referentne supstance

1.3.1. Metoda mućkanja u staklenom balonu

Referentne supstance ne koriste se svaki put kada se ispituje nova supstanca. One prvenstveno služe za povremenu provjeru metode i da omoguće poređenje sa rezultatima dobijenim drugim metodama.

1.3.2. Metoda tečne hromatografije

Da bi se uspostavila korelacija između izmjerenih HPLC vrijednosti supstance i njihovih P vrijednosti, konstruiše se kalibraciona kriva zavisnosti log P od hromatografskih podataka sa najmanje 6 referentnih tačaka. Korisnik bira odgovarajuću referentnu supstancu. Ako je moguće, najmanje jedna referentna supstanca ima P_{ow} veći od P_{ow} supstance koja se ispituje i jedna referentna supstanca ima P_{ow} manji od supstance koja se ispituje. Za vrijednosti log P manje od 4 kalibracija se zasniva na podacima dobijenim primjenom metode mućkanja u staklenom balonu. Za vrijednosti log P veće od 4 kalibracija treba da bude zasnovana na validovanim vrijednostima datim u literaturi ukoliko se one podudaraju sa izračunatim vrijednostima. Za postizanje bolje preciznosti, najbolje je kao referentne supstance uzeti one supstance koje su slične strukture kao supstanca koja se ispituje. Vrijednosti log P_{ow} dostupne su za mnoga hemijska jedinjenja[2,3]. Ukoliko ne postoje podaci o koeficijentu raspodjele za strukturno slične supstance, pravi se opštija kalibraciona kriva na osnovu podataka o drugim referentnim supstancama. Spisak preporučenih referentnih supstanci i njihovih log P_{ow} vrijednosti dat je u drugom dijelu ove metode.

1.4. Princip metode

1.4.1. Metoda mućkanja u staklenom balonu

Da bi se odredio koeficijent raspodjele, poštiže se ravnoteža između svih komponenti sistema i određuju se koncentracije rastvorene supstance u obije faze. Literatura upućuje da se u te svrhe propisuje nekoliko različitih tehnika, npr. miješanje dvije faze koje se potom razdvajaju kako bi se utvrdile ravnotežne koncentracije ispitivane supstance.

1.4.2. Metoda tečne hromatografije

HPLC se izvodi na analitičkim kolonama pakovanim sa komercijalno dostupnom čvrstom fazom koja sadrži duge lance ugljovodonika (npr. C_8, C_{18}) koji su hemijski vezani na silicijum dioksid. Hemikalije nanete na takve kolone kreću se kroz njih različitim brzinama zbog različite raspodjele između mobilne faze i ugljovodonične stacionarne faze. Smješe hemikalija razdvajaju se prema njihovoj hidrofobnosti, pri čemu se hemijska jedinjenja koja su rastvorna u vodi izdvajaju prva, a nakondnja se izdvajaju ona koja se rassupstancaaju u uljima, proporcionalno njihovom koeficijentu raspodjele ugljovodonik-voda. Ovo omogućava da se ustanovi veza između retencionog vremena na takvoj koloni (reversno-faznoj) i koeficijenta raspodjele za sistem n-oktanol/voda. Koeficijent raspodjele se izvodi iz faktora kapaciteta k, koji je dat u jednačini:

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

gdje je: t_r retenciono vrijeme supstance koja se ispituje; t_o prosječno vrijeme koje je potrebno molekulu rastvarača da prođe kroz kolonu (mrtvo vrijeme). Nije potrebna primjena kvantitativnih analitičkih metoda. Odrediti vrijeme elucije.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

1.5.1. Ponovljivost

Metoda mućkanja u staklenom balonu
U cilju obezbijeĐivanja tačnosti particionog koeficijenta, neophodno je vršiti po dva određivanja na tri različita uslova ispitivanja pri čemu količina supstance kao i odnos između zapremina rastvarača može da varira. UtvrĐene vrijednosti particionih koeficijenata izražene u logaritmima treba da budu u okviru ±0,3 jedinice.
HPLC metoda

U cilju obezbijeĐivanja povjerenja u rezultate mjerenja vrše se dva ispitivanja. Vrijednosti log P izvedene iz pojedinačnih mjerenja nalaze se u opsegu od ±0,1 jedinice log P.

1.5.2. Osjetljivost

Metoda mućkanja u staklenom balonu
Opseg mjerenja ove metode određuje detekcioni limit analitičkog postupka. Detekcioni limit treba da omogući određivanje vrijednosti log P_{ow} u opsegu od -2 do 4 (kada postoje uslovi, opseg se može proširiti na vrijednosti log P_{ow} do 5) kada koncentracija rastvorene supstance u bilo kom od rastvarača nije veća od 0.01 mol/L.

HPLC metoda HPLC metoda omogućava određivanje koeficijenta raspodjele u opsejgu log P_{ow} od 0 do 6.

Koeficijent raspodjele jedinjenja u normalnim okolnostima može se utvrditi uz varijaciju od ± 1 log P_{ow} jedinice vrijednosti dobijene mućkanjem u staklenom balonu. Veća tačnost postiže se kada se korelacija vrši preko strukturno sličnih referentnih jedinjenja.

1.5.3. Specifičnosti

Metoda mućkanja u staklenom balonu
Nernstov zakon raspodjele primjenjuje se samo pri konstantnoj temperaturi, pritisku i pH vrijednosti za razblažene rastvore. Primjenjuje se samo na čiste supstance raspodjeljene između dva čista rastvarača. Prisustvo više različitih rastvorenih supstanci u jednom ili oba rastvarača u isto vrijeme utiče na rezultate. Disocijacija ili asocijacija rastvorenih molekula dovodi do odstepena od Nernstovog zakona raspodjele. Na ova odstepena ukazuje pojava zavisnosti koeficijenta raspodjele od koncentracije rastvora. Zbog postojanja većeg broj ravnoteža, ovu metodu ne treba primjenjivati bez prethodne korekcije na supstance koje jonizuju. Kod ovakvih jedinjenja treba razmotriti upotrebu pufera umjesto vode. pH vrijednost pufera se razlikuje najmanje za jednu pH jedinicu od pKa supstance i treba voditi računa o uticaju te pH vrijednosti na životnu sredinu.

1.6. Opis metode

1.6.1. Preliminarna procjena koeficijenta raspodjele

Koeficijent raspodjele se najbolje procjenjuje primjenom računske metode (dio II ove metode) ili, kada je moguće, iz odnosa rastvorljivosti ispitivane supstance u čistim rastvaračima.

1.6.2. Metoda mućkanja u staklenom balonu 1.6.2.1. Priprema

n-oktanol: Za određivanje koeficijenta raspodjele koriste se rassupstancaači visoke čistoće (analitičke čistoće)

Voda: Koristi se destilovana ili bidestilovana voda koja je destilovana u staklenoj ili kvarcnoj aparaturi. Za jedinjenja koje jonizuju koriste se puferski rastvori umjesto vode ukoliko je opravdano.

Ne koristi se voda koja je prečišćena na jonoizmenjivaču.

1.6.2.1.1. Predzasićenje rastvarača

Prije nego što se pristupi određivanju particionog koeficijenta, rassupstancaači se zasićuju uzajamno, mućkanjem na temperaturi na kojoj se izvodi eksperiment. Ovo je najbolje uraditi tako što se u dvije velike boce u kojima se čuvaju analitički n-oktanol visoke čistoće ili voda doda dovoljna količina onog drugog rastvarača i mućka u mehaničkom šejkeru 24 sata, nakon čega odstoje sve dok se dva rastvarača ne razdvoje i ne dostigne zasićenje.

1.6.2.1.2. Priprema za ispitivanje

Ukupna količina dva rastvarača treba da skoro napuni sud. Ovako se sprečava gubitak ispitivanog jedinjenja usled isparavanja. Odnos zapremine i količine supstance koja se ispituje određen je:

- preliminarnom procjenom koeficijenta raspodjele (već dato objašnjenje);
- minimalnom količinom supstance koja se ispituje neophodnom za analitički postupak i
- ograničenjima koja se odnose na maksimalnu koncentraciju u oba rastvarača od 0,01 mola po litru.

Sprovode se tri ispitivanja. U prvom ispitivanju koristi se izračunat odnos zapremine n-oktanola prema vodi. U drugom ispitivanju ovaj odnos se dijeli sa dva. U trećem ispitivanju ovaj odnos množi se sa dva (npr. 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Ispitivana supstanca

Osnovni rastvor se priprema u n-oktanolu zasićenom vodom. Koncentracija osnovnog rastvora treba da bude precizno utvrĐena pre nego što se pristupi odreĐivanju koeficijenta raspodjele. Rastvor se čuva u uslovima koji omogućavaju da bude stabilan.

1.6.2.2. Uslovi ispitivanja

Temperatura ispitivanja treba da bude konstantna (± 1°C) u rasponu od 20°C do 25°C.

1.6.2.3. Mjerenje

1.6.2.3.1. Uspostavljanje ravnoteže raspodjele

Po dvije posude koje sadrže željene, precizno izmjerene količine dva rastvarača zajedno sa neophodnom količinom osnovnog rastvora su spremljene za svaki uslov ispitivanja. Faza noktanola mjeri se zapreminski. Posude za ispitivanje smiještaju se u prikladnu mućkalicu (šejker) ili ih treba ručno izmućkati. Kada se koriste kivete za centrifugiranje preporučeni način rukovanja je da se cijev rotira brzo za 180° oko transverzalne ose tako da vazduh koji je ušao prođe kroz obije faze. Iskustvo je pokazalo da je 50 takvih rotacija dovoljno da se uspostavi ravnoteža raspodjele. Preporučuje se 100 rotacija u roku od 5 minuta.

1.6.2.3.2. Odvajanje faza

Ako je neophodno, da bi se razdvojile faze, smješu se centrifugira. Dvofazni sistem se centrifugira na laboratorijaskoj centrifugi, na sobnoj temperaturi ili, ako se koristi centrifuga bez regulacije temperature, kivete se drže na temperaturi koja odgovara onoj u kojoj se sprovodi čitavo ispitivanje najmanje 1 sat prije ispitivanja.

1.6.2.4. Analiza

Da bi se odredio particioni koeficijent neophodno je odrediti koncentracije ispitivane supstance u obije faze. Ovo se može uraditi uzimanjem alikvota iz svake od dve faze iz svakog ispitivanja i analiziranjem ovih uzoraka. Ukupna količina supstance prisutna u obije faze je izračunata i uporeĐena sa količinom supstance koja je uneta na početku testa. Vodena faza je uzorkovana postupkom koji smanjuje rizik od uzorkovanja i tragova n-oktanola. Koristi se stakleni špric sa iglom za jednokratnu upotrebu za uzorkovanje vodene faze. Špric prethodno dijelimično napuniti vazduhom. Vazduh polako istiskivati dok igla prolazi kroz sloj n-oktanola. Zatim se odreĐena količina vodene faze usisa u špric. Špric se brzim pokretom izvuče iz rastvora, a igla odstrani. Sadržaj napunjenog šprica može se tada koristiti kao uzorak vodene faze. Koncentracija u dvije različite faze se utvrđuje korišćenjem metoda koje su odgovarajuće za svaku od supstanci. Neke od odgovarajućih metoda su: fotometrijske metode; gasna hromatografija; HPLC metoda.

1.6.3. HPLC metoda

1.6.3.1. Priprema

Oprema
Tečni hromatograf sa pumpom bez pulsa i odgovarajući detektor čine neophodnu opremu. Preporučuje se korišćenje injektora sa petljom. Prisustvo polarnih grupa u stacionarnoj fazi može ozbiljno da naruši preciznost kolone za tečnu hromatografiju. U stacionarnoj fazi treba da bude prisutan minimalni procenat polarnih grupa[1]. Koriste se komercijalna mikročestična reversno-fazna pakovanja ili prethodno pripremljene kolone. Između injektora i kolone može se postaviti predkolona.

Mobilna faza Za pripremu eluenta koriste se metanol HPLC čistoće i voda HPLC čistoće koji se degaziraju pre upotrebe. Treba koristiti izokratsku eluciju. Preporučuje se odnos metanol/voda sa minimalnim sadržajem vode u iznosu od 25%. Tipična smješa metanola i vode u odnosu 3:1 (v/v) koristi se za eluiranje jedinjenja sa logP 6 u roku od jednog sata, sa protokom od 1 ml/min. Za jedinjenja sa visokim logP nekada je potrebno skratiti vrijeme eluiranja (kao i za referentne supstance) smanjivanjem polarnosti mobilne faze ili dužine kolone.

Supstance koje su slabo rastvorne u n-oktanolu imaju tendenciju da daju niske log P_{ow} vrijednosti pri odreĐivanju HPLC metodom, pikovima takvih smješa je ponekad pridružen front rastvarača. Ovo se može objasniti činjenicom da je proces raspodjele previše spor da bi se dostigla ravnoteža u vremenu koje je obično neophodno za HPLC razdvajanje. Smanjenje brzine protoka i/ili snižavanje odnosa metanol/voda pomažu da se u tim slučajevima dobiju pouzdanije vrijednosti.

Supstanca koja se ispituje i referentna supstanca su rastvorne u mobilnoj fazi u dovoljnoj koncentraciji da mogu da se detektuju. Izuzetno se mogu koristiti aditivi kod smješe metanol-voda, pošto aditivi mijenjaju svojstva kolone. Kod hromatograma koji sadrže aditive koriste se posebne kolone istog tipa. Ukoliko smješa metanol-voda nije odgovarajuća, koristi se neka druga smješa organskog rastvarača i vode, npr. etanol i voda ili acetonitril i voda.

Vrijednost pH eluenta je kritična kod jedinjenja koja jonizuju. Ova vrijednost treba da se kreće u okviru radne pH vrijednosti kolone, koja obično iznosi između 2 i 8. Preporučuje se primjena pufera. Vodi se računa da ne doĐe do precipitacije soli na koloni i njenog uništavanja, što se dogaĐa kod pojedinih smješa organska faza/pufer. HPLC mjerenja sa stacionarnom fazom koja je na bazi silicijum-dioksida na pH vrijednostima iznad 8 ne preporučuju se pošto alkalne mobilne faze oštećuju kolonu i umanjuju performanse kolone.

Referentne supstance su čiste. Jedinjenja koje se koriste u ispitivanju ili za kalibraciju su rastvorna u mobilnoj fazi.

Uslovi ispitivanja
Temperatura tokom ispitivanja ne treba da varira za više od ±2K.

1.6.3.2. Mjerenje

Izračunavanje mrtvog vremena t_o
Mrtvo vrijeme se određuje korišćenjem serije homologa (npr n-alkil metil ketoni) ili organskih jedinjenja koja se ne zadržavaju na koloni (npr. tiokarbamid ili formamid). Da bi se izračunalo mrtvo vrijeme uz pomoć homologih serija, set od najmanje sedam članova

homologe serije se injektuje i mjere se retenciona vremena. Retenciona vremena $t_{r\,(nc+1)}$ ucrtavaju se na grafiku kao funkcija od $t_{r\,(n\,c)}$ i određuju se odsječak a i nagib b u jednačini:

$$t\,r\,(n\,c+1) = a + b\,t\,r\,(n\,c)$$

gdje je: n_c broj atoma ugljenika.

Mrtvo vrijeme se iizračunava jednačinom:

$$t_o = a/(1 - b)$$

Kalibraciona kriva
Sljedeći korak je da se napravi korelacija između log k vrijednosti prema log P vrijednostima za odgovarajuće referentne supstance. U praksi, set od između 5 i 10 standardnih referentnih supstanci čija log P vrijednost je u očekivanom opsegu injektuje se simultano i određuju se njihova retenciona vremena, preko integratora koji je povezan sa sistemom za detekciju. Odgovarajuće logaritamske vrijednosti faktora kapaciteta (log k) računaju se i ucrtavaju kao funkcije log P koji je utvrĐen primjenom postupka mućkanja u staklenom balonu. Kalibracija se obavlja u pravilnim intervalima, najmanje jednom dnevno, tako se kompenzuju izmjene u performansama kolona.

UtvrĐivanje faktora kapaciteta ispitivane supstance
Supstanca koja se ispituje injektuje se u najmanjoj mogućoj količini mobilne faze. Određuje se retenciono vrijeme (po dva određivanja), što omogućava iizračunavanje faktora kapaciteta (k). Sa kalibracione krive referentnih supstanci se interpoliše koeficijent raspodjele ispitivane supstance. Kod veoma niskih i veoma visokih vrijednosti koeficijenata raspodjele, neophodna je ekstrapolacija. Vodi se računa o granicama pouzdanosti regresione krive.

2. Podaci

Metoda mućkanja u staklenom balonu

Pouzdanost utvrĐenih vrijednosti za P se ispituje poređenjem srednjih vrijednosti iz oba ispitivanja sa ukupnom srednjom vrijednošću.

3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:

- preciznom opisu supstance (identitet i nečistoće);
- nemogućnosti primjene metode (npr. površinski aktivne supstance) i obezbjeĐivanju vrijednosti na osnovu rastvorljivosti u n-oktanolu i vodi;
- primjedbama važnim za tumačenje rezultata, naročito podacima o nečistoćama i fizičkom stanju supstance.

Izvještaj o ispitivanju kod postupka mućkanja u staklenom balonu sadrži: eventualne

- rezultate preliminarnih ispitivanja; temperaturu na kojoj je vršeno
- određivanje;
- podatke o analitičkim pokolonama kojima su odreĐivane koncentracije;
- vrijeme i brzinu centrifugiranja;

- izmjerene koncentracije u obije faze kod svakog određivanja (ukupno 12 koncentracija);
- masu ispitivane supstance, zapreminu svake faze u svakoj posudi i ukupne izračunate količine ispitivane supstance prisutne u svakoj fazi nakon uspostavljanja ravnoteže;
- izračunate vrijednosti particionog koeficijenta (P) i srednje vrijednosti za svaki set uslova ispitivanja kao i srednju vrijednost za sva određivanja. Ukoliko se smatra da postoji zavisnost koeficijenta raspodjele od koncentracije to se navodi u izvještaju;
- standardne devijacije individualnih P vrijednosti od srednje vrijednosti;
- srednju vrijednost P od svih određivanja treba da bude izražena u vidu logaritma (osnove 10);
- izračunatu teorijsku vrijednost P_{ow} ako je utvrĐena ili kada je izmjerena vrijednost $>10^4$;
- pH vrijednost korišćene vode i vodene faze tokom eksperimenta;
- ukoliko se koriste puferi, navode se razlozi za njihovu primjenu umjesto vode,
- njihov sastav, koncentracija i pH vrijednost, pH vodene faze pre i nakon eksperimenta.

Izvještaj o ispitivanju za HPLC metodu sadrži:

- eventualne rezultate prethodnih ispitivanja; ispitivanu supstancu i referentne
- supstance, i stepen njihove čistoće; temperaturni opseg pri ispitivanju; pH
- vrijednosti na kojoj je odreĐivan koeficijent raspodjele;
- detalje o analitičkoj koloni, predkoloni, mobilnoj fazi i načinima detekcije;
- podatke o retencionim vremenima i literaturnim vrijednostima log P referentnih
- supstanci korišćenih za kalibraciju;
- detalje o regresionoj krivoj (log k prema log P); prosječna retenciona vremena
- i interpolirane vrijednosti log P za ispitivano jedinjenje; opis opreme i uslova
- ispitivanja; elucioni profil; količine ispitivanih i referentnih supstanci koje su unete
- u kolonu; mrtvo vrijeme i način na koji je izmjereno.
-
-

METODE IZRAČUNAVANJA/PROCJENE
DIO II

Uvod

Izračunate vrijednosti P_{ow} koriste se u sljedeće svrhe:

- da se izabere odgovarajuća eksperimentalna metoda (opseg za metodu mućkanja u staklenom balonu: log P_{ow}: -2 do 4, opseg za HPLC metodu: log P_{ow} od 0 do 6);
- za izbor odgovarajućih uslova ispitivanja (npr. referentne supstance za HPLC postupak, odnos zapremina n-oktanol/voda kod postupka mućkanja u staklenom balonu);
- kao interna laboratorijaska provjera mogućih eksperimentalnih grešaka;
- da se obezbijede procijenjene vrijednosti za P_{ow} u slučajevima kada se ne mogu primjeniti eksperimentalne metode iz tehničkih razloga.

Metoda procjene

Preliminarna procjena particionog koeficijenta

Vrijednost particionog koeficijenta procjenjuhe se na osnovu rastvorljivosti ispitivane supstance u čistim rastvaračima:

$$P_{procijenjeno} = \frac{zasićasiće\ cnoktanol}{zasićasiće_{voda}}$$

Metode izračunavanja

Princip metoda izračunavanja

Sve metode izračunavanja zasnivaju se na fragmentaciji molekula na odgovarajuće manje strukture za koje je poznat doprinos vrijednosti P_{ow}. Vrijednost log P_{ow} koja se odnosi na čitav molekul iizračunava se potom kao zbir odgovarajućih vrijednosti fragmenata plus zbir korekcija zbog intramolekulskih interakcija.

Kriterijumi kvaliteta

Pouzdanost metode izračunavanja opada sa povećanjem složenosti jedinjenja. Kod jednostavnih molekula sa malim molekulskim masama i jednom ili dve funkcionalne grupe, može se očekivati odstepene od 0,1 do 0,3 jedinica vrijednosti log P_{ow} između rezultata različitih metoda fragmentacije i izmjerene vrijednosti. U slučaju složenijih molekula granica greške može biti i veća. Granica greške zavisi od pouzdanosti i dostupnosti vrijednosti konstanti koje se odnose na određene fragmente, kao i od sposobnosti da se prepoznaju intramolekulske interakcije (npr. vodonične veze) i od pravilne upotrebe korekcija (problem je manji ako se koristi kompjuterski softver CLOGP-3)[b]. Kod jedinjenja koja jonizuju važno je ispravno tumačenje naelektrisanja i stepena jonizacije.

Postupak izračunavanja

Hanšova π- metoda
Originalna konstanta π hidrofobnog supstituenta koju je uveo Fujira sa grupom autora[f] definiše se na sljedeći način:

$\pi_x = \log P_{ow}(PhX) - \log P_{ow}(PhH)$

gdje je: P_{ow} (PhX) particioni koeficijent supstituisanog aromatičnog derivata; P_{ow} (PhH) koeficijent nesupstituisanog jedinjenja.

Na primjer: $\pi_{Cl} = \log P_{ow}(C_6H_5Cl) - \log P_{ow}(C_6H_6) = 2,84 - 2,13 = 0,71$.

U skladu sa definicijom ova metoda se prije svega primjenjuje kod aromatičnih supstituenata. π vrijednosti za veliki broj ovakvih supstituenata date su u tabeli[b, c, d]. Ove vrijednosti se koriste za iizračunavanje log P_{ow} za aromatične molekule ili fragmenata.

Rijekerova metoda
Prema Rijekeru[g] log P_{ow} iizračunava se na sljedeći način:

$$\text{Log Pow} = \sum_i a_i l_i + \sum_i \text{članovi int erakcije}$$

gdje je: f_i konstante različitih fragmenata molekula; a_i učestalost različitih fragmenata molekula u molekulu koji se ispituje.

Korekcioni članovi se izražavaju kao proizvod integrala sa jednom konstantom Cm (tzv. magična konstanta). Vrijednosti konstanti za f_i i c_m utvrĐene su na osnovu podataka iz spiska u kome se nalazi 1054 eksperimentalno određenih vrijednosti P_{ow} (825 jedinjenja), primjenom regresione analize[c, h]. Određivanje interakcijskih termina sprovodi se na osnovu pravila datih u literaturi [e, h, i].

Hanš-Leov metod

Prema Hanšu i Leu[c] vrijednost log P_{ow} iizračunava se iz jednačine:

$$\text{Log } P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j {}_j b F_j$$

gdje je: f_i konstantne različitih fragmenata molekula; F_j korektivna vrijednost; a a_i i b_j odgovarajuća učestalost nalaženja u molekulu. Izvedene na osnovu vrijednosti P_{ow} utvrĐenih eksperimentalnim putem, vrijednosti konstanti atoma i grupa u molekulu i korektivne vrijednosti F_j (tzv. faktori) iz spiska određene su metodom pokušaja i grešaka. Korektivne vrijednosti podijeljene su u nekoliko različitih klasa[a, c]. Relativno je komplikovano i oduzima dosta vremena da se vodi računa o svim pravilima i svim korektivnim vrijednostima. U tu svrhu razvijeni su odgovarajući softveri[b].

Kombinovana metoda

Iizračunavanje log P vrijednosti kod složenih molekulskih struktura je znatno poboljšano, ukoliko se molekul razdvoji u veće podstrukture za koje postoje pouzdane log P vrijednosti, koje su dostupne u tabelama[b, c] ili na osnovu sopstvenih mjerenja. Takvi fragmenti (npr. heterociklična jedinjenja, antrahinon, azobenzen) potom se mogu kombinovati sa Hanšovim π vrijednostima ili Rijekerovim ili Leovim konstantama. [25]

Izvještaj

Kada se koristi metoda proračuna/procjene Izvještaj o izvršenom ispitivanju sadrži:

- opis supstance (smješa, nečistoće, itd.);
- indikacije o mogućim vodoničnim vezama, disocijaciji, naelektrisanju i svim drugim efektima (npr. tautodnosiji); opis metoda izračunavanja; identifikacija baze podataka;
- osobenosti pri izboru fragmenata; opsežna dokumentacija o proračunima.

REFERENTNE SUPSTANCE ZA HPLC

DIO III

Br.	Referentna supstanca	log Pow	pKa
1	2- butanon	0,3	
2	4-acetilpiridin	0,5	
3	anilin	0,9	

4	acetanilid	1,0	
5	benzil alkohol	1,1	
6	*p*-metoksifenol	1,3	pKa = 10,26
7	fenoksisirćetna kiselina	1,4	pKa = 3,12
8	fenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	benzonitril	1,6	
11	fenilacetonitril	1,6	
12	4-metilbenzil alkohol	1,6	
13	acetofenon	1,7	
14	2-nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	3- nitrobenzoeva kiselina	1,8	pKa = 3,47

25

1) Metoda izračunavanja se može primjeniti na djelimično ili potpuno jonizovana jedinjenja kada je moguće uzeti u obzir neophodne korektivne faktore.

2) Ukoliko se pretpostavlja postojanje vodoničnih veza, moraju se dodati odgovarajući korektivni faktori (oko +0,6 do +1,0 log Pow jedinica). Prisustvo takvih veza u molekulu može se pretpostaviti na osnovu stereo modela ili na osnovu analize spektroskopskih podataka molekula.

3) Ukoliko je moguće više tautomernih oblika, treba koristiti najverovatniji oblik kao osnovu za proračune. 4) Pažljivo treba pratiti revizije spiska sa konstantama fragmenata molekula.

16	4-hloranilin	1,8	pKa = 4,15
17	nitrobenzen	1,9	
18	cimet alkohol	1,9	
19	benzoeva kiselina	1,9	pKa=4,19
20	*p*-krezol	1,9	pKa=10,17
21	cimetna kiselina	2,1	pKa=3,89 cis 4,44 trans
22	anizol	2,1	
23	metil-benzoat	2,1	
24	benzen	2,1	
25	3-metilbenzoeva kiselina	2,4	pKa = 4,27
26	4-hlorfenol	2,4	pKa = 9,1
27	trihloreten	2,4	

28 atrazin	2,6	
29 etilbenzoat	2,6	
30 2,6-dihlorbenzonitril	2,6	
31 3-hlorbenzoeva kiselina	2,7	pKa = 3,82
32 toluen	2,7	
33 1-naftol	2,7	pKa = 9,34
34 2,3-dihloranilin	2,8	
35 hlorbenzen	2,8	
36 alilfenil etar	2,9	
37 brombenzen	3,0	
38 etilbenzen	3,2	
39 benzofenon	3,2	
40 4-fenilfenol	3,2	pKa=9,54
41 timol	3,3	
42 1,4-dihlorbenzen	3,4	
43 difenilamin	3,4	pKa = 0,79
44 naftalen	3,6	
45 fenil-benzoat	3,6	
46 izopropilbenzen	3,7	
47 2,4,6-trihlorfenol	3,7	pKa = 6
48 bifenil	4,0	
49 benzil-benzoat	4,0	
50 2,4-dinitro-6 *sec*-butilfenol	4,1	
51 1,2,4-trihlorbenzen	4,2	
52 dodekanska kiselina	4,2	
53 difenil-etar	4,2	
54 n-butilbenzen	4,5	
55 fenantren	4,5	
56 fluoranten	4,7	
57 dibenzil	4,8	
58 2,6-difenilpiridin	4,9	

59 trifenilamin	5,7
60 DDT	6,2

A.9. TAČKA PALJENJA

1. Metoda ispitivanja

Ekvivalentna međunarodna ispitna metoda ili druge primjenjive ispitne metode za predmetnu krajnju tačku navedene su u tabeli 1 dijela 0.

1.1. Uvod

Za izvođenja ispitivanja tačke paljenja treba imati podatke o zapaljivosti supstance. Postupak ispitivanja primjenjuje se na tečne supstance čije se pare pale izvorom paljenja. Date metode pouzdane su za opsege tačke paljenja koji su dati u pojedinačnim metodama. Prilikom izbora metode koja će se primjenjivati u postupku ispitivanja, uzima se u obzir mogućnost pojave hemijskih reakcija između supstance i posude za uzorak.

1.2. Definicije i mjerne jedinice

Tačka paljenja je najniža temperatura, korigovana na pritisak od 101,325 kPa, pri kojoj tečnost proizvodi paru u uslovima definisanim u ovoj metodi, u dovoljnoj količini za stvaranje zapaljive smješe pare i vazduha u tom sudu. Mjerne jedinice: stepen Celzijusa (°C). t = T - 273,15 gdje je: t temperatura u stepenima Celzijusa (°C) i T temperatura u stepenima Kelvina (K).

1.3. Referentne supstance

Prilikom ispitivanja nove supstance ne koriste se u svim slučajevima referentne supstance. One prije svega služe za povremenu provjeru metode, kao i da omoguće poređenje sa rezultatima ostalih metoda.

1.4. Princip metode

Supstanca se unosi u sud za ispitivanje i zagrijeva se ili se hladi do temperature ispitivanja u skladu sa postupkom opisanim u pojedinačnoj metodi ispitivanja. Ispitivanje paljenja vrši se radi utvrĐivanja da li se uzorak pali na temperaturi ispitivanja.

1.5. Kriterijumi kvaliteta 1.5.1. Ponovljivost

Ponovljivost varira prema opsegu tačke paljenja i metode koja se koristi, maksimalno 2°C.

1.5.2. Osjetljivost

Osjetljivost zavisi od korišćene metode ispitivanja.

1.5.3. Specifičnost

Specifičnost nekih metoda ograničena je opsegom tačke paljenja i zavisi od osobina supstance (npr. visoka viskoznost).

1.6. Opis metode

1.6.1. Priprema

Uzorak supstance za ispitivanje unosi se u aparaturu za ispitivanje u skladu sa dijelom 1.6.3.1, odnosno sa dijelom 1.6.3.2. ove metode. Kada se ispituju energijom bogate ili toksične supstance, iz sigurnosnih razloga se preporučuje primjena metode koja koristi manju količinu uzorka, oko 2 cm^3.

1.6.2. Uslovi ispitivanja

Uređaj se postavlja u položaj u kome nema poljašnjih uticaja, vodeći računa o bezbjednosti.

1.6.3. Postupak ispitivanja

1.6.3.1. Metoda ravnoteže

Za metodu ravnoteže koriste se standardi: MEST EN ISO 1516, MEST EN ISO 3680, MEST EN ISO 1523, MEST EN ISO 3679.

1.6.3.2. Metoda neravnoteže

Metoda po Abelu

Metoda po Abel-Penskom aparatura

Kada tačka paljenja, određena metodom neravnoteže iz dijela 1.6.3.2. ove metode, iznosi 0°C ± 2°C, 21°C ± 2°C ili 55°C ± 2°C, tačku paljenja potvrđujemo metodom ravnoteže uz upotrebu iste aparature. Za davanje podataka koriste se isključivo metode koje daju temperaturu tačke paljenja. Za određivanje tačke paljenja viskoznih tečnosti (boje, lijepkovi i sl.) koje sadrže rassupstancaače, koristi se aparatura i metode koji su prikladni za određivanje tačke paljenja viskoznih tečnosti. Za navedeno se koriste standardi: MEST EN ISO 3679, MEST EN ISO 3680, MEST EN ISO 1523.

2. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži:

- tačan opis supstance (identifikaciju i nečistoće);
- podatke o korišćenoj metodi, kao i mogućim odstepenima;
- rezultate i dodatne napomene značajne za tumačenje rezultata.

A.10. ZAPALJIVOST (ZA ČVRSTE SUPSTANCE)

1. Metoda ispitivanja

Ekvivalentna međunarodna ispitna metoda ili druge primjenjive ispitne metode za predmetnu krajnju tačku navedene su u tabeli 1 dijela 0.

1.1. Uvod

Za ispitivane zapaljivosti (za čvrste supstance) treba imati podatke o mogućim eksplozivnim svojstvima supstance. Ovo ispitivanje primjenjuje se isključivo na praškaste supstance, supstance u obliku paste ili u granulama. Kako bi se izbjeglo da se u ovu kategoriju svrstaju sve zapaljive supstance, već samo one koje brzo gore ili supstance čije je ponašanje u toku gorenja na bilo koji način opasno, u kategoriju lako zapaljivih svrstavaju se samo supstance čija brzina sagorijevanja prelazi utvrĐene granične vrijednosti.

Posebnu opasnost predstavlja širenje usijanja kroz metalni prah zbog poteškoća koje se mogu javiti pri gašenju požara. Metalni prah se smatra visoko zapaljivom supstancom ukoliko podržava širenje usijanja kroz masu u određenom vremenskom roku.

1.2. Mjerne jedinice

Vrijeme sagorijevanja izražava se u sekundama.

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance nisu date.

1.4. Principi metode

Supstanca se oblikuje u vidu neprekidne trake ili neprekidnog praškastog traga dužine 250 mm. Preliminarno ispitivanje vrši se sa ciljem da se utvrdi da li dolazi do širenja gorenja sa razvojem plamena ili do tinjanja kada se supstanca zapali plamenikom na gas. Ukoliko se vatra proširi u dužini od 200 mm u određenom vremenskom roku, sprovodi se kompletno ispitivanje kako bi se utvrdila brzina sagorijevanja.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta nisu dati.

1.6. Opis metode

1.6.1. Preliminarno ispitivanje

Supstanca se oblikuje u vidu neprekidne trake ili neprekidnog praškastog traga dužine 250 mm, širine 20 mm i visine 10 mm na nezapaljivoj, neporoznoj podlozi koja slabo sprovodi toplotu. Vreo plamen iz plamenika na gas (minimalni prečnik 5 mm) prinosi se jednom kraju praškastog traga supstance sve dok se prah ne zapali ili maksimalno 2 minuta (5 minuta za metalni prah ili legure metala). Prati se da li se gorenje širi kroz trag u dužini od 200 mm u roku od 4 minuta (ili 40 minuta za metalni prah). Ukoliko se u roku od 4 minuta (ili 40 minuta za metalni prah) supstanca ne zapali i gorenje se ne proširi uz razvijanje plamena ili tinjanje u dužini od 200 mm praškastog traga ispitivane supstance, supstanca se ne smatra lako zapaljivom i nije potrebno vršiti dalje ispitivanje. Ukoliko se za manje od 4 minuta, ili za manje od 40 minuta kada je reč o metalnom prahu, ispitivana supstanca zapali i požar se proširi po uzorku u dužini od 200 mm, primjenjuje se postupak iz dijela 1.6.2. ove metode i ostalih djelova.

1.6.2. **Određivanje brzine gorenja**

1.6.2.1. Priprema

Praškasta ili supstanca u granulama naspe se u kalup dužine 250 mm sa poprečnim presjekom u obliku trougla unutrašnje visine 10 mm i širine 20 mm. Sa obije strane kalupa montiraju se dvije metalne ploče kao stranični graničnici koji prelaze gornju ivicu kalupa za 2 mm (slika). Kalup se zatim tri puta ispusti sa visine od 2 cm na čvrstu podlogu. Ukoliko je potrebno kalup se ponovo napuni. Poprečni graničnici se zatim skinu, a višak supstance očisti. Preko kalupa se stavlja ploča od nezapaljivog, neporoznog materijala koji slabo sprovodi toplotu, cijela aparatura se okrene naopako, a zatim se ukloni kalup. Supstance u obliku paste razmažu se po podlozi koja je napravljena od nezapaljivog, neporoznog materijala koji slabo sprovodi toplotu u obliku užeta dužine 250 mm sa poprečnim presjekom oko 1 cm^2.

1.6.2.2. Uslovi ispitivanja

U slučaju supstanci koje su osjetljive na vlagu ispitivanje se vrši što je brže moguće nakon što se supstanca izvadi iz posude.

1.6.2.3. Postupak ispitivanja

Formira se uzorak i postavlja u digestor. Brzina protoka vazduha je dovoljna da spriječi širenje dima laboratorijaom i da se ne mijenja tokom ispitivanja. Oko aparature je podignut zaklon. Vreo plamen iz plamenika na gas (minimalni prečnik 5 mm) koristi se da se zapali supstanca na jednom kraju. Kada se supstanca upali sa razdaljine od 80 mm, na narednih 100 mm mjeri se brzina gorenja. Ispitivanje se ponavlja šest puta, i svaki put se koristi čista hladna ploča, osim ukoliko se ranije dobiju pozitivni rezultati.

2. Podaci

Za metodu određivanja brzine gorenja potrebni su podaci o: vremenu sagorijevanja dobijenom na preliminarnom ispitivanju (dio 1.6.1. ove metode) i najkraćem vremenu sagorijevanja od najviše šest ispitivanja (dio 1.6.2.3. ove metode).

3. Izvještavanje

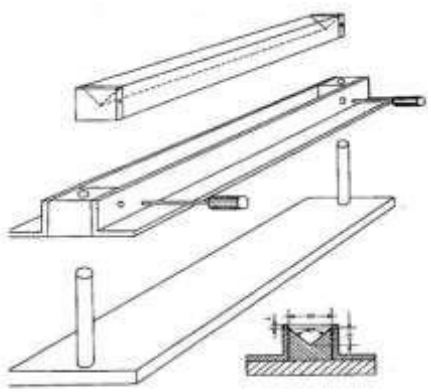
3.1. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži: precizan opis supstance (identifikacija i nečistoće);

- opis supstance koju treba ispitati, njeno fizičko stanje uključujući sadržaj
- vlage; rezultate preliminarnog ispitivanja i ispitivanja za utvrĐivanje brzine
- sagorijevanja, ukoliko je izvršeno;
- sve dodatne podatke značajne za tumačenje rezultata.

3.2. Tumačenje rezultata

Praškaste supstance i supstance u obliku granula ili paste smatraju se lako zapaljivima kada je vrijeme sagorijevanja na bilo kom od sprovedenih ispitivanja opisanih u dijelu 1.6.2. ove metode manje od 45 sekundi. Metalni prah ili legure metala smatraju se lako zapaljivim supstancama kada se mogu zapaliti ili se zona reakcije proširi na cio uzorak u roku od 10 minuta ili manje.



Slika 1: Kalup i pribor za pripremu uzorka za ispitivanje (Sve dimenzije izražene su u milimetrima).

A.11. ZAPALJIVOST (ZA GASOVE)

1. Metoda ispitivanja

Ekvivalentna međunarodna ispitna metoda ili druge primjenjive ispitne metode za predmetnu krajnju tačku navedene su u tabeli 1 dijela 0.

1.1. Uvod

Metoda ispitivanja zapaljivosti (za gasove) utvrđuje da li su gasovi zapaljivi u smješi sa vazduhom na sobnoj temperaturi (oko 20 °C) i atmosferskom pritisku, i ako jesu, u kojim opsezima koncentracija. Smješe ispitivanog gasa (u rastućim koncentracijama) i vazduha izlažu se dejstvu električne varnice i posmatra se da li dolazi do paljenja.

Opseg zapaljivosti je opseg koncentracija između donje i gornje granice eksplozivnosti. Donja i gornja granica eksplozivnosti su one granične koncentracije zapaljivih gasova u smješi sa vazduhom kod kojih ne dolazi do pojave plamena.

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance nisu date.

1.4. Princip metode

Koncentracija gasa u vazduhu povećava se postepeno i smješa se izlaže električnoj varnici.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta nisu dati.

1.6. Opis metode

1.6.1. Aparatura

Posuda za ispitivanje je uspravni stakleni cilindar minimalnog unutrašnjeg prečnika 50 mm i minimalne visine 300 mm. Elektrode za paljenje postavljaju se na rastojanju od 3 mm do 5 mm i 60 mm iznad dna cilindra. Cilindar ima otvor za odušak. Aparatura je zaštićena da bi se spriječila eventualna oštećenja usled eksplozije. Kao izvor paljenja koristi se standardna indukciona varnica trajanja 0,5 sekundi, koju proizvodi visokonaponski transformator izlaznog napona od 10 kV do 15 kV (maksimalne snage 300 W). Primjer odgovarajuće aparature dat je u literaturi[2].

1.1.6.2. Uslovi ispitivanja

Ispitivanje se izvodi na sobnoj temperaturi (oko 20 °C).

1.6.3. Postupak ispitivanja

U stakleni cilindar se pomoću pumpi uvodi poznata koncentracija gasa u vazduhu. Varnica se propušta kroz smješu i posmatra se da li se plamen odvaja od izvora paljenja i da li se razvija samostalno. Koncentracija gasa se mijenja u koracima od 1% zapreminski sve dok ne dođe do
paljenja. Ako hemijska struktura gasa ukazuje da je on nezapaljiv i ako se može izračunati sastav stehiometrijske smješe sa vazduhom, onda se samo smješe u opsegu 10 % manje od stehiometrijskog sastava do 10 % više od ovog sastava ispituju u koracima od 1 % zapreminski.

2. Podaci

Značajan podatak za određivanje svojstva zapaljivosti je pojava i razvoj plamena. **3.**

Izvještavanje

Izvještaj o ispitivanju sadrži:

- precizan opis supstance (identifikaciju i nečistoće);
- opis korišćene aparature sa njenim dimenzijama;
- temperaturu na kojoj je supstanca ispitivana;
- ispitane koncentracije i dobijene rezultate;
- rezultat ispitivanja: nezapaljivi gas ili lako zapaljivi gas;
- ukoliko je zaključeno da je gas nezapaljiv, unose se podaci o opsegu koncentracija koji je ispitan u koracima od 1 % zapreminski;
- sve podatke i napomene značajne za tumačenje rezultata.

A.12. ZAPALJIVOST (U KONTAKTU SA VODOM)

1. Metoda ispitivanja

Ekvivalentna međunarodna ispitna metoda ili druge primjenjive ispitne metode za predmetnu krajnju tačku navedene su u tabeli 1 dijela 0.

1.1. Uvod

Metodom ispitivanja zapaljivosti (u kontaktu sa vodom) utvrđuje se da li se u reakciji supstance sa vodom ili vlažnim vazduhom razvijaju opasne količine gasa ili gasova koji mogu biti veoma zapaljivi. Metoda se primjenjuje i na čvrste i na tečne supstance, a ne primjenjuje se na supstance koje se spontano pale u kontaktu sa vazduhom. Veoma zapaljiva supstanca je supstanca koja u kontaktu sa vodom ili vlažnim vazduhom razvija veoma zapaljive gasove u opasnim količinama, minimalnom brzinom od 1 L/kg po satu.

1.3. Principi metode

Supstanca se ispituje postupno (korak po korak) kako je opisano u ovom dijelu. Ukoliko se u bilo kom koraku razvije plamen, ispitivanje se ne nastavlja. Ukoliko je poznato da supstanca ne razvija burnu reakciju sa vodom, treba nastaviti sa sprovođenjem ispitivanja do koraka 4 (dio 1.3.4. ove metode).

1.3.1. Korak 1

Supstanca koja se ispituje stavlja se u posudu sa destilovanom vodom temperature 20 °C i prati se da li će se zapaliti gasovi koji se pri tom razvijaju.

1.3.2. Korak 2

Ispitivana supstanca stavlja se na filter papir koji pluta po površini posude sa destilovanom vodom temperature 20 °C i prati se da li će se zapaliti gasovi koji se pri tom razvijaju. Filter papir se stavlja da bi zadržao supstancu na jednom mjestu čime se povećava mogućnost da se ona zapali.

1.3.3. Korak 3

Ispitivana supstanca formira se u obliku gomile, visine oko 2 cm i prečnika oko 3 cm. Na tako napravljenu gomilu doda se nekoliko kapi vode i prati se da li će se zapaliti gasovi koji se pri tom razvijaju.

1.3.4. Korak 4

Supstanca koja se ispituje miješa se sa destilovanom vodom temperature od 20 °C i mjeri se brzina razvijanja gasova u periodu od sedam sati, u intervalima od jednog sata. Ukoliko je brzina razvijanja gasova promjenljiva, ili ukoliko se stalno povećava, nakon sedam sati mjerenja, vrijeme posmatranja treba produžiti maksimalno do pet dana. Ispitivanje se može prekinuti kada brzina razvijanja gasova pređe 1 L/kg na sat.

1.4. Referentne supstance

Referentne supstance nisu date.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta nisu dati.

1.6. Opis metode

1.6.1. Korak 1

1.6.1.1. Uslovi ispitivanja

Ispitivanje se izvodi na sobnoj temperaturi (oko 20 °C).

1.6.1.2. Postupak ispitivanja

Malu količinu supstance koja se ispituje (oko 2 mm u prečniku) staviti u posudu sa destilovanom vodom. Prati se da li se razvija neki gas i da li se taj gas pali. Ukoliko se zapali gas koji se tako razvio, ne nastavlja se sa ispitivanjem supstance jer se ona smatra opasnom.

1.6.2. Korak 2

1.6.2.1. Aparatura

Filter papir koji pluta po površini destilovane vode u odgovarajućem sudu, npr. šolji za uparavanje prečnika 100 mm.

1.6.2.2. Uslovi ispitivanja

Ispitivanje se izvodi na sobnoj temperaturi (oko 20 °C).

1.6.2.3. Postupak ispitivanja

Malu količinu supstance koja se ispituje (oko 2 mm u prečniku) staviti na centar filter papira. Prati se da li se razvija neki gas i da li se taj gas pali. Ukoliko se zapali gas koji se tako razvio, ne nastavlja se sa ispitivanjem supstance, jer se ona smatra opasnom.

1.6.3. Korak 3

1.6.3.1. Uslovi ispitivanja

Ispitivanje se izvodi na sobnoj temperaturi (oko 20°C).

1.6.3.2. Postupak ispitivanja

Supstanca koja se ispituje formira se u obliku gomile visine oko 2 cm i prečnika oko 3 cm sa ulegnućem na vrhu. Nekoliko kapi vode ubaci su u šupljinu formiranu na vrhu gomile i prati se da li se razvija neki gas i da li se taj gas pali. Ukoliko se zapali gas koji se tako razvio, ne nastavlja se sa ispitivanjem supstance, jer se ona smatra opasnom.

1.6.4. Korak 4

1.6.4.1. Aparatura

Aparatura se postavlja kao što je dato na Slici 1.

Slika 1. Aparatura

1.6.4.2. Uslovi ispitivanja
Pregledati posudu u kojoj se nalazi supstanca koja će se ispitivati i utvrditi da li sadrži materije u prahu veličine čestica < 500 μm. Ukoliko praškaste materije čine više od 1 % masenog od ukupne količine supstance ili ukoliko je uzorak trošan, prije ispitivanja čitavu supstancu treba sprašiti kako bi se prilikom pakovanja i rukovanja omogućilo smanjenje veličine čestica supstance. U suprotnom, supstanca se ispituje u obliku u kome je dobijena. Ispitivanje se izvodi na sobnoj temperaturi (oko 20 °C) i pri atmosferskom pritisku.

1.6.4.3. Postupak ispitivanja
U kapalicu se sipa 10 ml do 20 ml vode, a 10 g supstance stavi se u erlenmajer. Zapremina gasova koji se pri tom izdvajaju se izmjeri na bilo koji odgovarajući način. Slavina na kapalici otvori se tako da voda može da kaplje u erlenmajer i uključi se štoperica. Izdvajanje gasova provjerava se na svakih sat vremena tokom perioda od sedam sati. Ukoliko je brzina izdvajanja gasova promijenljiva, ili ukoliko se stalno povećava, nakon sedam sati mjerenja, mjerenje treba produžiti najviše do pet dana. Ispitivanje se može prekinuti u bilo kom trenutku mjerenja ako brzina razvijanja gasova preĐe 1 L/kg na sat. Ovo ispitivanje vrši se tri puta. Analizira se hemijski sastav gasa ukoliko je nepoznat. Kada gas sadrži veoma zapaljive sastojke, a nije poznato da li je čitava smješa veoma zapaljiva, treba napraviti smješu istog sastava i ispitati je u skladu sa metodom A.11. koja je data u ovom prilogu.

2. Podaci

Supstanca se smatra opasnom ukoliko:

- dolazi do spontanog paljenja u bilo kom koraku postupka ispitivanja;
- dolazi do izdvajanja zapaljivog gasa brzinom većom od 1 L/kg supstance na sat.

3. Izvještavanje

Izvještaj o ispitivanju sadrži:

- precizan opis supstance (identifikacija i sadržaj nečistoća);
- detalje o prethodnim pripremama supstance;
- rezultate ispitivanja (koraci 1, 2,3 i 4 dati u dijelu 1.6. ove metode);
- hemijski sastav izdvojenog gasa;

- brzinu izdvajanja gasa ukoliko je primijenjen korak 4 (dat u dijelu 1.6.4. ove metode);
- dodatne napomene važne za tumačenje rezultata.

A.13. SAMOZAPALJIVOST (ZA ČVRSTE I TEČNE SUPSTANCE I SMJEŠE)

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

Ispitivanje samozapaljivosti se primjenjuje na čvrste i tečne supstance koje se, u malim količinama, spontano pale ubrzo nakon kontakta sa vazduhom na sobnoj temperaturi (oko 20 °C). Ovom metodom se ne ispituju supstance koje, prije nego što se zapale, treba izlagati vazduhu satima ili danima na sobnoj ili povišenoj temperaturi. Smatra se da su supstance samozapaljive ukoliko se pale ili izazivaju ugljenisanje pri uslovima iz dijela 1.6. ove metode. Može se ukazati potreba za ispitivanjem samozapaljivosti tečnosti prema metodi A.15. Temperatura samozapaljenja (za tečnosti i gasove) datoj u ovom prilogu.

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance nisu date.

1.4. Princip metode

Supstanca se, bilo da je u čvrstom ili tečnom stanju, dodaje na inertni nosač i dovodi u kontakt sa vazduhom na sobnoj temperaturi u periodu od pet minuta. Ukoliko se tečna supstanca ne zapali, apsorbuje se u filter papir i izloži vazduhu na sobnoj temperaturi (oko 20 °C) u periodu od pet minuta. Ako se čvrsta ili tečna supstanca zapale, ili ako tečna supstanca zapali ili ugljeniše filter papir, supstanca se smatra samozapaljivom.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Ponovljivost: zbog značaja za bezbjednosti, jedan pozitivan rezultat je dovoljan da bi se supstanca smatrala samozapaljivom.

1.6. Opis metode

1.1.1. Aparatura

Porcelanska šolja prečnika oko 10 cm puni se dijatomejskom zemljom do visine od oko 5 mm na sobnoj temperaturi (oko 20 °C). [18]

Za ispitivanje tečnosti koristi se suvi filter papir koji se ne pali u kontaktu sa vazduhom kada doĐe u dodir sa inertnim nosačem.

1.1.2. Postupak ispitivanja

a) Praškaste čvrste supstance i smješe

[18] Dijatomejska zemlja ili bilo koja druga slična inertna supstanca koja je uobičajeno dostupna uzima se kao reprezentativni uzorak zemljišta na koji se ispitivana supstanca moţe sipati u slučaju akcidenta (nezgode).

Sipa se 1 cm^3 do 2 cm^3 supstance koju ispitujemo sa oko 1 cm visine na nezapaljivu površinu. Zatim se posmatra da li se supstanca pali tokom kapanja ili u roku od pet minuta stajanja. Ispitivanje se ponavlja šest puta, osim ako ne dođe do paljenja.

b) Tečnosti
Sipa se oko 5 cm^3 tečnosti koju ispitujemo u za to pripremljenu porculansku šolju. Zatim se posmatra da li se supstanca zapali u roku od pet minuta. Ukoliko u šest ispitivanja ne dođe do paljenja, vrši se sljedeće ispitivanje: špricem se nanese 0,5 ml uzorka za ispitivanje na udubljeni filter papir. Zatim se posmatra da li dolazi do paljenja ili ugljenisanja filter papira u roku od pet minuta od nanošenja tečnosti. Ispitivanje se ponavlja tri puta, osim ako ne dođe do paljenja ili ugljenisanja.

2. Podaci

2.1. Obrada rezultata

Ispitivanje se može prekinuti kad se uoče pozitivni rezultati kod bilo kog ispitivanja.

2.2. Procjena

Smatra se da je supstanca samozapaljiva ako se zapali u roku od pet minuta po dodavanju te supstance na nosač i nakon izlaganja vazduhu, ili ako tečnost ugljeniše ili zapali filter papir u roku od pet minuta od nanošenja na papir i izlaganja vazduhu.

3.Izvještavanje

Izvještaj sadrži:
- precizan opis supstance (identifikaciju i sadržaj nečistoća);
- rezultate ispitivanja;
- sve dodatne napomene važne za tumačenje rezultata.

A.14. EKSPLOZIVNOST

DIO I

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

Metoda ispitivanja eksplozivnosti opisuje postupak ispitivanja kojim se utvrđuje da li čvrsta supstanca ili supstanca u obliku paste predstavljaju potencijalno opasne supstance koje mogu lako da eksplodiraju kada se izlože plamenu (termička osjetljivost), udaru ili trenju (osjetljivost na mehanički stimulus), i da li tečna supstanca razvija eksplozivno dejstvo kada se izloži dejstvu plamena ili udaru.

Metoda se sastoji iz tri dijela:
1. ispitivanje termičke osjetljivosti;
2. ispitivanje mehaničke osjetljivosti u odnosu na udar;
3. ispitivanje mehaničke osjetljivosti u odnosu na trenje.

Dobijaju se podaci za procjenu vjerovatnoće izazivanja eksplozije supstance primjenom uobičajenih stimulusa. Metoda nije namijenjena za utvrĐivanje da li supstanca može da

eksplodira pod bilo kojim uslovima. Primjenom ove metode utvrđuje se da li supstanca ima eksplozivna svojstva (termička i mehanička osjetljivost) pod određenim uslovima. Zasniva se na primjeni više tipova aparatura za ispitivanje koje se najčešće koriste u svijetu i koje daju dobre rezultate. Koriste se i alternativne aparature pod uslovom da su prihvaćene na međunarodnom nivou i da se rezultati takvih ispitivanja mogu dovesti u vezu i porediti sa rezultatima dobijenim primjenom propisane aparature.

Ispitivanje se ne sprovodi kada dostupni podaci o termodinamičkim svojstvima (npr. toplota nastajanja, toplota razlaganja supstance) i/ili odsustvo određenih reaktivnih grupa[2] u strukturnoj formuli omogućavaju da se dovoljno pouzdano utvrdi da supstanca nema svojstva koja dovode do njenog brzog razlaganja uz izdvajanje gasova i oslobađanje toplote (tj. materijal ne predstavlja rizik od eksplozije). Kod tečnih supstanci se ne sprovoditi ispitivanje mehaničke osjetljivosti u odnosu na trenje.

Eksplozivi su supstance koje mogu da eksplodiraju pod dejstvom plamena ili supstance koje su osjetljive na udar ili trenje pri primjeni propisane aparature za ispitivanje (ili su osjetljivije na mehaničke udare od 1,3-dinitrobenzena ako se primjenjuju alternativne aparature za ispitivanje).

1.3. Referentne supstance

1,3-dinitrobenzen, tehnički kristalan proizvod prosijan kroz sito dimenzija 0,5 mm za potrebe ispitivanja reakcije na udar ili trenje.

Perhidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX, heksogen, ciklonit- CAS 121-82-4) prekristalisan iz vodenog rastvora cikloheksanona, koji je potom prosijan na vlažnom putu kroz sito veličine 250 µm i zadržan na situ veličine 150 µm, a potom osušen na temperaturi od 103 °C ± 2 °C (tokom 4 sata) radi sprovođenja druge serije ispitivanja osietljivosti na trenje i udar.

1.4. Princip metode

Preliminarna ispitivanja neophodna su da bi se utvrdili bezbjednosni uslovi za izvođenje tri ispitivanja osjetljivosti.

1.4.1. Ispitivanje bezbjednosti pri rukovanju supstancom[19]

Iz bezbjednosnih razloga, prije nego što se pristupi izvođenju osnovnog ispitivanja, male količine uzorka (oko 10 mg) ispitivane supstance zagrijevaju se na otvorenom, gasnim plamenikom, izlažu se udarcu - uz primjenu odgovarajuće aparature i trenju - uz upotrebu čekića i nakovnja ili drugog uređaja za ispitivanje trenja. Cilj ovog ispitivanja je da se utvrdi da li je supstanca toliko osjetljiva i eksplozivna da opisana ispitivanja, a prije svega ispitivanja njene termičke osjetljivosti, se sprovodi uz posebne mjere bezbjednosti kako lice koje sprovodi ispitivanja ne bi bilo povrijeđeno.

1.4.2. Termička osjetljivost

Metoda ispitivanja eksplozivnosti podrazumijeva zagrijavanje supstance u čeličnoj cijevi, zatvorenoj pomoću prigušnica sa različitim prečnikom otvora, kako bi se utvrdilo da li supstanca eksplodira pri intenzivnom zagrijavanju u zatvorenoj sredini.

[19] OECD, (2000) Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris

1.4.3. Mehanička osjetljivost (udar)

Prilokom ispitivanja eksplozivnosti supstanca se izlaže udaru koji izaziva određena masa koja se ispusti na supstancu sa određene visine.

1.4.4. Mehanička osjetljivost (trenje)

Čvrsta supstanca ili supstanca u obliku paste izlaže se trenju između standardnih površina pod određenim uslovima opterećenja i relativnog kretanja.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta nisu dati.

1.6. Opis metode

1.1.1. Termička osjetljivost (uticaj plamena)

1.1.1.1. Aparatura

Aparatura se sastoji od čelične cijevi za jednokratnu upotrebu i višenamjenskih zapušača (Slika 1.), koji se postavljaju u sigurnosni uređaj za zagrijavanje. Svaka cijev izrađuje se oblikovanjem pod presom od čeličnog lima (dio II ove metode) i ima unutrašnji prečnik 24 mm, dužinu 75 mm i debljinu zidova 0,5 mm. Cijevi se na otvorenom kraju obrađuju tako da se mogu zatvoriti prigušnicom. Prigušnica je otporna na pritisak, ima centralni otvor, i pričvršćuje se za cijev dvodelnim vijkom (sa navojem i maticom). Navoji vijka su izrađeni od visoko legiranog čelika sa hromom i manganom (dio II ove metode) koji je otporan na visoke temperature koje mogu ići i do 800 °C. Prigušnice su debljine 6 mm, načinjene od čelika otpornog na toplotu (dio II ove metode), različitih veličina otvora.

1.1.1.2. Uslovi ispitivanja

Supstanca se ispituje u stanju u kome je dobijena. Izuzetno, npr. ukoliko je supstanca presovana, izlivena ili na drugi način komprimovana, najprije se zdrobi, a potom ispita.

Kod supstanci u čvrstom stanju, masa materijala koji se ispituje određuje se suvim postupkom u dvije faze. Tarirana cijev napuni se sa 9 cm^3 supstance i sabije uz primjenu sile od 80 N na poprečni presjek cijevi. Iz bezbjednosnih razloga ili u slučajevima kada fizički oblik uzorka može biti izmjenjen zbog kompresije koristi se neki drugi način punjenja, npr. ako je supstanca veoma osjetljiva na trenje onda se ne primjenjuje metod sabijanja. Ukoliko je materijal kompresibilan dodaje se još materijala sve dok se ne dođe do granice od 55 mm ispod vrha cijevi. Zatim se odredi ukupna masa supstance koja je potrebna da se dođe do ove granice od 55 mm ispod vrha cijevi i dodaju se još dve količine, pri čemu se svaki put za sabijanje koristi sila od 80 N. Zatim se ili doda još materijala ili se on vadi tako da ostane količina u visini od 15 mm u odnosu na vrh cijevi. Izvrši se druga provjera na suvo uz upotrebu količine koja odgovara trećini sabijene mase korišćene kod prve suve probe. Još dva puta se dodaje supstanca i to ona koja je prethodno izvađena. Svaki put za sabijanje koristi se sila od 80 N, sve dok nivo supstance ne dođe do visine od 15 mm ispod vrha cijevi. Količina čvrste supstance izmjerena prilikom druge suve probe koristi se pri svakom daljem ispitivanju. Punjenje se vrši u tri jednake količine, od kojih se svaka kompresuje do 9 cm^3 uz upotrebu odgovarajuće sile. (Postupak se olakšava upotrebom prstena za pravljenje proreda.)

Tečnosti i gelovi sipaju se u cijev do visine od 60 mm, vodeći računa da se kod gelova ne ssupstancaaju šupljine. Navojna obujmica se navuče na cijev odozdo i ubacuje se odgovarajuća prigušnica. Navoj se zateže nakon što se nanese određena količina lubrikanta na bazi molibdendisulfida. Provjeri se da nema supstance između prirubnice i ploče ili na navojima. Zagrijevanje se vrši propanom iz industrijskih boca koje imaju regulator pritiska (60 mbar do 70 mbar) koji omogućava njegovu ravnomernu distribuciju (na šta upućuje vizuelna provjera plamena u gorionicima) cijevovodima do četiri gorionika. Gorionici se raspoređuju oko komore za ispitivanje kao što je dato na Slici 1. Četiri gorionika imaju kombinovanu potrošnju od oko 3,2l propana u minuti. Koriste se i druga gasovita goriva i drugačiji gorionici, ali brzina zagrijavanja je u skladu sa brzinom datom na Slici 3. Kod svih tipova aparatura povremeno se vrši provjera brzine zagrijavanja uz pomoć cijevi koje su napunjene dibutil-ftalatom kao što je dato na Slici 3.

1.1.1.3. Postupak ispitivanja

Ispitivanja se izvode ili dok se cijev ne raspadne ili tako što se cijev zagrijeva pet minuta. Kada se pri ispitivanju cijev raspadne na tri ili više djelova, koji mogu biti međusobno jedinjenjeeni uskim trakama metala kao što je dato na Slici 2, smatra se da je došlo do eksplozije. Ako se prilikom ispitivanja cijev raspala na manji broj djelova ili se nije raspala, nije došlo do eksplozije. Prvo se sprovodi serija od tri ispitivanja sa prečnikom otvora prigušnice od 6,0 mm. Ukoliko ne dođe do eksplozije, vrši se druga serija od tri ispitivanja sa prečnikom otvora prigušnice od 2,0 mm. Ukoliko pri bilo kojoj od ovih serija ispitivanja dođe do eksplozije ne vrše se dalja ispitivanja.

1.1.1.4. Procjena

Smatra se da je ispitivanje dalo pozitivne rezultate kada pri bilo kojoj od navedenih serija ispitivanja dođe do eksplozije.

1.1.2. Mehanička osjetljivost (udar)

1.1.2.1. Aparatura

Izgled aparature dat je na slici 4, osnovni djelovi tipične aparature sa padajućim čekićem su: klada od livenog čelika sa postoljem, nakovanj, kolona, vođice, tegovi, sprava za otpuštanje i držač uzorka. Čelični nakovanj dimenzija: 100 mm (prečnik) x 70 mm (visina) zašrafi se na gornju površinu čeličnog bloka dimenzija: 230 mm (dužina) x 250 mm (širina) x 200 mm (visina) sa livenim postoljem dimenzija: 450 mm (dužina) x 450 mm (širina) x 60 mm (visina). Kolona, sačinjena od bešavne čelične cijevi, pričvršćuje se za nosač koji je zašrafljen za zadnji deo čeličnog bloka. Četiri šrafa pričvršćuju opremu za čvrst betonski blok 60 cm x 60 cm x 60 cm tako da su šine vođica u vertikalnom položaju i da tegovi padaju slobodno. Koriste se tegovi od 5 kg i 10 kg, napravljeni od čvrstog čelika. Udarni dio tega napravljen je od ojačanog čelika, HRC 60 do 63 i ima minimalni prečnik 25 mm. Uzorak koji se ispituje zasupstancaa se u uređaj za ispitivanje osjetljivosti na udar koji se sastoji od dva koaksijalna cilindra napravljena od čvrstog čelika. Cilindri su postavljeni jedan iznad drugog i smiještaju se u šuplji cilindrični prsten od čelika. Cilindri od čvrstog čelika su prečnika 10 mm (-0,003 mm, -0,005 mm) i visine 10 mm, ipolirane površine, zaobljenih ivica (radijus zakrivljenosti 0,5 mm) i tvrdoće HRC 58 do 65. Šuplji cilindar ima poljašnji prečnik 16 mm, ipoliranu unutrašnjost prečnika 10 mm (+0,005 mm, + 0,010 mm) i visinu 13 mm. Uređaj za ispitivanje osjetljivosti na udar postavlja se na nakovanj (prečnika 26 mm i visine 26 mm) koji je napravljen od čelika i centrira se pomoću prstena sa perforacijama koje omogućavaju ispuštanje para.

1.1.2.2. Uslovi ispitivanja

Zapremina uzorka je 40 mm ili odgovara alternativnoj opremi koja se koristi. Čvrste supstance ispituju se u suvom stanju i pripremaju na sljedeći način:

1) praškaste supstance siju se kroz sito (veličina sita 0,5 mm); sve što prođe kroz sito koristi se za ispitivanje;
2) presovane, izlivene ili na drugi način komprimovane supstance sitne se u sitnije komade koji se prosiju. Prosijani komadi prečnika između 0,5 mm i 1 mm koriste se pri ispitivanju i smatraju se uzorcima originalne supstance.

Supstance koje se isporučuju u obliku paste ispituju se u suvom stanju, ili nakon uklanjanja što je moguće veće količine razređivača. Supstance koje se nalaze u tečnom stanju ispituju se tako što se ostavi razmak od 1 mm između gornjeg i donjeg cilindra.

1.1.2.3. Postupak ispitivanja

Vrši se serija od 6 ispitivanja uz bacanje tega mase od 10 kg sa visine od 0,40 m (40 J). Ukoliko pri seriji ispitivanja od 40 J dođe do eksplozije, sprovodi se još jedna serija od 6 ispitivanja u kojoj se koriste tegovi mase od 5 kg koji se bacaju sa visine od 0,15 m (7,5 J). Kod drugačije aparature uzorak se poredi sa odabranom referentnom supstancom po ustanovljenoj proceduri (npr. goredolje tehnika itd.).

1.1.2.4. Procjena

Rezultati ispitivanja smatraju se pozitivnim kada dođe do eksplozije (eksplozija sa vatrom i/ili stanje ekvivalentno eksploziji) najmanje kod jednog ispitivanja sa opisanim uređajem za ispitivanje osjetljivosti na udar ili ako je uzorak osjetljiviji od 1,3-dinitrobenzola ili RDX kod alternativnog ispitivanja osjetljivosti na udar.

1.1.3. Mehanička osjetljivost (trenje)

1.1.3.1. Aparatura

Aparatura za ispitivanje osjetljivosti na trenje data je na Slici 5 i sastoji se od osnovne ploče od livenog čelika na koju se postavlja aparatura za ispitivanje osjetljivosti na trenje. Aparatura se sastoji od fiksiranog porcelanskog klina i pokretne porcelanske ploče. Porcelanska ploča se nalazi na klizaču koji se pokreće pomoću dvije vođice. Klizač je povezan sa elektromotorom pomoću jedinjenjenice, ekscentra i odgovarajućeg prenosnog mehanizma koji omogućava da se porcelanska ploča pokrene, samo jedanput: naprijed i nazad ispod porcelanskog klina u dužini od 10 mm. Porcelanski klin može da izdrži opterećenje od 120 N do 360 N. Ravne porcelanske ploče izrađuju se od bijelog tehničkog porcelana (hrapavost 9 μm do 32 μm) i imaju dimenzije: 25 mm (dužina) x 25 mm (širina) x 5 mm (visina). Cilindrični porcelanski klin takođe se izrađuje od bijelog tehničkog porcelana i ima dužinu 15 mm, prečnik 10 mm i neravne sferne krajeve sa poluprečnikom zakrivljenosti od 10 mm.

1.1.3.2. Uslovi ispitivanja

Zapremina uzorka je 10 mm^3 ili odgovara alternativnoj aparaturi koja se koristi. Čvrste supstance ispituju se u suvom stanju i pripremaju na sljedeći način:

1) praškaste suptance siju se kroz sito (veličina sita 0,5 mm); sve što prođe kroz sito koristi se za ispitivanje;
2) presovane, izlivene ili na drugi način komprimovane supstance usitne se na sitnije komade koji se prosiju. Prosijani komadi prečnika < 0,5 mm koriste se pri ispitivanju.

Supstance koje se isporučuju u obliku paste ispituju se u suvom stanju. Ukoliko se supstanca ne može dovesti u suvo stanje, pasta (nakon uklanjanja što veće količine rastvarača) se ispituje u filmu debljine 0,5 mm, širine 2 mm i dužine 10 mm. Film se pravi pomoću šablona.

1.1.3.3. Postupak ispitivanja

Porcelanski klin dovede se u poziciju iznad uzorka i optereti se. Kada se sprovodi ispitivanje, markeri naneti sunĐerom na porcelanskoj osnovi stoje u transverzalnom položaju u odnosu na pravac kretanja.

Klin je na uzorku, dovoljna količina ispitivanog materijala nalazi ispod klina i podloga se pravilno pokreće ispod klina. Kod supstanci u vidu paste koristi se šablon debljine 0,5 mm sa otvorom dimenzija 2 mm x 10 mm da bi se supstanca nanela na podlogu. Porcelanska podloga se kreće 10 mm napred-nazad ispod porcelanskog klina u samo jednom. Dva kraja klina koriste se u dva ispitivanja, a dvije površine podloge koriste se za ukupno tri ispitivanja. Serija od šest ispitivanja vrši se sa opterećenjem od 360 N. Ukoliko se tokom ispitivanja dobiju pozitivni rezultati sprovodi se još jedna serija od 6 ispitivanja sa opterećenjem od 120 N. Kada se koriste drugi tipovi aparatura, uzorak se poredi sa izabranom referentnom supstancom uz primjenu utvrĐene procedure (npr. gore-dolje tehnika i sl.).

1.1.3.4. Procjena

Rezultati ispitivanja smatraju se pozitivnim ukoliko doĐe do eksplozije (praska i/ili praska uz razvoj plamena koji se smatra ekvivalentnim eksploziji) najmanje jedanput tokom bilo kog ispitivanja sa propisanom aparaturom za ispitivanje osjetljivosti na trenje ili ukoliko zadovoljava ekvivalentne kriterijume koji se odnose na alternativno ispitivanje osjetljivosti na trenje.

2. Podaci

Supstanca ima potencijalnu opasnost od eksplozije ukoliko su dobijeni pozitivni rezultati u ispitivanju termičke osjetljivosti, osjetljivosti na udar ili trenje.

3. Izvještavanje

3.1. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:

- identitetu, sastavu, stepenu čistoće, sadržaju vlage itd. ispitivane supstance;
- fizičkom obliku uzorka i da li je uzorak mrvljen, lomljen i/ili prosijavan;
- zapažanjima tokom ispitivanja termičke osjetljivosti (npr. masa uzorka, broj fragmenata u koje se rasprsao uzorak itd.);
- zapažanjima tokom ispitivanja osjetljivosti na udar ili trenje (npr. formiranje određene veće količine dima ili potpuno razlaganje bez praska, plamena, varnice, pucketanja i sl.);

- rezultatima svih tipova ispitivanja;

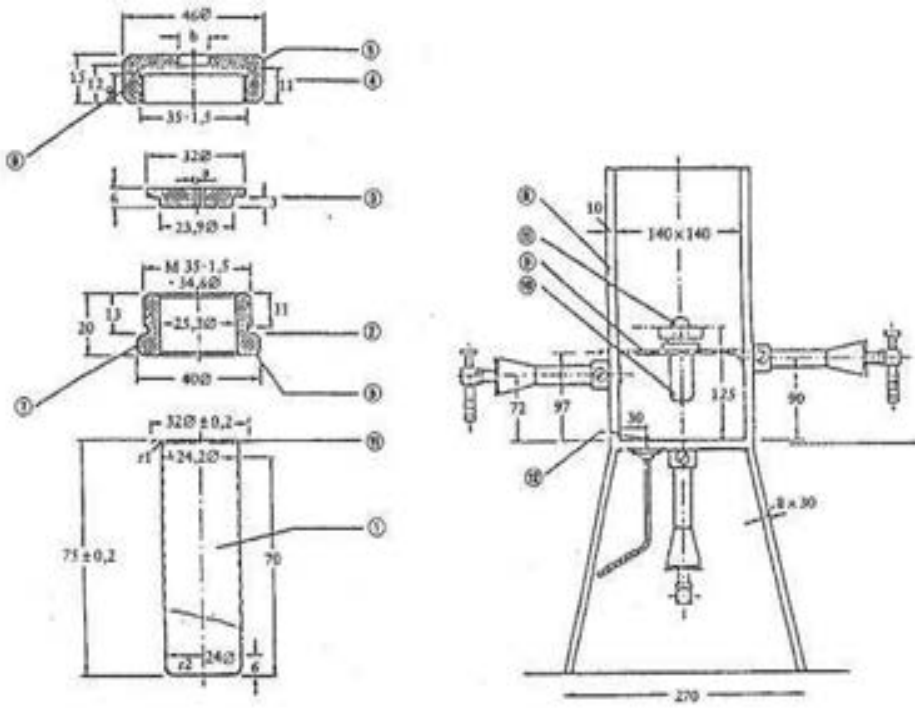
- ukoliko je korišćena alternativna aparatura, naučna opravdanja kao i dokaz o odnosu rezultata dobijenih primjenom propisane aparature i onih dobijenih uz primjenu ekvivalentne aparature;
- svim komentarima koji mogu biti od koristi za pravilno tumačenje rezultata kao što je referisanje na ispitivanje sličnih proizvoda;
- svim dodatnim primjedbama relevantnim za pravilno tumačenje rezultata.

3.2. Tumačenje i procjena rezultata

U izvještaju o sprovedenim ispitivanjima navode se i rezultati koji se mogu smatrati lažnim, nepravilnim ili nereprezentativnim. Ukoliko se neki rezultati odbacuju, daje se odgovarajuće objašnjenje i rezultati alternativnih ili dodatnih testova. Ukoliko su neki nepravilni rezultat neobjašnjivi on se prihvata kao nominalna vrijednost i supstanca se na osnovu njega adekvatno svrstava.

PRIMJER SPECIFIKACIJE MATERIJALA ZA ISPITIVANJE TERMIČKE OSJETLJIVOSTI DIO II

1) Cijev: Specifikacija materijala br. 1.0336.505 g
2) Prigušnica: Specifikacija materijala br. 1.4873 3) Navojnice: Specifikacija materijala br. 1.3817.

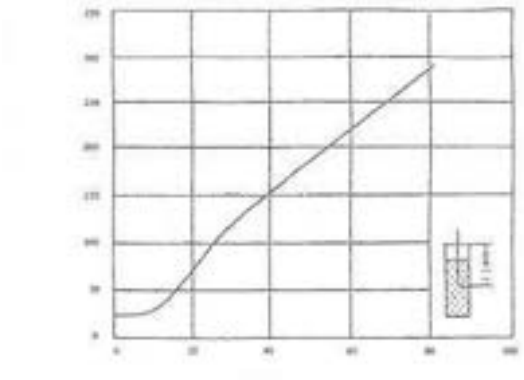


Slika 1. Aparatura za ispitivanje termičke osjetljivosti (sve dimenzije date su u milimetrima)

1. cijev; 2. navojna obujmica. 3. prigušnica; 4.matica b=10mm; 5. površina sa žljebovima; 6. dvije ravne površine za ključ 41; 7. dvije ravne površine za ključ 36; 8. kućište otporno na

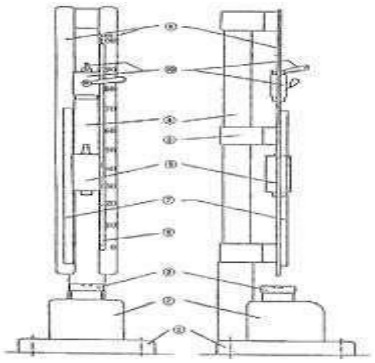
rasprskivanje; 9. dvije potporne šipke za v+cijev sa uzorkom; 10.Montirana cijev sa uzorkom; 11. položaj zadnjeg plamenika (ostali plamenici se ne vide); 12. mlaznica

Slika 2. Ispitivanje termičke osjetljivosti
(primjer fragmentacije)

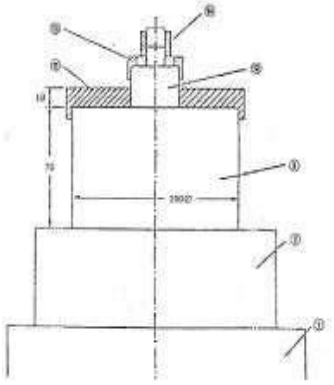


Slika 3. Kalibracija brzine zagrijevanja za ispitivanje termičke osjetljivosti

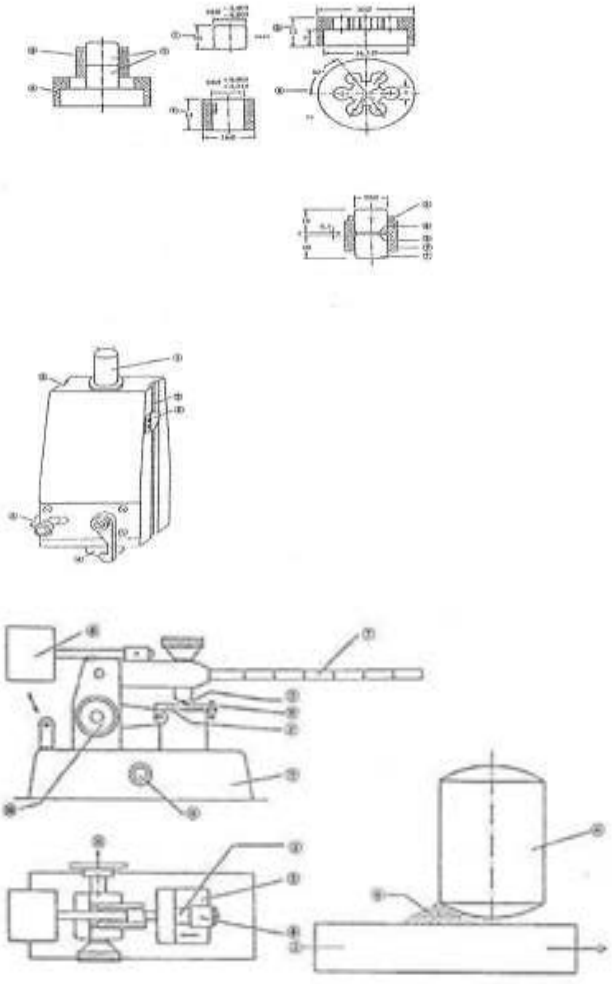
Kriva temperatura/vrijeme dobijena zagrijavanjem dibutil ftalata (27 cm^3) u zatvorenoj cijevi (1,5 mm prigušnica) uz protok propana od 3,2 litra/minut. Temperatura se mjeri uz pomoć termopara hromel (legura hrom-nikal 9:1)/alumel (legura Ni : Al : Mn : Si 95 : 2 : 2 : 1) obloženog nerĐajućim čelikom, koji se postavlja 43 mm ispod ivice cijevi. Brzina zagrijavanja između 135 °C i 285 °C je između 185 K/minut i 215 K/minut



Slika 4. Aparatura za ispitivanje osjetljivosti na udar
(sve dimenzije su u milimetrima*)*



Slika 4a. Padajući malj, prednja i bočna strana 1. Postolje 450 x 450 x 60; 2. Čelični blok 230 x 230 x 200; 3. Nakovanj ø 100 x 70; 4. Kolona; 5. Srednji poprečni nosač; 6. VoĐice; 7. Nazubljeni nosač; 8. Graduisana vaga; 9. Padajući malj; 10. Element za držanje i otpuštanje; 11. Ploča za postavljanje u položaj; 12. MeĐunakovanj (zamenjivi) ø 26 x 26; 13. Prsten sa otvorima; 14. Uređaj za udar.



Slika 5. Uređaj za ispitivanje osjetljivosti na trenje – 1. Čelično postolje 2. Pokretna voĐica 3. Porcelanska ploča (koju drži voĐica) 25 mm x 25 mm x 5 mm 4. Fiksni porcelanski klin ø 10 mm x 15 mm 5. Uzorak koji se ispituje 10 mm^3 6. Držač klina 7. Ručka za punjenje 8. Protivteg 9. Sklopka 10. Kolo za postavljanje voĐice u početni položaj 11. Pravac prema elektromotornom pogonu:

A.15. TEMPERATURA SAMOZAPALJENJA (ZA TEČNOSTI I GASOVE)

1. Metoda ispitivanja

Ekvivalentna međunarodna ispitna metoda ili druge primjenjive ispitne metode za predmetnu krajnju tačku navedene su u tabeli 1 dijela 0.

1.1. Uvod

Metodom ispitivanja temperature samozapaljenja ne ispituju se eksplozivne supstance i supstance koje se spontano pale u kontaktu sa vazduhom na sobnoj temperaturi. Ispitivanje se primjenjuje na gasove, tečnosti i isparenja koji u prisustvu vazduha mogu biti zapaljeni vrelom površinom. Temperaturu samozapaljenja značajno snižavaju prisutne katalitičke nečistoće, površina materijala ili veća zapremina posude za ispitivanje.

Stepen samozapaljivosti izražava se u vidu temperature samozapaljenja. Temperatura samozapaljenja je najniža temperatura pri kojoj se ispitivana supstanca zapali kada se pomiješa sa vazduhom u uslovima definisanim u ovoj metodi ispitivanja.

1.2. Referentne supstance

Referentne supstance date su u standardima (dio 1.6.3. ove metode) i služe za povremenu provjeru metode i omogućavaju poređenje sa rezultatima drugih metoda.

1.3. Princip metode

Metodom ispitivanja temperature samozapaljenja određuje se minimalna temperatura unutrašnje površine kućišta koja dovodi do paljenja gasa, isparenja ili tečnosti ubrizganih u kućište.

1.4. Kriterijumi kvaliteta

Ponovljivost se mijenja u zavisnosti od opsega temperatura samozapaljenja i korišćene metode ispitivanja. Osjetljivost i specifičnost zavise od korišćene metode ispitivanja.

1.5. Opis metode

1.5.1. Aparatura

Aparatura je opisana u metodama datim u dijelu 1.6.3. ove metode.

1.5.2. Uslovi ispitivanja

Uzorak ispitivane supstance ispituje se u skladu sa metodama datim u dijelu 1.6.3. ove metode.

1.5.3. Postupak ispitivanja

Postupak ispitivanja dat je u standardu MEST EN 60079-20-1, Eksplozivne atmosfere - Dio 20-1: Klasifikacija materijalnih karakteristika gasova i para - Metode ispitivanja i podaci.

2. Podaci

Bilježi se temperatura ispitivanja, atmosferski pritisak, količina korišćenog uzorka i vrijeme do pojave paljenja.

3. Izvještavanje

Izvještaj o ispitivanju sadrži:

- precizan opis supstance (identifikaciju i nečistoće);
- količinu korišćenog uzorka i atmosferski pritisak;
- korišćenu aparaturu;
-rezultate mjerenja (temperature ispitivanja, rezultate koji se odnose na paljenje, odgovarajuće vrijeme do pojave paljenja);
- sve dodatne napomene relevantne za tumačenje rezultata.

A.16. RELATIVNA TEMPERATURA SAMOZAPALJENJA (ZA ČVRSTE SUPSTANCE)

1. Metoda ispitivanja

Ekvivalentna međunarodna ispitna metoda ili druge primjenjive ispitne metode za predmetnu krajnju tačku navedene su u tabeli dijela 0.

1.1. Uvod

Metodom ispitivanja relativne temperature samozapaljenja ne ispituju se eksplozivne supstance i supstance koje se spontano pale u kontaktu sa vazduhom na sobnoj temperaturi. Svrha ispitivanja je dobijanje preliminarnih podataka o samozapaljivosti čvrstih supstanci na povišenim temperaturama.

Ukoliko se toplota koja se oslobaĐa u reakciji supstance sa kiseonikom ili pri egzotermnom razlaganju ne odaje dovoljno brzo u okolinu, dolazi do njenog samozagrijavanja koje dovodi do samozapaljenja. Samozapaljenje se javlja kada je brzina oslobaĐanja toplote veća od brzine odavanja toplote. Ovaj postupak ispitivanja koristan je za preliminarno skrining ispitivanje čvrstih supstanci. S obzirom na složenu prirodu paljenja i sagorijevanja čvrstih supstanci, temperatura samozapaljenja određena ovom metodom koristiti se za potrebe poreĐenja.

1.2. Definicije i mjerne jedinice

Temperatura samozapaljenja određena ovom metodom predstavlja minimalnu temperaturu okoline izraženu u stepenima Celzijusa (°C) pri kojoj se određena zapremina supstance zapali pod definisanim uslovima.

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance nisu date.

1.4. Princip metode

Određena zapremina supstance koja se ispituje stavlja se u peć na sobnoj temperaturi. Bilježi se kriva odnosa vremena i temperature u centru uzorka dok se temperatura u peći podiže do 400 °C ili do tačke topljenja ukoliko je niža od pomenute, brzinom 0,5 °C/min. Za potrebe ovog ispitivanja, temperatura samozapaljenja je temperatura peći pri kojoj temperatura uzorka dostiže 400 °C samozagrijavanjem.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta nisu dati.

1.6. Opis metode

1.6.1. Aparatura

1.6.1.1. Peć

Laboratorijaska peć sa mogućnošću programiranja temperature (zapremine oko 2 litra), sa prirodnom cirkulacijom vazduha i ispustom za slučaj eksplozije. Radi izbjegavanja potencijalnog rizika od eksplozije, ne smije se dozvoliti da gasovi nastali razlaganjem doĐu u dodir sa električnim elementima za grijanje.

1.6.1.2. Kocka od žičane mreže

Parče žičane mreže od nerĐajućeg čelika sa otvorima od 0,045 mm iseći prema šablonu datom na Slici 1. Mrežu ispresavijati i osigurati žicom u obliku kocke sa otvorom na vrhu.

1.6.1.3. Termoelementi

Odgovarajući termopar.

1.6.1.4. Zapisivanje rezultata

Bilo koji dvokanalni sistem za zapisivanje kalibrisan od 0 °C do 600 °C ili na odgovarajući napon.

1.6.2. Uslovi ispitivanja

Supstance se ispituju u obliku u kome su primljene.

1.6.3. Postupak ispitivanja

Kocka se puni supstancom koja se ispituje. Supstanca se blago sabija i dodaje dok se kocka potpuno ne popuni. Zatim se kocka okači u centar peći na sobnoj temperaturi. Jedan termoelement postavlja se u centar kocke, a drugi između kocke i zida peći da mjeri temperaturu u peći. Temperature peći i uzorka neprekidno se bilježe dok se temperatura u peći povećava do 400 °C ili do tačke topljenja ukoliko je niža, brzinom 0,5 °C/min. Kada doĐe do paljenja supstance, termoelement koji se nalazi u uzorku pokazuje veoma oštar porast temperature u odnosu na temperaturu u peći.

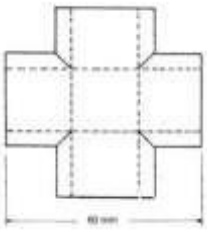
2. Podaci

Temperatura peći pri kojoj temperatura uzorka dostiže 400°C samozagrijavanjem je temperatura relevantna za procjenu (Slika 2).

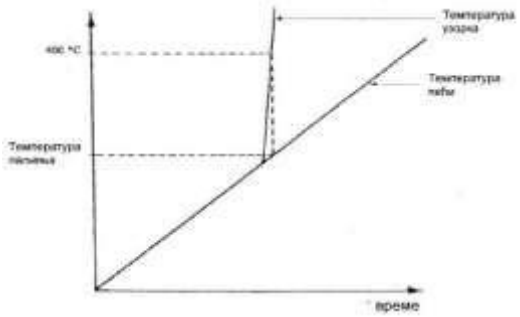
3. Izvještavanje

Izvještaj o ispitivanju, ukoliko je moguće, sadrži:

- opis supstance koja se ispituje;
- rezultate mjerenja uključujući i krivu temperatura/vrijeme; - sve dodatne napomene važne za tumačenje rezultata.



Slika 1. Shema kocke (20 mm) za ispitivanje



Slika 2. Kriva temperatura – vrijeme

A.17. OKSIDUJUĆA SVOJSTVA (ZA ČVRSTE SUPSTANCE)

1. Metoda ispitivanja

Ekvivalentna međunarodna ispitna metoda ili druge primjenjive ispitne metode za predmetnu krajnju tačku navedene su u Tabeli 1 dijela 0.

1.1. Uvod

Za metodu ispitivanja oksidujućih svojstava potrebni su podaci o potencijalnim eksplozivnim svojstvima supstance. Ova metoda se ne primjenjuje na tečnosti, gasove, eksplozivne ili lako zapaljive supstance i organske perokside. Ovo ispitivanje se ne sprovodi kada se na osnovu strukturne formule dovoljno pouzdano može utvrditi da supstanca ne može da razvije egzotermnu reakciju u kontaktu sa zapaljivim materijalom. Potrebno je izvršiti preliminarna ispitivanja radi provjere da li ispitivanje treba vršiti pod posebnim uslovima.

1.2. Definicije i merne jedinice

Vrijeme gorenja je vrijeme reakcije, izraženo u sekundama, potrebno da se zona reakcije proširi kroz supstancu prema postupku opisanom u dijelu 1.6. ove metode. Brzina gorenja izražava se u milimetrima po sekundi. Maksimalna brzina gorenja je najviša vrijednost brzine

gorenja dobijena ispitivanjem smješa koje sadrže 10 % do 90 % (masenih) oksidujućeg sredstva.

1.3. Referentna supstanca

Barijum-nitrat (analitičke čistoće) koristi se kao referentna supstanca pri ispitivanju i pri preliminarnom ispitivanju. Referentna smješa je smješa barijum-nitrata sa sprašenom celulozom (obično smješa sa 60 % (masenih) barijum-nitrata), pripremljena prema uputstvima iz dijela 1.6. ove metode, koja ima maksimalnu brzinu gorenja.

1.4. Principi metode

Preliminarno ispitivanje vrši se iz bezbednosnih razloga. Kada preliminarno ispitivanje jasno pokaže da ispitivana supstanca ima oksidujuća svojstva nema potrebe za daljim ispitivanjima. U suprotnom vrši se potpuni postupak ispitivanja supstance.

Kod potpunog ispitivanja, supstanca koja se ispituje i definisana zapaljiva supstanca miješaju se u različitim odnosima. Svaka tako napravljena smješa zatim se oblikuje u gomilu. Gomila se na jednom kraju zapali. Određena maksimalna brzina gorenja zatim se upoređuje sa maksimalnom brzinom gorenja referentne smješe.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Primjenjuje se bilo koja metoda usitnjavanja i miješanja, pod uslovom da se maksimalna brzina gorenja u šest odvojenih ispitivanja razlikuje od aritmetičke srednje vrijednosti za najviše 10 %. **1.6. Opis metode**

1.6.1. Priprema

1.6.1.1. Ispitivana supstanca

Uzorak za ispitivanje usitniti do čestica veličine <0,125 mm na sljedeći način: prosijati ispitivanu supstancu, dio koji se zadržao na situ samljeti, pa ponoviti ovaj postupak tako da sva količina uzorka prođe kroz sito. Koristi se bilo koja metoda mljevenja i prosijavanja koja zadovoljava kriterijume kvaliteta. Prije nego što se pripremi smješa, supstanca se suši na 105 °C, do postizanja konstantne mase. Ukoliko je temperatura razlaganja supstance niža od 105 °C, ona se suši na odgovarajućoj nižoj temperaturi.

1.6.1.2. Zapaljiva supstanca

Kao zapaljiva supstanca koristi se celuloza u prahu. U ovim ispitivanjima koristi se tip celuloze koja se koristi u hromatografiji na tankom sloju ili u kolonskoj hromatografiji. Kao najpodesnija pokazala se celuloza kod koje 85 % vlakana ima dužinu između 0,020 mm i 0,075 mm. Celulozni prah pušta se kroz sito sa otvorima veličine 0,125 mm. Ista serija celuloze koristi se sve vrijeme ispitivanja. Prije nego što se pripremi smješa, celulozni prah se suši na temperaturi od 105 °C do postizanja konstantne mase. Ukoliko se pri preliminarnom ispitivanju koristi drveno brašno, priprema se brašno od mekog drveta na taj način što se sakupi dio koji prolazi kroz sito otvora veličine 1,6 mm, promiješa, zatim suši na temperaturi od 105 °C četiri sata u sloju debljine manje od 25 mm. Brašno se ohladi i čuva u hermetički zatvorenoj posudi, napunjenoj količinom potrebnom za ispitivanje, ako je moguće u roku od 24 sata od sušenja. 1.6.3.1. Inicijator paljenja Kao inicijator paljenja koristi se

vreo plamen iz gasnog gorionika (minimalnog prečnika 5 mm). Ukoliko se koristi drugi inicijator paljenja (npr. kada se ispitivanje vrši u inertnoj atmosferi), u izvještaju se opisuje izvor i objašnjava zbog čega se koristi.

1.6.2. Postupak ispitivanja

Smješe oksidujućih sredstava sa celulozom ili drvenim brašnom smatraju se potencijalno eksplozivnim materijama i njima se pažljivo rukuje.

1.6.2.1. Preliminarno ispitivanje

Osušena supstanca izmiješa se sa osušenom celulozom ili drvenim brašnom u odnosu dva težinska dijela ispitivane supstance prema jednom težinskom dijelu celuloze ili drvenog brašna. Smješa se oblikuje u malu gomilu kupastog oblika dimenzija 3,5 cm (prečnik osnove) x 2,5 cm (visina) tako što se ispuni posuda u obliku kupe, bez sabijanja (npr. laboratorijaski stakleni lijevak čija je cijev zapušena). Gomila se postavlja na hladno, nezapaljivo, neporozno ravno postolje koje slabo sprovodi toplotu. Ispitivanje se izvodi u digestoru kao što je opisano u dijelu 1.6.2.2. ove metode. Inicijator paljenja dovodi se u kontakt sa kupom. Prate se i biljže intenzitet i trajanje reakcije. Ako je reakcija burna supstanca se smatra oksidujućom. U slučaju dobijanja sumnjivih rezultat i izvršiti cijlu seriju ispitivanja.

1.6.2.2. Serija ispitivanja

Pripremiti smješe celuloze sa oksidujućom supstancom. Smješe sadrže od 10 do 90 masenih procenata oksidujuće supstance sa korakom povećanja 10 %. U graničnim slučajevima koriste se srednje smješe oksidujuće supstance sa celulozom kako bi se preciznije dobila maksimalna brzina gorenja. Gomila se pravi uz pomoć kalupa. Kalup je sačinjen od metala, dužine 250 mm, sa trouglastim poprečnim presjekom, unutrašnje visine 10 mm, a širine 20 mm. Sa obije strane kalupa, uzdužno, postavljaju se dva metalna graničnika koji prelaze 2 mm iznad gornje ivice trouglastog poprečnog presjeka (Slika). Ova posuda se napuni sa većom količinom smješe. Nakon što se kalup baci sa visine od 2 cm na čvrstu podlogu, preostali višak supstance ukloni se pomoću koso postavljene ploče. Bočni graničnici se uklone, a ostatak praškaste materije poravna se pomoću valjka. Nezapaljivo, neporozno postolje koja slabo sprovodi toplotu zatim se postavlja na vrh kalupa, cijela aparatura se obrne, a kalup se ukloni. Ovako formirana gomila stavlja se u digestor. Brzina vazduha je dovoljna da se izbjegne širenje dima po laboratorijai i ne mijenja seu toku ispitivanja. Oko aparature podići zaštitu od promaje. S obzirom da su celuloza, kao i neke supstance koje se ispituju higroskopne, ispitivanje vršiti što je brže moguće. Zapaliti jedan dio gomile uz pomoć plamena. Mjeriti vrijeme trajanja reakcije na dužini od 200 mm, nakon što se zona reakcije proširi 30 mm od inicijalne tačke. Ispitivanje se vrši sa referentnom supstancom i najmanje po jednom sa svakom od smješa ispitivane supstance sa celulozom. Ukoliko je maksimalna brzina gorenja znatno veća od brzine gorenja referentne smješe, ispitivanje se može obustaviti. U suprotnom, ispitivanje ponoviti pet puta sa svakom od tri smješe koje imaju najveće brzine gorenja. Ukoliko se posumnja u vjerodostojnost pozitivnog rezultata, ispitivanje ponoviti sa inertnom supstancom sa sličnom veličinom čestica, kao što je dijatomejska zemlja, umjesto celuloze. Druga mogućnost je ispitivanje smješe koja sadrži celulozu i koja ima najveću brzinu gorenja, u inertnoj atmosferi (sadržaj kiseonika < 2 % v/v).

2. Podaci

Iz bezbjednosnih razloga karakterističnim oksidujućim svojstvom ispitivane supstance smatra se maksimalna brzina gorenja. Vrijednost relevantna za procjenu je najveća dobijena vrijednost brzine gorenja od šest ispitivanja određene smješe. Nacrtati grafik zavisnosti najveće vrijednosti brzine gorenja od koncentracije oksidujuće supstance. Maksimalna brzina gorenja očitava se sa grafika. Šest izmjerenih vrijednosti brzine gorenja koje se odnose na smješu sa najvećom brzinom gorenja ne smiju da se razlikuju od aritmetičke srednje vrijednosti za više od 10 %. U suprotnom, poboljšati metode usitnjavanja i miješanja supstance. Uporediti maksimalne brzine gorenja ispitivane i referentne smješe (dio 1.3. ove metode). Ukoliko se ispitivanja sprovode u inertnoj atmosferi, maksimalna brzina reakcije poredi se sa brzinom reakcije referentne smješe izmjerene u inertnoj atmosferi.

3. Izvještavanje

3.1. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:

- identitetu, sastavu, stepenu čistoće, sadržaju vlage ispitivane supstance;
- obradi uzorka za ispitivanje (npr. mljevenje, sušenje i dr.);
- inicijatoru paljenja korišćen pri ispitivanju;
- rezultatima mjerenja; načinu reakcije (npr. blijesak i gorenje po površini,
- gorenje cijele mase, podatke o proizvodima sagorijevanja, itd.);
- svim primjedbama značajnim za tumačenje rezultata, uključujući i opis intenziteta reakcije (plamen, varnice, dim, slabo tinjanje, itd.) i približnu dužinu trajanja koja je dobijena pri preliminarnom ispitivanju iz bezbednosnih razloga/skrining ispitivanja za ispitivanu i referentnu supstancu;
- eventualnim rezultatima ispitivanja sa inertnom supstancom; eventualnim
- rezultatima ispitivanja sprovedenih u inertnoj atmesferi.

3.2. Tumačenje rezultata

Supstanca se smatra oksidujućom kada:

a) pri preliminarnom ispitivanju doĐe do snažne reakcije;
b) pri potpunom ispitivanju, maksimalna brzina gorenja ispitivane smješe je veća ili jednaka maksimalnoj brzini gorenja referentne smješe celuloze i barijum-nitrata.

Da se izbjegnu lažni pozitivni rezultati, uzimaju se u obzir i rezultati dobijeni ispitivanjem supstance u smješi sa nekim inertnom materijalom i/ili kada se ispituje u inertnoj atmosferi.

A.18. SREDNJE MOLEKULSKE MASE I RASPODJELA MOLEKULSKIH MASA POLIMERA

DIO I

1. Metoda ispitivanja

Metoda gel propusne hromatografije zasniva se na metodi OECD TG 118 (1996).

1.1. Uvod

Polimeri imaju različite osobine i nemoguće je dati jednu metodu koja postavlja precizne uslove za razdvajanje i procjenu i koja pokriva sve mogućnosti i sve specifičnosti razdvajanja polimera. Ovo važi za složene polimerne sisteme na koje se često ne može

primjeniti gel propusna hromatografija (Gel permeation chromatography, u daljem tekstu: GPC). Kada nije moguće primjeniti GPC molekulska masa može se odrediti primjenom drugih metoda (dio II ove metode). U takvim slučajevima, opisuju se svi detalji i navode razlozi zbog kojih se koristi druga metoda.. U ovom standardu date su detaljne informacije o izvoĐenju eksperimenata i evaluaciji dobijenih podataka. Kada je neophodno izmjeniti eksperimentalne uslove, ove izmjene se opravdavaju. Koriste se i drugi standardi ukoliko imaju reference. Uzorci polistirena, čija je poludisperzivnost poznata, koriste se za kalibraciju prema ovoj metodi. Metoda se može izmeniti kako bi odgovarala određenim polimerima, npr. polimera rastvornim u vodi i dugolančanim razgranatim polimera.

1.2. Definicije

Srednja molekulska masa po brojnoj zastupljenosti (u daljem tekstu: M_n) i srednja molekulska masa po masenoj zastupljenosti (u daljem tekstu: M_w) određuju se na osnovu jednačina:

$$M_n = \frac{\sum_{n}^{n} H_i x M_i}{\sum_{n}^{n} H_i}$$

$$M_w = \frac{\sum_{n}^{n} H_i x M_i}{\sum_{n}^{n} H_i}$$

gdje je: H_i nivo detektorskog signala od bazne linije za retencionu zapreminu V_i; M_i *n* molekulska masa frakcije polimera pri retencionoj zapremini V_i; n broj relevantnih podataka.

Opseg raspodjele molekulske mase koji predstavlja mjeru disperzije sistema dat je kroz odnos M_w / M_n.

1.3. Referentne supstance

GPC je relativna metoda, pa se mora izvršiti kalibracija. Za kalibraciju se najčešće koriste standardi linearnog polistirena sa poznatim prosječnim molekulskim masama M_n i M_w i sa poznatom uskom distribucijom molekulske mase. Kalibraciona kriva koristi se samo pri odreĐivanju molekulske mase nepoznatog uzorka ukoliko su uslovi za razdvajanje uzorka i standarda izabrani na identičan način.

Određeni odnos molekulske mase i zapremine eluata validan je jedino pod definisanim uslovima određenog eksperimenta. Navedeni uslovi obuhvataju, pre svega, temperaturu, rassupstancaač
(smješu rastvarača), uslove hromatografije i kolonu za razdvajanje ili sistem kolona za razdvajanje.

Molekulske mase uzorka određene na ovaj način jesu relativne vrijednosti i nazivaju se: "molekulske mase ekvivalentne polistirenu". Ovo znači da u zavisnosti od strukturnih i hemijskih razlika između uzorka i standarda, molekulske mase mogu odstupati od apsolutnih vrijednosti u većem ili manjem stepenu. Ukoliko se koriste drugi standardi, npr.

poli(etilenglikol), poli(etilenoksid), poli(metil-metakrilat), poliakrilna kiselina, navode se razlozi za ovo korišćenje.

1.4. Principi metode

Raspodjele molekulske mase uzorka i srednje molekulske mase (M_n, M_w) određuju se primjenom GPC. GPC je poseban tip tečne hromatografije kojom se uzorak odvaja na osnovu hidrodinamičkih zapremina pojedinačnih sastojaka.

Razdvajanje se postiže tako što uzorak prolazi kroz kolonu ispunjenu poroznim materijalom, najčešće nekim organskim gelom. Mali molekuli mogu da proĐu kroz pore dok veliki molekuli ne mogu. Put koji prolaze veliki molekuli je kraći i oni prvi izlaze sa kolone. Molekuli srednje veličine prolaze kroz neke od pora i eluiraju se kasnije. Najmanji molekuli, sa prosječnim hidrodinamičkim prečnikom manjim od pora gela, mogu ući u sve pore i oni se eluiraju nakondnji.

U idealnim uslovima, na razdvajanje utiče jedino veličina molekula, ali u praksi je teško izbjeći uticaj apsorpcionih efekata.

Neujednačena pakovanja kolona i mrtve zapremine mogu da pogoršaju situaciju.

Supstance se detektuju pomoću indeksa refrakcije ili UV apsorpcijom i na taj način se dobija prosta kriva raspodjele. Da bi se odredile ssupstancane vrijednosti molekulskih masa, neophodno je kalibrisati kolonu propuštanjem polimera čije su molekulske mase poznate i, idealno, takvih struktura koje su slične sa strukturama mnogih drugih polimera, kao npr. različiti standardi polistirena. Najčešći rezultat je Gausova kriva, koja je ponekad deformisana malim repom na strani gde se nalaze vrijednosti malih molekulskih masa. Vertikalna osa označava količinu, prema masi, čestica različitih molekulskih masa koje su eluirane, a horizontalna osa označava logaritam molekulske mase.

1.5 Kriterijumi kvaliteta

Ponovljivost (relativna standardna devijacija, u daljem tekstu: RSD) eluirane zapremine je bolja od 0,3 %. Zahtijevana ponovljivost analiza obezbjeđuje se korekcijom internim standardom ako se hromatogram procjenjuje na osnovu vremena zadržavanja i ako ne odgovara navedenom kriterijumu[1]. Polidisperzivnost zavisi od molekulskih masa standarda. Tipične vrijednosti za polistirenske standarde su:

Mp<2000	Mw/Mn<1.20
2000<Mp<10^6	Mw/Mn<1.05
Mp>10^6	Mw/Mn<1.20

gdje je M_p molekulska masa standarda na maksimumu pika.

1.6. Opis metode

1.6.1. Priprema standardnih rastvora polistirena

Standardi polistirena rassupstancaaju se pažljivim miješanjem u izabranom eluentu. Pri pripremanju rastvora uzimaju se u obzir preporuke proizvoĐača. Koncentracije izabranih standarda zavise od različitih faktora, npr. zapremine koja se injektuje, viskoziteta rastvora i osjetljivosti detektora. Maksimalna zapremina koja se injektuje je prilagoĐena dužini kolone, da se izbjegne preopterećenje. Tipične vrijednosti zapremina koje se injektuju pri analitičkim razdvajanjima pomoću GPC za kolone dimenzija 30 cm x 7,8 mm kreću se između 40 µl i

100 µl. Koriste se i veće zapremine, ali one ne prelaze vrijednost od 250 µl. Optimalni odnos između injektovane zapremine i koncentracije se određuje prije kalibracije kolone.

6.2. Priprema rastvora uzorka

Na pripremu rastvora uzoraka primjenjuju se isti zahtjevi kao i za standardne rastvore. Uzorak se pažljivim mućkanjem rassupstancaa u odgovarajućem rassupstancaaču, npr. tetrahidrofuranu (u daljem tekstu: THF). Ne koridsti se ultrazvučna kada za rastvaranje. Kada je neophodno, rastvor uzorka se prečišćava pomoću membranskog filtera veličine pora između 0,2 µm i 2 µm. Prisustvo nerastvornih čestica se navodi u završnom izvještaju, jer se one mogu pojaviti usled prisustva čestica velike molekulske mase. Za određivanje masenog procenta nerastvornih čestica primjenjuje se odgovarajuća metoda. Rastvore iskoristiti u roku od 24 sata.

1.6.3. Aparatura

Aparaturu čine:

- posuda za rassupstancaač;
- uređaj za degaziranje (ako je potreban);
- pumpa;
- pulsni prigušivač (ako je potreban);
- sistem za injektovanje;
- hromatografske kolone;
- detektor;
- mjerač protoka (ako je potreban); - procesor za prikupljanje podataka; - posuda za prikupljanje otpada.

GPC sistem je inertan prema korišćenom rassupstancaaču (npr. upotreba čeličnih kapilara za tetrahidrofuran).

1.6.4. Sistem za injektovanje i uvođenje rastvarača

Određena zapremina rastvora uzorka uvodi se u kolonu pomoću automatskog unošenja uzorka ili ručno u precizno određenoj zoni. Prebrzo povlačenje ili pritiskanje klipa šprica, ukoliko se vrši ručno, dovodi do promjena u ispitivanoj raspodijeli molekulskih masa. Sistem za uvođenje rastvarača je oslobođen od pulsiranja, tako što će sadržati pulsni prigušivač. Brzina protoka je u okviru 1 ml/min.

1.6.5. Kolona

U zavisnosti od uzorka, određivanje polimera vrši se upotrebom ili jedne kolone ili više međusobno povezanih kolona u nizu. Komercijalno su dostupni brojni porozni materijali za kolone sa definisanim svojstvima (npr. veličina pora, ekskluzioni limit-gornja granica molekulske mase iznad koje će se molekuli eluirati u retencionoj zapremini). Izbor gela za razdvajanje ili dužine kolone zavise od osobina uzorka (hidrodinamičke zapremine, raspodjele molekulske mase) i specifičnih uslova za razdvajanje kao što su: rassupstancaač, temperatura i brzina protoka[1,2,3].

1.6.6. Teorijski podovi

Za kolonu ili kombinaciju kolona koje se koriste za razdvajanje određuje se broj teorijskih podova. To podrazumjeva, u slučaju primjene THF-a kao rastvarača, nanošenje rastvora etilbenzena ili druge odgovarajuće nepolarne rastvorene supstance na kolonu poznate dužine. Broj teorijskih podova određuje se pomoću jednačine:

$$N=554\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \text{ i } N=16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

gdje je: N broj teorijskih podova; V_e eluciona zapremina na maksimumu pika; W širina pika na baznoj liniji; $W_{1/2}$ širina pika na polovini visine.

1.6.7. Efikasnost razdvajanja

Pored broja teorijskih podova koji kvantitativno određuje širinu traka, važnu ulogu ima i efikasnost razdvajanja, koja je određena nagibom kalibracione krive. Efikasnost razdvajanja kolona dobija se na osnovu odnosa:

$$\frac{Ve,Mx\ Ve/10Mx\_\quad cm3}{površinapoprečrečnogsjekakolone} \geq \left[\frac{}{cm^2}\right]$$

gdje je: $V_{e.Mx}$ eluciona zapremina polistirena molekulske mase M_x; $V_{e\ (10Mx)}$ eluciona zapremina polistirena sa deset puta većom molekulskom masom.

Rezolucija sistema definiše se kao:

$$R_{1,2} = \frac{Ve1^{-}Ve2\ x\ 2}{2x\ +\ W1\ \ W2\ \ \log10\ M\,2\ /\ M1}$$

gdje je: V_{e1} i V_{e2} elucione zapremine dva standarda polistirena na maksimumu pika; W_1 i W_2 širina pikova na baznoj liniji; M_1 i M_2 molekulske mase na maksimumu pika (treba da se razlikuju za faktor10). R-vrijednost za sistem je veća od 1,7 (u literaturi[4]).

1.6.8. Rassupstancaači

Rassupstancaači su visoke čistoće (koristi se THF čistoće 99,5 %). Posuda za rassupstancaač (ukoliko je neophodno u atmosferi inertnog gasa) je dovoljna za kalibraciju kolone i nekoliko analiza uzorka. Rassupstancaač se degazira prije nego što se ubaci u kolonu pomoću pumpe.

1.6.9. Kontrola temperature

Temperatura kritičnih unutrašnjih djelova (petlje za injektovanje, kolone, detektora i cijevi) je konstantna i u skladu sa izabranim rassupstancaačem.

1.6.10. Detektor

Svrha detektora je da bilježi koncentraciju uzorka eluiranog sa kolone. Da bi se izbjeglo nepotrebno širenje pikova, zapremina kivete ćelije detektora je što je moguće manja. Ona nije veća od 10 µl, osim u slučaju detektora zasnovanih na rasipanju svijetlosti i viskoznosti. Za detekciju se najčešće koristi diferencijalna refraktometrija. Ukoliko uzorak ili rassupstancaač imaju neka posebna svojstva koriste se i druge vrste detektora, kao npr. UV/VIS, IC, detektor viskoznosti i sl.

2. Podaci i izvještavanje

2.1. Podaci

Za svaki uzorak se vrše dva nezavisna eksperimenta. Oni se odvojeno analiziraju. M_n, M_w, M_w/M_n i M_p su dati za svako mjerenje. Naznačava se da izmjerene vrijednosti predstavljaju relativne vrijednosti ekvivalentne molekulskim masama korišćenih standarda.

Nakon što se odrede retencione zapremine ili retenciona vremena (mogu se korigovati pomoću internih standarda), na grafik se ucrtavaju ove vrijednosti prema logaritmu M_p vrijednosti (pri čemu je M_p maksimum pika kalibracionog standarda). Potrebne su najmanje dvije tačke za kalibraciju u dekadnom opsegu molekulskih masa (1 kD - 10 kD, 10 kD - 100 kD, 100 kD - 1.000 kD) i najmanje pet mjernih tačaka za cio grafik koje pokrivaju raspon očekivanih molekulskih masa. Krajnja tačka male molekulske mase na kalibracionoj krivoj definiše se n-heksilbenzenom ili nekim drugim odgovarajućim nepolarnim rassupstancaačem. Srednje molekulske mase po brojnoj zastupljenosti i po masenoj zastupljenosti određuju se elektronskom obradom podataka na osnovu formula datih u dijelu 1.2. ove metode, a mogu se odreĐivati i ručno. Kriva raspodjele je data u obliku tabele ili slike (diferencijalna frekvencija ili zbir procentualnih iznosa prema vrijednosti log M). Kod grafičkog prikaza jedan dekadni opseg molekulskih masa je širine oko 4 cm, a maksimalna visina pika iznosi 8 cm. U slučaju integraljenja krive raspodjele razmak ordinate između 0 % i 100% je oko 10 cm.

2.2. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:

2.2.1. Ispitivanoj supstanci i to: poznate podatke o ispitivanoj supstanci (identitet, aditivi, nečistoće) i opis obrade uzorka, zapažanja, problemi.

2.2.2. Instrumentima:

- posuda za rassupstancaač, inertni gas, degaziranje eluenta, sastav eluenta, nečistoće;
- pumpa, pulsni prigušivač, sistem za injektovanje;
- hromatografske kolone (proizvođač, informacije o karakteristikama kolona kao što su: veličina pora, vrsta materijala za odvajanje itd., broj, dužina i redosled upotrijebljenih kolona);
- broj teorijskih podova kolone (ili kombinacije), efikasnost razdvajanja (rezolucija sistema);
- podatke o simetriji pikova;
- temperatura kolona, način kontrole temperature;
- mjerač protoka ukoliko je korišćen proizvođač, princip mjerenja); sistem za prikupljanje i obradu podataka (hardver, softver).

detektor (princip mjerenja, vrsta, zapremina kivete);

2.2.3. Kalibraciji sistema:

- detaljan opis metode korišćene u izradi kalibracione krive;
- podatke o kriterijumima kvaliteta koji se odnose na ovu metodu (npr. koeficijent korelacije, greška metodom najmanjih kvadrata, itd.);
- podatke o svim primjenjenim ekstrapolacijama, pretpostavkama i aproksimacijama prilikom ispitivanja, procjeni i obradi podataka;
- sva mjerenja korišćena pri izradi kalibracione krive su dokumentovana u vidu tabele koja sadrži sljedeće podatke za svaku kalibracionu tačku: ime uzorka; ime proizvoĐača uzorka;
- karakteristične vrijednosti standarda M_p, M_n, M_w, M_w/M_n onako kako ih je dostavio proizvoĐač ili koje su izvedene na osnovu dodatnih mjerenja, zajedno sa detaljima o metodi njihovog određivanja;
- injektovanu zapreminu i injektovanu koncentraciju uzorka;
- M_p vrijednost koja je korišćena za kalibraciju;
- elucionu zapreminu ili korigovano retenciono vrijeme izmjereno na maksimumu pika; M_p izračunato na maksimumu pika; procentualnu grešku izračunate vrijednosti M_p i kalibrisane vrijednosti.

2.2.4. Procjeni:

- procjena na osnovu retencionog vremena: metode koje se koriste da bi se obezbijedila neophodna reproduktivnost (metoda korekcije, interni standardi, itd.);
- podatak o tome da li je evaluacija izvršena na osnovu elucione zapremine ili na osnovu retencionog vremena;
- podatke o granicama procjene ako pikovi nisu potpuno analizirani; opis metoda poravnavanja, ukoliko su korišćene; priprema i postupci prethodne obrade uzorka; prisustvo nerastvornih čestica, ukoliko su prisutne;
- injektovana zapremina (µ1) i injektovana koncentracija uzorka (mg/ml);
- zapažanja koja ukazuju na efekte koji dovode do odstepena od idealnog GPC profila; detaljan opis svih izmjena u postupku ispitivanja; detalji o opsezima greške; bilo koje druge podatke i zapažanja relevantna za tumačenje rezultata.

PRIMJERI DRUGIH METODA ZA ODREĐIVANJE SREDNJE MOLEKULSKE MASE PO BROJNOJ ZASTUPLJENOSTI (M_n) ZA POLIMERE DIO II

Gel propusna hromatografija (GPC) je metoda (posebno kada je dostupan set standarda koji ima sličnu strukturu kao i polimer) za određivanje vrijednosti M_n. Kada postoje praktični problemi koji onemogućuju upotrebu ove metode ili ako se očekuje da supstanca neće ispuniti M_n kriterijume (što treba da bude potvrĐeno) koriste se rapoložive alternativne metode, kao što su:

1. Upotreba koligativnih svojstava

1.1. Ebulioskopija/krioskopija

Ebulioskopija/krioskopija obuhvata mjerenja povišenja tačke ključanja (ebulioskopija) ili sniženje tačke mržnjenja (krioskopija) rastvarača kada se doda polimer. Zasniva se na činjenici da uticaj rastvorenog polimera na tačku ključanja/mržnjenja tečnosti zavisi od molekulske mase polimera[1,2]. Primjenljivost, za Mn < 20.000.

1.2. Sniženje napona pare

Sniženje napona pare obuhvata mjerenje napona pare izabrane referentne tečnosti prije i nakon dodavanja poznatih količina polimera[1,2]. Primjenljivost za Mn < 20.000 (teoretski, u praksi limitirana vrijednost).

1.3. Membranska osmometrija

Membranska osmometrija se zasniva na principu osmoze, tj. prirodnoj težnji molekula rastvarača da kroz polupropustljivu membranu pređu iz razblaženog u koncentrovani rastvor da bi se uspostavila ravnoteža. Pri ispitivanju, razblaženi rastvor ima koncentraciju nula, dok koncentrovani rastvor sadrži polimer. Efekat prolaska rastvarača kroz membranu dovodi do razlike u pritiscima što zavisi od koncentracije i molekulske mase polimera[1,3,4]. Primjenljivost, za Mn između 20.000 i 200.000.

1.4. Osmometrija parne faze

Osmometrija parne faze podrazumjeva poređenje brzine isparavanja čistog aerosola rastvarača i najmanje tri aerosola koji sadrže polimer u različitim koncentracijama[1,5,6].

Primjenljivost za Mn < 20.000.

2. Analiza terminalnih grupa

Da bi se koristila ova metoda potrebno je poznavanje strukture polimera i vrste terminalnih grupa u njegovom lancu (koje se moraju razlikovati od osnovnog lanca npr. pomoću nuklearne magnetne rezonance (NMR) ili titracije/derivatizacije). UtvrĐivanje molekulske koncentracije grupa kojima se završava polimerni lanac može se koristiti za utvrĐivanja molekulske mase[7,8,9]. Primjenljivost za M_n do 50.000 (uz smanjenu pouzdanost).

DIO I

1. Metoda ispitivanja

Metoda gel propusne hromatografije zasniva se na metodi OECD TG 119 (1996).

1.1. Uvod

Polimeri imaju različite osobine. Zbog navedenog ne postoji jedna metoda koja postavlja precizne uslove za razdvajanje i procjenu i koja pokriva sve mogućnosti i sve specifičnosti koje se javljaju tokom razdvajanja polimera.

Posebno važi za složene polimerne sisteme na koje se često ne primjenjuje gel propusna hromatografija (Gel permeation chromatography, u daljem tekstu: GPC). Kada nije moguće

primjeniti GPC molekulska masa se određuje primjenom drugih metoda (dio II ove metode). U takvim slučajevima opisuju se svi detalji i navode razlozi zbog kojih se koristi druga metoda.

Detaljne informacije o izvoĐenju eksperimenta i načinu procjene dobijenih podataka date su u navedenom standardu. U slučaju da je neophodno izvršiti izmjenu eksperimentalnih uslova, ove izmjene se opravdavaju. Koriste se i drugi standardi ukoliko su potpuno navedeni u literaturi. Metoda koja je data koristi polistirenske uzorke poznate polidisperzivnosti za kalibraciju, ali može biti modifikovana, kako bi odgovarala određenim polimerima, npr. polimerima rastvornim u vodi ili dugolančanim razgranatim polimerima.

1.2. Definicije

Molekuli sa malim molekulskim masama su molekuli sa molekulskom masom ispod 1.000 daltona. Srednja molekulska masa po brojnoj zastupljenosti Mn i srednja molekulska masa po masenoj zastupljenosti Mw određuju se uz pomoć jednačina:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i / M_i} \quad \text{i} \quad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i x M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

gdje su: H_i nivo signala detektora od bazne linije za retencionu
zapreminu V_i; M_i molekulska masa frakcije polimera pri retencionoj zapremini V_i; n broj relevantnih tačaka. Opseg raspodjele molekulskih masa koji predstavlja mjeru disperzije sistema dat je kroz odnos M_w/M_n.

1.3. Referentne supstance

GPC je relativna metoda i vrši se kalibracija. Za kalibraciju se najčešće koriste standardi linearnog polistirena sa poznatim prosječnim molekulskim masama M_n i M_w i sa poznatom uskom distribucijom molekulske mase. Kalibraciona kriva koristi se samo za određivanje molekulske mase nepoznatog uzorka ukoliko su uslovi za razdvajanje uzorka i standarda odabrani na identičan način. Određeni odnos molekulske mase i elucione zapremine validan je pod specifičnim uslovima određenog eksperimenta. Ovi uslovi obuhvataju, između ostalog, temperaturu, rassupstancaač (ili smješu rastvarača), uslove hromatografije i kolonu za razdvajanje ili sistem kolona. Molekulske mase uzorka utvrĐene na ovaj način su relativne vrijednosti i nazivaju se molekulske mase koje odgovaraju polistirenu. U zavisnosti od strukturnih i hemijskih razlika između uzorka i standarda, molekulske mase mogu da odstupaju od apsolutnih vrijednosti u manjoj ili većoj mjeri. Ukoliko se koriste drugi standardi, npr. poli(etilenglikol), poli(etilenoksid), poli(metil-metakrilat), poliakrilna kiselina, navode se i razlozi za njihovo korišćenje.

1.4. Princip metode

GPC metodom određuje se raspodjela molekulske mase uzorka i srednje molekulske mase (M_n i M_w). GPC je posebna vrsta tečne hromatografije kod koje se uzorak razdvaja na osnovu hidrodinamičkih zapremina pojedinačnih sastojaka. Razdvajanje se zasniva na prolasku uzorka kroz kolonu ispunjenu nekim poroznim materijalom, obično nekim organskim gelom. Manji molekuli mogu da uĐu u pore dok veliki molekuli prolaze bez zadržavanja. Put koji prolaze veći molekuli je kraći te oni prvi silaze sa kolone. Molekuli srednje veličine ulaze u neke od pora i oni kasnije silaze sa kolone. Najmanji molekuli, sa

prosječnim hidrodinamičkim poluprečnikom manjim od pora gela, mogu da uĐu u sve pore. Stoga oni nakondnji silaze sa kolone. U idealnim uslovima na razdvajanje utiče samo veličina molekula, ali u praksi je teško izbjeći uticaj apsorpcionih efekata. Neujednačena pakovanja kolona i mrtve zapremine pogoršavaju situaciju[2].

Detekcija se vrši pomoću indeksa refrakcije ili UV apsorpcije, a rezultat je prosta kriva raspodjele. Da bi se na krivu unele ssupstancane molekulske mase kolone su kalibrisane tako što će kroz njih proći polimeri čija je molekulska masa poznata i, koji u idealnim uslovima, imaju sličnu strukturu kao što su različiti polistirenski standardi. Najčešće se dobija Gausova kriva, koju ponekad narušava mali rep na kraju na kome se nalaze male molekulske mase. Vertikalna osa krive predstavlja količinu, po težini, eluiranih molekula različitih masa, dok horizontalna osa predstavlja logaritamsku vrijednost molekulskih masa. Sadržaj molekula malih molekulskih masa očitava se sa navedene krive. Ovo računsko izvoĐenje je tačno ako molekuli različitih malih molekulskih masa odgovaraju, na osnovu mase, polimjeru kao cijelini.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Ponovljivost (relativna standardna devijacija) elucione zapremine je veća od 0,3 %. Zahtijevana ponovljivost analiza obezbjeĐuje se korekcijom internim standardom ukoliko se hromatogram procjenjuje na osnovu retencionih vremena i ne odgovara navedenom kriterijumu[1]. Polidisperzivnost zavisi od molekulskih masa standarda. Tipične vrijednosti za polistirenske standarde su:

$Mp<2000$	$Mw/Mn<1.20$
$2000<Mp<10^6$	$Mw/Mn<1.05$
$Mp>10^6$	$Mw/Mn<1.20$

gdje je M_p molekulska masa standarda na maksimumu pika.

1.6. Opis metode

1.6.1. Priprema standardnih rastvora polistirena

Standardi polistirena rassupstancaaju se pažljivim miješanjem u izabranom eluentu. Pri pripremanju rastvora uzimaju se u obzir preporuke proizvoĐača. Koncentracije izabranih standarda zavise od različitih faktora, npr. zapremine koja se injektuje, viskoziteta rastvora i osjetljivosti analitičkog detektora. Maksimalna zapremina koja se injektuje je prilagoĐena dužini kolone, tako da se izbjegne preopterećenje. Tipične zapremine injektiranja za analitička razdvajanja u metodi gel propusne hromatografije, sa kolonama dimenzija 30 cm x 7,8 mm, kreću se između 40 µl i 100 µl. Moguće su i veće zapremine, ali one ne prelaze 250 µl. Optimalni odnos između injektovane zapremine i koncentracije se određuje prije kalibracije kolona.

1.6.2. Priprema rastvora uzorka

Na pripremu rastvora uzorka primjenjuju se isti zahtjevi kao i za pripremu standardnih rastvora.
Uzorak se rassupstancaa u odgovarajućem rassupstancaaču, npr. tetrahidrofuranu (u daljem tekstu: THF), pažljivim mućkanjem. Ne koristi se ultrazvučna kada za rastvaranje. Kada je neophodno, rastvor uzorka se prečišćava pomoću membranskog filtera veličine pora između 0,2 µm i 2 µm. Prisustvo nerastvornih čestica se navodi u završnom izvještaju, jer se one mogu pojaviti usled prisustva čestica velike molekulske mase. Za određivanje

masenog procenta nerastvornih čestica primjenjuje se odgovarajuća metoda. Rastvore iskoristiti u roku od 24 h.

1.6.3. Korekcija sadržaja zbog prisutnih nečistoća i aditiva

Vrši se korekcija sadržaja molekula čija je M < 1.000 zbog udjela specifičnih komponenti koje nisu polimeri, a koje su prisutne u rastvoru (npr. nečistoće i/ili aditivi), izuzev ukoliko izmjereni sadržaj nije < 1 %. Ovo se postiže direktnim analizama rastvora polimera ili eluata. U slučajevima kada je eluent, nakon prolaska kroz kolonu, previše razblažen da bi se mogao analizirati, on se koncentruje. Nekada se eluent uparava do suvog, pa zatim ponovo rastvori. Koncentrovanje eluenta vrši se pod takvim uslovima da se spriječe sve moguće izmjene njegovog sastava. Obrada eluenta dobijenog metodom gel propusne hromatografije zavisi od analitičke metode koja se koristi za kvantitativno određivanje.

1.6.4. Aparatura

GPC aparatura se sastoji od:

- posude za rassupstancaač;
- uređaja za degaziranje (kada je neophodno); - pumpe;
- pulsnog prigušivača (kada je neophodno);
- sistema za injektovanje;
- hromatografske kolone;
- detektora;
- mjerača protoka (kada je neophodno); - procesora za prikupljanje podataka; - posude za prikupljanje otpada.

GPC sistem je inertan prema korišćenom rassupstancaaču (npr. upotreba čeličnih kapilara za THF kao rassupstancaač).

1.6.5. Sistem za injektovanje i uvođenje rastvarača

Određena zapremina rastvora uzorka uvodi se u kolonu pomoću automatskog unošenja uzorka ili ručno u precizno određenoj zoni. Prebrzo povlačenje ili pritiskanje klipa šprica, ukoliko se vrši ručno, može dovesti do promjena u ispitivanoj raspodijeli molekulske mase. Sistem za uvođenje rastvarača je oslobođen od pulsiranja, tako što će sadržati pulsni prigušivač. Brzina protoka je u okviru 1 ml/min.

1.6.6. Kolona

U zavisnosti od uzorka, određivanje polimera vrši se upotrebom ili jedne kolone ili više međusobno povezanih kolona u nizu. Komercijalno su dostupni brojni porozni materijali za kolone sa definisanim svojstvima (npr. veličina pora, ekskluzioni limit (gornja granica molekulske mase iznad koje će se molekuli eluirati u retencionoj zapremini)) Izbor gela za razdvajanje ili dužina kolone zavise od osobina uzorka (hidrodinamičke zapremine, raspodjele molekulske mase) i od specifičnih uslova za razdvajanje kao što su rassupstancaač, temperatura i brzina protoka[1,2,3].

1.6.7. Teorijski podovi

Za kolonu ili kombinaciju kolona koje se koriste za razdvajanje određuje se broj teorijskih podova.

To podrazumjeva, u slučaju primjene THF kao rastvarača, nanošenje rastvora etil-benzena ili neke druge odgovarajuće nepolarne supstance na kolonu poznate dužine. Broj teorijskih podova određuje se uz pomoć jednačina:

$$N=554\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \quad \text{i} \quad N=16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

gdje su: N broj teorijskih podova; V_e eluciona zapremina na maksimumu pika; W širina pika na baznoj liniji; $W_{½}$ širina pika na polovini visine.

1.6.8. Efikasnost razdvajanja

Pored broja teorijskih podova koji kvantitativno određuje širinu traka, važnu ulogu ima efikasnost razdvajanja koja je određena nagibom kalibracione krive. Efikasnost razdvajanja kolone dobija se na osnovu odnosa:

$$\frac{Ve,Mx - Ve/10Mx}{prečrečnogsjekakolone \quad 6.^0 cm_2} \geq \left[\frac{cm^3}{površinapo}\right]$$

gdje su: $V_{e.Mx}$ eluciona zapremina polistirena molekulske mase M_x; $V_{e(10Mx)}$ eluciona zapremina polistirena sa deset puta većom molekulskom masom.

Rezolucija sistema definiše se kao:

$$R_{1,2} = \frac{Ve1 - Ve2}{2x \quad + \quad W1 \quad W2} \; x \; \frac{2}{\log 10 \; M2 / M1}$$

gdje su: V_{e1} i V_{e2} elucione zapremine dva polistirenska standarda na maksimumu pika; W_1 i W_2 širine pikova na baznoj liniji; M_1 i M_2 jmolekulske mase na maksimumu pika (treba da se razlikuju za faktor 10). R-vrijednost za sistem kolona je veća od 1,7[4].

1.6.9. Rassupstancaači

Svi rassupstancaači su visoke čistoće (koristi se THF čistoće 99,5%). Posuda za rassupstancaač (ukoliko je neophodno u atmosferi inertnog gasa) je dovoljna za kalibraciju kolone i nekoliko analiza uzorka. Rassupstancaač se degazira prije nego što se ubaci u kolonu uz pomoć pumpe.

1.6.10. Kontrola temperature

Temperatura kritičnih unutrašnjih djelova (petlje za injektovanje, kolone, detektor i cijevije konstantna i u skladu sa izabranim rassupstancaačem.

1.6.11. Detektor

Svrha detektora je da bilježi koncentraciju uzorka eluiranog sa kolone. Da bi se izbjeglo nepotrebno širenje pikova, zapremina kivete ćelije detektora je što je moguće manja. Ona

nije veća od 10 µl osim u slučaju detektora zasnovanih na rasipanju svijetlosti i viskoznosti. Za detekciju se najčešće koristi diferencijalna refraktometrija. Ukoliko uzorak ili rassupstancaač imaju neka posebna svojstva, koriste se i drugi tipovi detektora, npr. UV/VIS, IC, detektori viskoznosti i dr.

2. Podaci

Za svaki uzorak vrše se dva nezavisna eksperimenta. Oni se odvojeno analiziraju. U svim slučajevima vrši se i ispitivanje slijepe probe pod istim uslovima kao i uzorak. Naznači se da su izmjerene vrijednosti relativne vrijednosti ekvivalentne molekulskim masama korišćenih standarda. Nakon što se odrede retencione zapremine ili retenciona vremena (koriguju se pomoću internih standarda) na grafik se ucrtavaju vrijednosti prema logaritmu M_p vrijednosti (pri čemu je M_p maksimum pika kalibracionog standarda). Potrebne su najmanje dvije kalibracione tačke u dekadnom opsegu molekulskih masa (1 kD - 10 kD, 10 kD - 100 kD, 100 kD - 1.000 kD) i najmanje pet mjernih tačaka za cio grafik koje pokrivaju raspon očekivanih molekulskih masa. Završna tačka malih molekulskih masa koja se nalazi na kraju kalibracione krive definiše se pomoću nheksilbenzena ili nekog drugog odgovarajućeg nepolarnog rastvarača. Dio krive koji odgovara molekulskim masama ispod 1.000 kD određuje se i koriguje ako je potrebno zbog sadržaja nečistoća i aditiva. Podaci sa krive eluiranja uglavnom se obraĐuju elektronski, ali se mogu vršiti i ručna izračunavanja. Ukoliko se u koloni zadržao neki od nerastvornih polimera, njegova molekulska masa je vjerovatno veća od one koju ima rastvorna frakcija, i ukoliko se zanemari može doći do loše procjene sadržaja molekula sa malim molekulskim masama. Uputstvo za korigovanje sadržaja molekula sa malim molekulskim masama kod nerastvornih polimera dato je u drugom dijelu ove metode.

Kriva raspodjele je data u obliku tabele ili slike (diferencijalna frekvencija ili zbir iznosa u procentima prema vrijednosti log M). Kod grafičkog prikaza jedan dekadni opseg molekulskih masa je širine oko 4 cm, a maksimalna visina pika iznosi 8 cm. U slučaju integraljenja krive raspodjele razmak ordinate između 0 % i 100 % je oko 10 cm.

3. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:

2.2.1. Ispitivanoj supstanci i to :

poznate podatke o ispitivanoj supstanci (identitet, aditivi, nečistoće) i opis obrade uzorka, zapažanja problemi.

2.2.2. Instrumentima:

- posuda za rassupstancaač, inertni gas, degaziranje eluenta, sastav eluenta, nečistoće;
- pumpa, pulsni prigušivač, sistem za injektovanje;
- hromatografske kolone (proizvoĐač, informacije o karakteristikama kolona, kao što su veličina pora, vrsta materijala za odvajanje itd., broj, dužina i redosled upotrijebljenih kolona);
- broj teorijskih podova kolone (ili kombinacije), efikasnost razdvajanja (rezolucija sistema); podatke o simetriji pikova;
-
-
-
-

temperatura kolona, način kontrole temperature; detektor (princip mjerenja, vrsta, zapremina kivete); mjerač protoka ukoliko je korišćen (proizvoĐač, princip mjerenja); sistem za prikupljanje i obradu podataka (hardver i softver).

2.2.3. Kalibraciji sistema:

- detaljan opis metode korišćene u izradi kalibracione krive;
- podatke o kriterijumima kvaliteta koji se odnose na ovu metodu (npr. koeficijent korelacije, greška metodom najmanjih kvadrata, itd.);
- podatke o svim primjenjenim ekstrapolacijama, pretpostavkama i aproksomacijama prilikom ispitivanja, procjeni i obradi podataka;
- sva mjerenja korišćena pri izradi kalibracione krive su dokumentovana u vidu tabele koja sadrži sljedeće podatke za svaku kalibracionu tačku: ime uzorka;
- ime proizvođača uzorka;
- karakteristične vrijednosti standarda M_p, M_n, M_w, M_w/M_n, onako kako ih je dostavio proizvoĐač ili koje su izvedene na osnovu dodatnih mjerenja zajedno sa detaljima o metodi njihovog određivanja;
- injektovana zapremina i injektovana koncentracija uzorka; M_p vrijednost koja je korišćena za kalibraciju;
- eluciona zapremina ili korigovano retenciono vrijeme izmjereno na maksimumu pika; M_p izračunato na maksimumu pika; procentualna greška izračunate vrijednosti M_p i kalibrisane vrijednosti.

2.2.4. Sadržaju molekula sa malim molekulskim masama:

- opis korišćene metode i način na koji su izvršeni eksperimenti;
- podatke o procentu molekula sa malim molekulskim masama (m/m) u odnosu na cio uzorak;
- podatke o nečistoćama, aditivima i drugim vrstama koje nisu polimeri izražene kao maseni procenat u odnosu na cio uzorak.

2.2.5. Procjeni:

- procjena na osnovu retencionog vremena: sve metode koje obezbjeđuju zahtijevanu reproduktivnost (metoda korekcije, interni standardi i dr.);
- podatak o tome da li je procjena izvršena na osnovu elucione zapremine ili na osnovu retencionog vremena;
- podatke o ograničenjima procjene ako pikovi nisu potpuno analizirani; opis metoda poravnavanja, ukoliko su korišćene; priprema i prethodna obrada uzorka;
- prisustvo nerastvornih čestica, ukoliko ih ima;
- injektovana zapremina (µ1) i koncentracija injektovanog uzorka (mg/ml);
- zapažanja koja se odnose na uticaje koji dovode do odstepena od idealnog profila gel propusne hromatografije;
- detaljan opis svih izmjena postupka ispitivanja;
- detalje o opsezima greške; druge podatke i zapažanja relevantne za tumačenje rezultata.

UPUTSTVO ZA KORIGOVANJE SADRŽAJA MOLEKULA SA MALIM MOLEKULSKIM MASAMA ZBOG PRISUSTVA NERASTVORNIH POLIMERA DIO II

Kada je u uzorku prisutan nerastvorni polimer dolazi do gubitka mase u toku GPC analize. Nerastvorni polimer ireverzibilno se zadržava na koloni ili filteru dok njegov rastvorni dio prolazi kroz kolonu. U slučaju kada se izmjeri ili pretpostavi povećanje indeksa refrakcije (dn/dc) polimera, moguće je procjeniti gubitak mase uzorka na koloni. U tom slučaju vrši se

korekcija korišćenjem eksterne kalibracije sa standardnim materijalima poznate koncentracije dn/dc da bi se kalibrisao odgovor refraktometra. U primjeru koji slijedi korišćen je standard poli(metil-metakrilata) (pMMA). Kod eksterne kalibracije u analizi akrilnih polimera, pMMA standard poznate koncentracije u tetrahidrofuranu analizira se gel propusnom hromatografijom, a dobijeni rezultati koriste se za

iizračunavanje konstante refraktometra na osnovu jednačine: $K = \frac{R}{\left(CxVx\frac{dn}{dc}\right)}$ gdje su: K

konstantna refraktometra (u mikrovoltima / sekund/ml); R odgovor pMMA standarda/ (u mikrovoltima / sekund); C koncentracija pMMA standarda (u mg/ml); V injektovana zapreminu (u ml); dn/dc uvećanje indeksa refrakcije za pMMA u tetrahidrofuranu (u ml/mg).

Za pMMA standard tipične vrijednosti su: R = 2 937 891; C = 1.07 mg/ml; V = 0,1 ml; dn/dc = 9 x 10^{-5} ml /mg. Na ovaj način dobijena vrijednost K, 3.05 x 10^{11} koristi se da se izračuna teorijski odgovor detektora ukoliko je 100 % injektovanog polimera izdvojeno preko detektora.

A.20. PONAŠANJE POLIMERA U VODI (RASTVORLJIVOST/EKSTRAKTIVNOST)

1. Metoda ispitivanja

Metoda ispitivanja odgovara revidiranoj verziji metode OECD TG 120 (1997). Ekvivalentna međunarodna ispitna metoda ili druge primjenjive ispitne metode za predmetnu krajnju tačku navedene su u tabeli 1 dijela 0.

1.1. Uvod

Za pojedine polimere, kao što su emulzioni polimeri, da bi se koristila metoda ispitivanja ponašanja polimera u vodi potrebna je prethodna priprema. Metoda se ne primjenjuje na tečne polimere niti na polimere koji reaguju sa vodom pri uslovima ispitivanja. Kada ispitivanje ovom metodom nije moguće ili nije praktično za izvoĐenje, ponašanje rastvorljivosti/ekstraktivnosti ispituje se drugim metodama. U takvim slučajevima navode se svi detalji i razlozi korišćenja tih metoda.

1.2. Referentne supstance

Referentne supstance nisu date.

1.3. Princip metode

Ponašanje polimera u vodenoj sredini rastvorljivost/ekstraktivnost određuje se primjenom metode staklenog suda (metoda A.6. Rastvorljivost u vodi, metoda staklenog suda, koja je data u ovom prilogu) sa izmjenama koje su date u ovoj metodi.

1.4. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta nisu dati.

1.5. Opis metode

1.5.1. Oprema

Za ovu metodu neophodni su:

- uređaj za mljevenje, tj. mlin za proizvodnju čestica poznatih veličina; aparat za
- miješanje sa mogućnošću kontrolisanja temperature; membranski sistem za
- filtriranje; odgovarajuća analitička oprema; standardizovana sita.
-
- 1.5.2. Priprema uzorka

Reprezentativni uzorak se prvo pomoću odgovarajućih sita svede na čestice veličine od 0,125 mm do 0,25 mm. Nekada se hladi uzorak zbog njegove stabilnosti ili procesa mljevenja. Gumasti materijali se usitne na temperaturi tečnog azota[1]. Ako se ne dobijaju čestice traženih veličina, materijal se usitnjava što je više moguće, a postignut rezultat navodi se u izvještaju. U izvještaju se navodi način na koji je samljeveni uzorak čuvan prije ispitivanja.

1.5.3. Postupak ispitivanja

Tri uzorka po 10 g supstance koja se ispituje odmjeri se u svaku od tri posude sa staklenim zapušačima i doda 1.000 ml vode u svaku posudu. Ako se količina od 10 g polimera pokaže nepodesnom, koristi se sljedeća najveća količina sa kojom se radi. Količina vode prilagoĐava se u skladu sa tim. Posude se čvrsto zapuše i zatim mućkaju na 20 °C. Koriste se uređaji za mućkanje ili miješanje koji mogu da rade na konstantnoj temperaturi. Nakon 24 časa, sadržaj svake posude se centrifugira ili filtrira, a koncentracija polimera u bistrom vodenom sloju određuje se odgovarajućom analitičkom metodom.

Ako ne postoje odgovarajuće analitičke metode za određivanje polimera u vodenoj fazi, ukupna rastvorljivost-ekstraktivnost procjenjuje se iz mase osušenog taloga sa filtera ili osušenog taloga dobijenog centrifugiranjem. Pravi se kvantitativna razlika između nečistoća i aditiva sa jedne strane, i polimera sa malim molekulskim masama sa druge strane. U slučaju gravimetrijskog određivanja važno je ispitati slijepu probu u kojoj ispitivana supstanca nije prisutna, kako bi se izračunao talog koji nastaje u eksperimentalnom postupku. Rastvorljivost/ekstraktivnost - ponašanje polimera u vodi na 37 °C na pH 2 i pH 9 određuje se na isti način kao što je opisano za eksperiment na 20 °C. pH vrijednosti postižu se dodavanjem ili odgovarajućih pufera, ili odgovarajućih kiselina ili baza kao što su hlorovodonična kiselina, sirćetna kiselina, natrijum ili kalijum hidroksid analitičke čistoće ili NH_3. U zavisnosti od primjenjene metode analize, vrši se jedno ili dva ispitivanja. Kada postoji dovoljno specifičnih metoda za direktnu analizu polimera u vodenoj fazi, dovoljno je jedno ispitivanje. Kada navedene metode ne postoje i kada je određivanje ponašanja polimera rastvorljivosti/ekstraktivnosti ograničeno na indirektne analize kojima se određuje samo ukupni sadržaj organskog ugljenika (Total organic carbon, u daljem tekstu: TOC) vodenog ekstrakta, vrše se i dodatna ispitivanja. Dodatno ispitivanje vrši se na tri uzorka, koristeći deset puta manje količine uzorka polimera i iste količine vode kao u prvom ispitivanju.

1.5.4. Analiza

1.5.4.1. Ispitivanje izvršeno sa jednom količinom uzorka

Postoje metode za direktnu analizu komponenti polimera u vodenom ekstraktu. Alternativno se razmatra indirektna analiza rastvorenih/ekstrahovanih komponenti polimera određivanjem ukupnog sadržaja rastvornih komponenti korigovanog za nepolimerne komponente. Analiza ukupnog sadržaja polimernih vrsta u vodenom ekstraktu izvodi se:

1) ili dovoljno osjetljivom metodom odnosno:
   - TOC koristeći digestiju persulfatom ili dihromatom za prevođenje u CO_2 koji se određuje infracrvenom spektrometrijom (u daljem tekstu: IR) ili hemijskom analizom;
   - Atomska apsorpciona spektrometrija (u daljem tekstu: AAS) ili induktivno kuplovana plazma (u daljem tekstu: ICP), emisioni ekvivalent za polimere koji sadrže metale ili silicijum;
   - UV apsorpcija ili spektrofluorimetrija za aril-polimere;
   - LC-MS za uzorke male molekulske mase;

2) ili isparavanjem u vakuumu do suvog vodenog ekstrakta i spektroskopskom (IR, UV itd.) ili AAS/ICP analizom taloga.

Ako se analiza vodenog ekstrakta kao takva ne primjenjuje, vodeni ekstrakt se ekstrahuje organskim rassupstancaačem koji se ne miješa sa vodom, tj. hlorovanim ugljovodonikom. Rassupstancaač se zatim upari i talog analizira kako je opisano da bi se odredio sadržaj polimera. Svaka komponenta u ovom talogu koja je identifikovana kao nečistoća ili aditiv oduzima se u cilju određivanja stepena rastvorljivosti/ekstraktivnosti samog polimera. Kada su prisutne relativno velike količine takvog materijala talog se analizira npr. HPLC ili GC analizom da bi se razlikovale nečistoće od monomera i prisutnih vrsta nastalih od monomera, tako da se odredi pravi sadržaj onoga što je nastalo. U nekim slučajevima je dovoljno jednostavno isparavanje organskog rastvarača do suvog i mjerenje suvog ostatka.

1.5.4.2. Ispitivanje izvršeno sa dvije različite količine uzorka

Svi ekstrakti taloga analiziraju se na TOC. Nerastvorni/neekstrahovani dio uzorka određuje se gravimetrijski. Ukoliko, nakon centrifugiranja ili filtriranja sadržaja svake posude, talog polimera ostane zalijepljen za zid posude, posuda se ispira filtratom sve dok se ne prebaci sav talog. Nakon toga, filtrat se opet centrifugira ili filtrira. Talog koji ostane na filteru ili u kiveti centrifuge suši se na 40 °C u vakuumu i mjeri se. Sušenje se nastavlja do konstantne mase.

2. Podaci

2.1. Ispitivanje jedne količine uzorka

Navode se pojedinačni rezultati za svaku od tri boce i njihova srednja vrijednost izražena u jedinicama mase po zapremini rastvora (uobičajeno mg/L) ili jedinicama mase po masi uzorka polimera (uobičajeno mg/g). Navodi se i gubitak mase uzorka (izračunat kao masa rastvorene supstance podijeljena sa masom početnog uzorka). Računaju se relativne standardne devijacije (RSD). Navode se pojedinačne cifre za ukupnu supstancu (polimer + glavni aditivi itd.) i samo za polimer (tj. nakon oduzimanja doprinosa aditiva).

2.2. Ispitivanje dvije različite količine uzorka

Pojedinačne TOC vrijednosti vodenih ekstrakta iz dva eksperimenta pri kojima su vršena po tri ispitivanja i srednja vrijednost za svaki eksperiment, izražavaju se kao jedinice mase po zapremini rastvora (uobičajeno mgC/L), kao i u jedinicama mase po masi početnog uzorka (uobičajeno mgC/g). Ukoliko ne postoji razlika između rezultata dobijenih sa većim i manjim odnosom voda/uzorak, ovo ukazuje na to da su sve komponente koje mogu da se ekstrahuju i bile ekstrahovane. U tom slučaju, direktna analiza nije potrebna. Navode se pojedinačne mase taloga i izražavaju u procentima od početnih masa uzorka. Srednje vrijednosti računaju se za svaki eksperiment. Razlike između 100 % i nađenih procenata

predstavljaju procenat rastvornog materijala i materijala koji može da se ekstrahuje u originalnom uzorku.

3. Izvještavanje

3.1. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:

3.1.1. Supstanci koja se ispituje i to dostupne podatke o ispitivanoj supstanci (identitet, aditivi, nečistoće, sadržaj molekula malih molekulskih masa).

3.1.2. Eksperimentalnim uslovima i to opis postupaka i eksperimentalnih uslova i opis analitičkih metoda i metoda detekcije.

3.1.3. Rezultatima:
- rezultati rastvorljivosti/ekstraktivnosti u mg/l; pojedinačne i srednje vrijednosti ekstrahovanja različitim rastvaračima, razdvojene na sadržaj polimera i nečistoća, aditiva, itd.;
- rezultati rastvorljivosti/ekstraktivnosti u mg/g polimera;
- TOC vrijednosti vodenih ekstrakta, mase rastvorene supstance i izračunate procente, ako su mjerene;
- pH svakog uzorka;
- podatke o vrijednostima slijepih proba;
- kada je potrebno, napomene o hemijskoj nestabilnosti ispitivane supstance, tokom postupka ispitivanja i analitičkog postupka;
- sve podatke koji su važni za tumačenje rezultata.

A.21. OKSIDUJUĆA SVOJSTVA (ZA TEČNOSTI)

1. Metoda ispitivanja

Ekvivalentna međunarodna ispitna metoda ili druge primjenjive ispitne metode za predmetnu krajnju tačku navedene su u tabeli 1 dijela 0.

1.1. Uvod

Metoda ispitivanja oksidujućih svojstava osmišljena je za mjerenje potencijala tečnih supstanci da povećaju i razviju brzinu ili intenzitet gorenja zapaljivih supstanci, ili da naprave smješu sa zapaljivom supstancom koja ima sposobnost spontanog paljenja, kada se ovakva smješa dobro izmiješa. Zasniva se na UN metodi ispitivanja tečnosti sa oksidujućim svojstvima[1]. Metoda A.21. osmišljena je tako da prije svega ispunjava zahtjeve Uputstva EU broj 1907/2006, pa je potrebno izvršiti poređenje sa jednom referentnom supstancom. Ispitivanje i poređenje sa dodatnim referentnim supstancama je potrebno u slučaju kada se očekuje da će rezultati ispitivanja biti korišćeni u druge svrhe[XXVIII]. Ispitivanje se ne vršii kada je na osnovu strukturne formule jasno da supstanca nema sposobnost da egzotermno reaguje sa zapaljivim materijalom. Prije nego što se pristupi ispitivanju korisno je imati preliminarne podatke o potencijalnim eksplozivnim svojstvima supstance. Ovo ispitivanje se ne primjenjuje na supstance u čvrstom stanju, gasove, eksplozive ili visoko zapaljive supstance ili organske perokside. Kada postoje rezultati za ispitivanu supstancu u UN metodama ispitivanja za oksidujuće tečnosti ne vrši se njeno ispitivanje.

1.2. Definicije

Vrijeme porasta pritiska je prosječna vrijednost izmjerenog vremena koje je potrebno da se pritisak smješe koja se ispituje podigne sa 690 kPa na 2.070 kPa iznad atmosferskog pritiska.

1.3. Referentna supstanca

Kao referentna supstanca koristi se 65 % (m/m) vodeni rastvor azotne kiseline (analitičke čistoće). Ukoliko lice koje vrši ispitivanje smatra da se rezultati ovog ispitivanja koriste i u neke druge svrhe, postoji mogućnost da se ispitaju i dodatne referentne supstance.

1.4. Princip metode

Tečnost koja se ispituje miješa se u masenom odnosu jedan prema jedan sa vlaknastom celulozom i stavlja se u sud pod pritiskom. Ukoliko tokom miješanja ili punjenja posude dođe do spontanog paljenja, ne vrši se dalje ispitivanje.

Ukoliko ne dođe do spontanog paljenja sprovodi se kompletno ispitivanje. Smješa se zagrijava u posudi pod pritiskom i određuje se vrijeme koje je potrebno da se pritisak poveća sa 690 kPa na 2.070 kPa (iznad atmosferskog pritiska). Ova vrijednost se upoređuje sa prosječnom vrijednošću vremena porasta pritiska referentne supstance u smješi sa celulozom u odnosu 1:1.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

U seriji od pet ispitivanja jedne supstance rezultati pojedinačnih ispitivanja ne odstupaju za više od 30 % u odnosu na aritmetičku srednju vrijednost. Rezultati koji odstupaju više od 30 % od srednje vrijednosti odbacuju se, poboljšava se postupak miješanja supstanci i punjenja posude za ispitivanje i zatim se ispitivanje ponavlja.

1.6. Opis metode

1.6.1. Priprema
1.6.1.1. Zapaljive supstance

Osušena vlaknasta celuloza sa vlaknima dužine između 50 µm i 250 µm i srednjim prečnikom od 25µ koristi se kao zapaljivi materijal. Celuloza se suši do konstantne mase u sloju čija debljina ne prelazi 25 mm na temperaturi od 105 °C tokom 4 sata i drži se u eksikatoru bez sredstva za sušenje dok se ne ohladi i dalje do ispitivanja. Sadržaj vode u osušenoj celulozi nije veći od 0,5% po jedinici suve mase. Ukoliko je potrebno, vrijeme sušenja se može produžiti. Ista šarža celuloze koristi se u toku cijelog ispitivanja.

1.6.1.2. Oprema

1.6.1.2.1. Sud pod pritiskom

Koristi se sud pod pritiskom. Ovaj sud se sastoji od cilindričnog tijela izrađenog od čelika, dužine 89 mm i poljašnjeg prečnika od 60 mm (Slika 1). Dvije suprotne strane mašinski su obrađene (čime se poprečni presjek posude smanjuje na 50 mm) da bi se olakšalo navijanje zapušača na kome se nalazi sistem za paljenje i ventil oduška. Sud, koji ima šupljinu prečnika 20 mm, iznutra se svodi na dubinu od 19 mm i narezuje se da primi 1˝ po

Britanskom standardnom sistemu ili veličinu ekvivalentnu ovoj prema metričkom sistemu. Ventil za odušak, u obliku ručke koja se montira na bočnu stranu aparata, zavrne se za krivu površinu suda pod pritiskom na udaljenosti od 35 mm od jednog od njegovih krajeva i pod uglom od 90° u odnosu na prirubnice. Izdubi se otvor dubine 12 mm i nareže tako da primi veličinu od 1/2˝ po Britanskom standardnom sistemu (ili veličinu ekvivalentu ovoj prema metričkom sistemu) na kraju bočne strane. Po potrebi koristi se inertni zaptivač kako bi sud bio nepropustan za gasove. Ručka koja se nalazi sa strane proteže se 55 mm od tijela suda pod pritiskom i ima navoj od 6 mm. Kraj ove ručke ima navoj koji omogućava da u njega stane presupstancaač pritiska sa dijafragmom. Koristi se bilo koji uređaj za mjerenje pritiska pod uslovom da nije u kontaktu sa vrelim gasovima ili proizvodima razlaganja i ako izdržava porast pritiska od 690 kPa do 2.070 kPa u vremenu koje nije veće od 5 ms. Kraj suda pod pritiskom koji je na većoj udaljenosti od ove ručke zasupstancaa se zapušačem na kome se nalazi sistem za paljenje opremljen sa dvije elektrode, od kojih je jedna izolovana u odnosu na tijelo zaptivača, a druga uzemljena na njega. Drugi kraj suda pod pritiskom zasupstancaa se sigurnosnim diskom koji štiti od eksplozije (pritisak eksplozije oko 2.200 kPa) koji je pričvršćen poklopcem za zaptivanje sa otvorom od 20 mm. Ako je potrebno koristi se inertni zaptivač kako bi sud bio nepropustan za gasove. Stalak (Slika 2) drži aparaturu u odgovarajućem položaju u toku upotrebe. Sastoji se od osnove izraĐene od mekog čelika dimenzija 235 mm x 184 mm x 6 mm i šupljeg četvrtastog profila dužine 185 mm i dimenzija 70 mm x 70 mm x 4 mm. Sa jedne strane četvrtastog profila izrežu se po dužini dvije suprotne stranice tako da se dobije konstrukcija sa dvije noge ravnih stranica sa visinom kućišta od 86 mm. Krajevi ovih nogu ravnih stranica sijku se pod uglom od 60° po horizontalnoj ravni da bi se zavarili za oslonac. Žlijeb širine 22 mm i dubine 46 mm montira se na jednu stranu kućišta suda tako da kada se sud spusti na oslonac zapušač na kome se nalazi sistem za paljenje bude okrenut prema izolatorskoj kutiji, a ručka koja je montirana sa strane upada u ovaj žleb. Komad čelika širine 30 mm i debljine 6 mm vari se za donju unutrašnju stranu izolatorske kutije da bi održavao rastojanje. Dva šrafa od 7 mm koji se prišrafljuju sa suprotne strane drže sud pod pritiskom čvrsto na svom mjestu. Dvije trake od čelika širine 12 mm i debljine 6 mm zavarene sa donje strane gdje se sastavni djelovi dodiruju sa izolatorskom kutijom, obezbjeđuju sud pod pritiskom odozdo.

1.6.1.2.2. Sistem za paljenje

Sistem za paljenje sastoji se od žičanog provodnika dužine 25 cm izraĐenog od Ni/Cr, čiji je prečnik 0,6 mm i otpornost 3,85 Ω/m. Žica je navijena na šipku prečnika 5 mm, u obliku kalema i pričvršćenja je za elektrode zapušača na kome se nalazi sistem za paljenje. Ovaj kalem ima jedan od oblika koji su dati na Slici 3. Razmak između dna suda i donje strane provodnika pomoću koga se pali smješa je 20 mm. Ukoliko se elektrode ne podešavaju, krajevi provodnika pomoću koga se pali smješa i dna posude su izolovani keramičkom oblogom. Provodnik se zagrijava stalnim izvorom struje od najmanje 10 A.

1.6.2. Postupak ispitivanja

Aparatura, jedinjenja sa pretvaračem pritiska i sistemom za paljenje, ali bez sigurnosnog diska koji štiti od eksplozije, nalazi se na podlozi pri čemu je zapušač sa sistemom za paljenje u donjoj poziciji. U staklenoj čaši se pomiješa 2,5 g tečnosti koja se ispituje sa 2,5 g osušene celuloze pomoću staklenog štapića. Iz bezbjednosnih razloga, prilikom miješanja lice koje rukuje smješom je zaštićeno sigurnosnim štitom. Ukoliko smješa počne da gori tokom miješanja ili stavljanja u posudu za ispitivanje, ispitivanje se ne sprovodi do kraja. Smješa se dodaje u malim količinama u sud pod pritiskom uz sabijanje. Vodi se računa da smješa bude postavljena oko provodnika pomoću koga se vrši paljenje smješe i da kontakt

između smješe i provodnika bude dobar. Važno je da se provodnik ne iskrivi tokom procesa nanošenja smješe, jer to dovodi do pogrešnih rezultata. Sigurnosni disk koji štiti od eksplozije stavlja se u odgovarajuću poziciju i pričvršćuje poklopcem za zaptivanje. Napunjen sud postavlja se na stalak tako da se sigurnosni disk koji štiti od eksplozije nalazi na vrhu, a aparat se postavlja u digestor ili u jedinicu za ispitivanje zapaljivih materija. Izvor struje pričvsti se za poljašnje kleme zapušača sa sistemom za paljenje i pusti se struja jačine 10 A. Vrijeme između pripreme smješe za ispitivanje i uključivanja struje nije duže od 10 minuta. Signal koji dolazi sa presupstancaača pritiska bilježi odgovarajući sistem koji istovrijemeno bilježi podatke o razvoju pritiska tokom vremena i analizira ih (npr. program za bilježenje podataka dobijenih tokom ispitivanja povezan sa programom za izradu grafikona). Smješa se zagrijava sve dok ne pukne sigurnosni disk koji štiti od eksplozije ili najmanje 60 s. Ukoliko se sigurnosni disk koji štiti od eksplozije ne rasgrudne, smješa se ostavlja da se ohladi prije nego što se aparat pažljivo rastavi, vodeći računa da može doći do pojave nadpritiska. Izvodi se po pet ispitivanja sa supstancom koja se ispituje i sa supstancom koja služi kao referentna supstanca. Bilježi se vrijeme koje je potrebno da pritisak od 690 kPa poraste do pritiska od 2.070 kPa. Iizračunava se srednja vrijednost vremena koje protekne do porasta pritiska. Može se dogoditi da supstanca dovodi do porasta pritiska (prebrzo ili presporo) uslijed hemijskih reakcija koje nisu karakteristične za oksidujuće osobine. Tada je potrebno da se ponovi ispitivanje sa nekom inertnom supstancom, npr dijatomejskom zemljom, umjesto sa celulozom, kako bi se utvrdila priroda reakcije.

2. Podaci

Vremena porasta pritiska ispitivane supstance i referentnih supstanci. Vremena porasta pritiska inertne supstance ukoliko je takvo ispitivanje ssprovedeno.

2.1. Obrada rezultata

Iizračunava se prosječno vrijeme porasta pritiska za ispitivanu supstancu i za referentne supstance. Iizračunava se i prosječno vrijeme porasta pritiska za inertnu supstancu (ukoliko su ispitivanja izvršena).

Primjeri rezultata dati su u Tabeli 1.

Tabela 1. Primjeri rezultata[(a)]

Supstanca[(b)]	Prosječno vrijeme porasta pritiska za smješu sa celulozom 1:1 (ms)
Amonijum-dihromat, zasićeni vodeni rastvor	20 800
Kalcijum-nitrat, zasićeni vodeni rastvor	6 700
Feri-nitrat, zasićeni vodeni rastvor	4 133
Litijum-perhlorat, zasićeni vodeni rastvor	1 686
Magnezijum-perhlorat, zasićeni vodeni rastvor	777
Nikal-nitrat, zasićeni vodeni rastvor	6 250
Azotna kiselina, 65 %	4 767[(c)]
Perhlorna kiselina, 50 %	121**(c)**
Perhlorna kiselina, 55 %	59
Kalijum nitrat, 30 % vodeni rastvor	26 690
Srebro-nitrat, zasićeni vodeni rastvor	**(d)**
Natrijum-hlorat, 40 % vodeni rastvor	2 555[(c)]

Natrijum-nitrat, 45 % vodeni rastvor	4 133
Inertna supstanca	
Voda: celuloza	**(d)**

3. Izvještaj

3.1. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:

3.2. Tumačenje rezultata

- identitetu, sastavu, čistoći, kao i podatke o supstanci koja se ispituje;
- koncentraciji ispitivane supstance;
- postupku sušenja celuloze koja je korišćena pri ispitivanju;
- sadržaju vode u celulozi koja je korišćena pri ispitivanju;
- rezultatima mjerenja;
- eventualnim rezultatima ispitivanja sa inertnom supstancom;
- izračunatom prosječnom vremenu porasta pritiska;
- odstepenu od standardnog postupka ispitivanja i razloge za to;
- svim dodatnim informacijama i primjedbama značajnim za tumačenje rezultata

Rezultati ispitivanja procjenjuju se na osnovu:

a) činjenice da li se smješa ispitivane supstance i celuloze spontano pali i
b) poređenjem prosječnih vremena porasta pritiska sa vrijednosti 690 kPa na pritisak od 2.070 kPa ispitivane supstance i referentnih supstanci

Tečna supstanca smatra se oksidujućom supstancom ukoliko:

a) se smješa ispitivane supstance i celuloze u masenom odnosu 1:1 spontano pali ili
b) smješa ispitivane supstance i celuloze u masenom odnosu 1:1 ima prosječno vrijeme povećanja pritiska manje ili jednako smješi vodenog rastvora azotne kiseline 65 % (m/m) i celuloze u masenom odnosu 1:1.

Da bi se izbjegao lažni pozitivni rezultat, prilikom analize dobijenih rezultata uzima se u razmatranje i ispitivanje.

A.22. ODREĐIVANJE SREDNJEGA GEOMETRIJSKOG PREČNIKA VLAKANA POMOĆU DUŽINE

1. Metoda

1.1. Uvod

U ovoj se metodi opisuje postupak za mjerenje srednjeg geometrijskog prečnika pomocu dužine
(LWGMD – Length Weighted Geometric Mean Diameter) umetnutih mineralnih vlakana (MMMF – ManMade Mineral Fibres). Buduci da se LWGMD vlakana s 95 % vjerovatnoćom nalazi izmedu nivoa pouzdanosti uzorka od 95 % (tj.LWGMD ± dvije standardne greške), vrijednost koja se navodi u izvještaju (ispitna vrijednost) odgovarabazira na ažuriranoj verziji (1994.) nacrta industrijskog postupka za zaštitu zdravlja, sigurnost i zaštitu životne sredine (HSE) koji je dogovoren na sastanku izmedu ECFIA-a i HSE-a u Chesteru 26.9.1993. i koji je izraĐen za potrebe drugog medulaboratorijaskog eksperimenta i na osnovu tog eksperimenta (1., 2.). Ova mjerna metoda može se koristiti za opisivanje prečnika vlakana

materijala u rasutom stanju i proizvoda koji sadrže MMMF, ukljucujuci vatrostalna keramicka vlakna (RCF – Refractory Ceramic Fibres), umjetnuta staklena vlakna (MMVF – Man-Made Vitreous Fibres), kristalna i polikristalna vlakna.

Određivanje dužinom je nacin da se kompenzuje uticaj na podjelu prečnika zbog pucanja dugackih vlakana do kojega dolazi prilikom uzorkovanja i rukovanja materijalom. Za mjerenje podjele velicina prečnika MMMF koristi se geometrijska statistika (geometrijska sredina) buduci da se njihove podjele velicina obicno pribiližavaju log-normalnoj podjeli.

Mjerenje dužine i prečnika je zamoran i dugotrajan posao, ali ako se mjere samo vlakna koja dodiruju beskonacno tanku crtu u vidnom polju SEM-a, tada je vjerovatnoća da se odabere odredeno vlakno sodnosna dužini. Buduci da je pitanje dužine za potrebe odredivanja dužinom time riješeno, potrebno je samo izmjeriti prečnik i LWGMD-2SE se tada može izracunati na nacin kako je opisano.

1.2. Definicije

Čestica je predmet ciji je odnos dužine i širine manji od 3:1.

Vlakno je predmet ciji je odnos dužine i širine (odnos stranica) najmanje 3:1.

1.3. Podrucje primjene i ograničenja

Metoda je namijenjena proučavanju podjela prečnika kod srednjih prečnika od 0,5 µm do 6 µm. Veci se prečnici mogu mjeriti uz primjenu manjih SEM povećanja, ali se time povećavaju ograničenja metode kod finijih podjela vlakana, dok se u slučaju srednjih prečnika ispod 0,5 µm preporucuje mjerenje uz pomoc TEM (transmisijski elektronski mikroskop) mikroskopa.

1.4. Nacelo ispitne metode

Uzme se određeni broj reprezentativnih uzoraka iz jezgra mekane ploče ili slobodnih vlakana u rasutom stanju. Vlakna u rasutom stanju se skrate drobljenjem i reprezentativni poduzorak dispergira u vodi. Zatim se vade alikvoti i filtriraju kroz polikarbonatni filtar veličine pora 0,2 µm i pripreme za pregled pod skenirajucim elektronskim mikroskopom (SEM). Prečniki vlakana mjere se pod povećanjem × 10 000 ili vecim (1) metodom presijecanja linija da bi se dobila nepristrana procjena srednjeg prečnika. Izracuna se donji interval pouzdanosti 95 % (na osnovu jednostranog testa) tako da se dobije procjena najniže vrijednosti srednjega geometrijskog prečnika vlakana materijala.

1.5. Opis ispitne metode

1.5.1. Sigurnost/mjere opreza

Izlaganje ljudi lebdećim vlaknima treba svesti na najmanju moguću mjeru te kod rukovanja suvim vlaknima koristiti digestor ili komoru za rukovanje s rukavicama („glove box‖). Izloženost ljudi treba periodično provjeravati kako bi se utvrdila efikasnost zaštitnih mjera.

Kod rukovanja MMMF vlaknima treba nositi rukavice za jednokratnu upotrebu kako bi se umanjila iritacija kože i spriječila unakrsna kontaminacija.

1.5.2. Aparatura/oprema

- Presa i kalupi (10 MPa),
- Polikarbonatni filtri s kapilarnim porama veličine pora 0,2 μm (prečnik 25 mm),
- Membranski filtar od celuloznog estera veličine pora 5 μm, koji se koristi kao pomoćni filter,
- Stakleni uređaj za filtraciju (ili filtracioni sistemi za jednokratnu upotrebu) za filtre prečnika 25 mm (npr. stakleni komplet za mikroanalizu Milipore, tip XX10 025 00),
- Svježe destilovana voda, filtrirana kroz filtar veličine pora 0,2 μm radi uklanjanja mikroorganizama,
- Uređaj za naparivanje zlata ili zlata/paladija,
- Skenirajući mikroskop razlučivosti do 10 nm i povećanjem × 10 000,
- Razno: spatule, skalpelski nož tip 24, pinceta, SEM cjevčice, karbonsko ljepilo ili karbonska ljepljiva traka, koloidno srebro („silver dag‖),
- Ultrazvučna sonda ili stacionarno ultrazvučno kupatilo,
- Svrdlo za uzorkovanje jezgra ili svrdlo za plutu za uzimanje uzoraka iz MMMF ploča.

(1) Ova vrijednost povećanja odnosi se na vlakna od 3 μm, za vlakna od 6 μm možda je primjerenije koristiti povećanje × 5 000.

1.5.3. Ispitni postupak

1.5.3.1. Uzorkovanje

Za uzimanje uzoraka iz presjeka tvrdih ili mekanih vlaknastih ploča koristi se svrdlo za uzorkovanje jezgra ili svrdlo za plutu od 25 mm. Uzorci se uzimaju u jednolikim razmacima po širini ploče, ako se radi o pločama male dužine, ili nasumično, ako su rapoložive velike ploče. Ista se oprema može koristiti i za ekstrahovanje slučajnih uzoraka slobodnih vlakana. Po mogućnosti treba uzeti šest uzoraka kako bi se uzele u obzir prostorne varijacije unutar materijala.

Šest jezgrovanih uzoraka zdrobi se u kalupu prečnika 50 mm pod pritiskom od 10 MPa. Materijal se promiješa špatulom i ponovno staloži na 10 MPa. Materijal se zatim izvadi iz kalupa i čuva u cvrsto zatvorenoj staklenoj boci.

1.5.3.2. Priprema uzorka

Prema potrebi, vlakno treba ostaviti oko sat vremena u peći na temperaturi od 450 °C da bi se uklonilo organsko vezivo. Uzorak se podijeli na poduzorke postupkom cetvrtina („cone and quarter‖) (u komori za zaštitu od prašine). Mala se količina uzorka (< 0,5 g) špatulom doda u 100 ml svježe destilovane vode koja je profiltrirana kroz membranski filtar od 0,2 μm (mogu se koristiti i drugi izvori ultračiste vode ako se dokaže da su zadovoljavajućeg kvaliteta). Uzorak se dobro rasprši uz pomoć ultrazvučne sonde snage 100 W koja može da izazove kavitaciju. (Ako sonda nije raspoloživa, koristi se sljedeci postupak: uzorak protresti i okrenuti, ponavljajući postupak 30 sekundi – petminutna obrada u stolnoj ultrazvučnoj kupci – još 30 sekundi protresati i okretati). Čim se vlakno dispergira, izvadi se odredeni broj alikvota (npr. Tri alikvota od 3, 6 i 10 ml) pipetom širokoga grla (zapremine 2 – 5 ml). Svaki se alikvot filtrira pod vakuumom kroz polikarbonatni filtar
0,2 μm i pomoćni MEC filtar veličine pora 5 μm, koristeći stakleni filtar-lijevak s cilindricnim re. U lijevak se ulije oko 5 ml filtrirane destilovane vode i alikvot polako pipetira u vodu držeci vrh pipete ispod meniskusa. Pipetu i rezervoar treba zasniva to isprati nakon pipetiranja jer se tanka vlakna nakupljaju na površini. Filtar se oprezno ukloni i odvoji od pomoćnog filtra te stavi u posudu da se osuši.

Ljuljajućim pokretima odreže se jedna četvrtina ili jedna polovina dijela filtra s filtarskim talogom koristeci skalpel tipa 24. Odrezani se dio pažljivo pričvsti na SEM nosac („stub‖) pomoću karbonske ljepljive trake ili karbonskog ljepila. Koloidno srebro treba nanijeti na najmanje tri mjesta kako bi se poboljšao elektricni kontakt na rubovima filtra i nosača. Kad se ljepilo/koloidno srebro osuši, na površinu taloga se naparivanjem nanese cca 50 nm zlata ili zlato/paladija.

1.5.3.3. Kalibracija i rad SEM-a

1.5.3.3.1. Kalibracija

Kalibraciju SEM-a treba provjeriti najmanje jedanput nedeljno (u idealnom slučaju jedanput dnevno) pomoću ovjerene rešetke za kalibraciju. Kalibracija se provjerava u odnosu na odobreni standard; ako izmjerena vrijednost (SEM) nije u granicama ± 2 % odobrene vrijednosti, kalibraciju treba prilagoditi i ponovno provjeriti. Na ssupstancanom matriksu uzorka, SEM mora imati mogućnost razlaganja barem minimalnog vidljivog prečnika od 0,2 μm pri povećanju × 2 000.

1.5.3.3.2. Rad

SEM treba podesiti na povećanje od 10 000 (1) i osigurati uslove koji daju dobro razlaganje i prihvatljiv kvalitet slike pri malim brzinama skeniranja, npr. 5 sekundi po slici. Iako različiti uredaji mogu imati različite radne postavke, za najbolju vidljivost i razlaganje kod rada s materijalima relativno niske atomske mase uglavnom treba koristiti ubržavajuci napon od 5 – 10 keV i uredaj podesiti na malu veličinu tačke i kratku radnu udaljenost. Kad se sprovodi linearna traverza, treba koristiti nagib od 0° da bi se smanjila potreba za ponovnim fokusiranjem, a ako SEM ima eucentričnu fazu, treba koristiti eucentričnu radnu udaljenost. Može se koristiti i manje povećanje ako materijal ne sadrži mala vlakna (malog prečnika) i prečnici vlakana su veliki (> 5 μm).

1.5.3.4. Odredivanje veličine

1.5.3.4.1. Ocjenjivanje uzorka pregledom pod malim povećanjem

Na početku uzorak treba pregledati pod malim povećanjem da bi se otkrile eventualne naznake ssupstancaanja grudica velikih vlakana i procijenila gustina vlakana. U slučaju pretjeranog broja grudica, preporučljivo je pripremiti novi uzorak.Da bi se postigla statisticka tačnost, potrebno je izmjeriti određeni minimalni broj vlakana – velika gustina vlakana može se smatrati poželjnom osobinom jer pregledavanje praznih polja oduzima vrijeme, a ne daje nikakav doprinos analizi.
Medutim, ako je filtar preopterećen, teško se mjere sva mjerljiva vlakna, a neka se manja vlakna mogu i previdjeti ako su sakrivena iza velikih vlakana.

(1) Za vlakna od 3 μm, vidi prethodnu napomenu. Ako je gustina vlakana iznad 150 vlakana po milimetru linearne traverze, može se javiti pristranost u smislu previsoke procjene LWGMD. S druge strane, male koncentracije vlakana produžuju vrijeme analize i često je isplativije pripremiti uzorak čija je gustina vlakana bliža optimalnoj gustini nego nastaviti s brojenjem na filtrima s niskom koncentracijom. Kod optimalne gustine vlakana treba prosječno dobiti otprilike jedno do dva brojiva vlakna po vidnom polju pri povećanju od 5 000. Ipak, optimalna gustina zavisi od veličine (prečniku) vlakana; stoga se ispitivač u odredenoj mjeri mora osloniti na stručnu procjenu kako bi odlucio je li gustina vlakana približno optimalna ili nije.

1.5.3.4.2. Određivanje prečnika vlakana dužinom

Broje se samo vlakna koja dodiruju (ili sijeku) (beskonacno) tanku crtu na ekranu SEM-a. Stoga treba povuci vodoravnu (ili kosu) crtu kroz sredinu ekrana. Druga je mogućnost da se u sredinu ekrana stavi samo tacka i zapocne kontinuirano skeniranje u jednom smjeru preko filtra. Mjeri se i bilježi prečnik svakog odnosa prečnika većeg od 3:1 koje dodiruje ili sijece tu tačku.

1.5.3.4.3. Određivanje veličine vlakana

Preporučuje se da se izmjeri najmanje 300 vlakana. Svako se vlakno mjeri samo jedanput u tačci gdje sijece crtu ili tačku nacrtanu na slici (ili u blizini spresjeka ako su rubovi vlakna skriveni). Ako se naiĐe na vlakna neujednačenog presjeka, uzima se u obzir mjerenje koje predstavlja prosječni prečnik vlakna. Definisanje ruba i mjerenje najkraće udaljenosti izmedu rubova vlakna zahtijeva poseban oprez. Određivanje veličine može se sprovoditi direktno „on line‖ ili „off-line‖ na sačuvanim slikama odnosno fotografijama. Preporučuju se poluautomatski sistemi mjerenja slike koji podatke direktno učitavaju u tabelu, jer se tako štedi vrijeme i izbjegavaju greške u prepisu, a izracunavanje se može automatizovati. Krajeve dugačkih vlakana treba pregledati pod malim povećanjem da bi se provjerilo da ne idu unazad u vidno polje mjerenja i da ne bi bili izmjereni više puta.

2. Podaci

2.1. Obrada rezultata

Prečnici vlakana nemaju normalnu podjelu. Ipak, logaritamskom transformacijom može se dobiti približno normalna podjela. Izracunava se aritmetička sredina (srednji lnD) i standardna devijacija (SDlnD) vrijednosti logaritma po bazi e (lnD) n prečnika vlakana (D).

$$mean \ln D = \frac{\ln D}{n}$$

$$SD_{\ln D} = \sqrt{\frac{lnD - meanlnD\ ^2}{n-1}}$$

Standardna se devijacija podijeli kvadratnim korijenom broja mjerenja (n) da bi se dobila standardna greška (SElnD).

$$SE_{\ln D} = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

Da bi se dobila geometrijska sredina umanjena za dvije geometrijske standardne greške, dvostruka standardna greška oduzme se od srednje vrijednosti i izracunava eksponent te vrijednosti (srednja vrijednost minus dvije standardne greške).

$$LWGMD - 2SE = e^{\ mean\ lnD - 2SE_{lnD}}$$

3. Izvještavanje

Izvještaj o ispitivanju

Izvještajo ispitivanju sadrži informacije:

1) vrijednost LWGMD-2SE,
2) sva odstepena, a posebno ona koja imaju uticaja na preciznost ili tačnost rezultata, uz odgovarajuca obrazloženja.

A.23 KOEFICIJENT RAZDVAJANJA (1-OKTANOL/VODA)

1. Metoda sporog miješanja

1.1 Uvod

1. Ova je ispitna metoda ekvivalentna Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 123 (2006.). Vrijednosti koeficijenta razlaganja 1-oktanol/voda (POW) do log POW od 8,2 pažljivo se određuju metodom sporog miješanja (1). Stoga je to prikladan eksperimentalni pristup za direktno određivanje vrijednosti POW jako hidrofobnih supstanci.

2. Ostale metode za određivanje koeficijenta razdvajanja 1-oktanol/voda (POW) jesu metoda protresanjem „shake-flask‖ (2) i određivanje POW iz obrnute faze ponašanja pri retenciji kod visokoefikasne tečne hromatografije (HPLC) (3).

Metoda protresanjem sklona je ssupstancaanju artefakata zbog transfera mikro-kapljica oktanola u vodenoj fazi. S porastom vrijednosti POW prisutnost tih kapljica u vodenoj fazi dovodi do povećanja previsokih procjena koncentracije ispitivane supstanci u vodi. Stoga je njena primjena ograničena na supstanci kod kojih je log POW < 4. Druga metoda se bazira na pouzdanim podacima o direktno određenoj vrijednosti POW kako bi se odredio odnos između ponašanja pri zadržavanju kod HPLC-a i izmjerenih vrijednosti POW. Predlog smjernice OECD-a bio je dostupan za određivanje koeficijenta razdvajanja 1-oktanol/voda jonizirajućih supstanci (4), ali se više neće koristiti.

1. 2 Značenje i primjena

4. Za inertne organske supstance utvrĐeni su veoma značajni odnosi između koeficijenta razdvajanja 1-oktanol/voda (POW) i njihove bioakumulacije u ribama. Štoviše, pokazalo se da je POW u korelaciji s toksičnošću za ribe kao i sa sorpcijom hemikalija u čvrste supstance, poput taloga i sedimenata.

5. Utvrđene su razne vrste odnosa između koeficijenta razdvajanja 1-oktanol/voda i drugih svojstava supstanci relevantnih za toksičnost u životnu sredinu i hemiju. Kao posljedica toga, koeficijent razdvajanja 1-oktanol/voda razvio se u ključni parametar u procjeni opasnosti hemikalija po životnu sredinu, kao i u predviĐanju sudbine hemikalija u životnu sredinu.

1.3 Područje primjene

6. eksperiment sa sporim miješanjem zamišljen je kako bi se smanjilo stvaranje mikrokapljica iz kapljica 1-oktanola u vodenoj fazi. Kao posljedica toga, nema previsoke procjene koncentracije u vodenom rastvoru zbog molekula ispitivane supstance povezanih s tim kapljicama. Stoga je metoda sporog miješanja posebno prikladna za određivanje POW za supstanci očekivanih log POW vrijednosti od 5 i većih, za koje se metodom protresanja (2) često dobijaju pogrešni rezultati.

1.4 Definicija i jedinice

7. Koeficijent razdvajanja supstanci između vode i lipofilnog rastvora (1-oktanola) karakteriše uravnoteženu raspodjelu hemikalije između dviju faza. Koeficijent razdvajanja između vode i 1oktanola (POW) definiše se kao odnos uravnoteženih koncentracija ispitivane supstance u 1oktanolu zasićenom vodom (CO) i vodi zasićenoj 1-oktanolom (CW).

$$P_{ow} = \frac{C_o}{C_w}$$

Budući da je riječ o odnosu koncentracija, koeficijent razdvajanja nema dimenzija. Najčešće se navodi kao logaritam s bazom 10 (log POW). P_{OW} zavisi od temperature, a podaci iz izvještaja trebaju uključivati temperaturu mjerenja.

1.5 Načelo metode

Kako bi se odredio koeficijent razdvajanja, voda, 1-oktanol i ispitivana supstanca uravnotežuju se jedni s drugima na konstantnoj temperaturi. Zatim se određuju koncentracije ispitivane supstance u dvjema fazama.

Poteškoće u eksperimentu povezane su sa nastankom mikro-kapljica tokom eksperimenta s protresanjem mogu se smanjiti u (ovdje) predloženom eksperimentu sa sporim miješanjem. U eksperimentu sa sporim miješanjem voda, 1-oktanol i ispitivana supstanca uravnotežuju se u termostatiranom reaktoru za miješanje. Izmjena faza ubrzava se miješanjem. Miješanje uvodi ograničenu turbulenciju koja pospješuje razmjenu između 1-oktanola i vode bez mikro-kapljica (1).

1.6 Primjenjivost testa

Budući da bi prisutnost drugih supstanci osim ispitivane supstance može uticati na koeficijent aktivnosti ispitivane supstanci, ispitivanu supstancu treba ispitivati kao čistu supstancu. Za eksperiment sa razdvajanjem 1-oktanol/vode treba upotrijebiti najviši stepen čistoće koji se može nabaviti. Ova se metoda primjenjuje na čiste supstance koje se ne disociraju ili asociraju i koje ne pokazuju značajnu interfacijalnu aktivnost. Može se primijeniti za određivanje odnosa razdvajanja 1-oktanol/vode takvih supstanci i smješa. Ako se metoda primjenjuje za smješe, određeni odnosi razdvajanja 1-oktanol/vode uslovljeni su i zavise od hemijskog sastava ispitivane smješe te o sastavu elektrolita upotrijebljenih kao vodena faza. Ako se preduzmu dodatni koraci, metoda se takođe može primijeniti za disocijativna ili asocijativna jedinjenja.

Zbog višestrukog uravnoteženja vode i 1-oktanola u dijeljenju 1-oktanol/vode disocijativnih supstanci, kao što su organske kiseline i fenoli, organske lužine i organometalne supstance, odnos razdvajanja 1-oktanol/vode uslovljen je konstantom koja zavisi od sastava elektrolita, stoga je za određivanje odnosa razdvajanja 1-oktanol/vode nužno da se tokom eksperimenta kontroliše pH vrijednost i sastav elektrolita te da se unesu u izvještaj. Za ocjenu tih odnosa razdvajanja treba pribaviti stručno mišljenje. Uz primjenu vrijednosti konstante/i disocijacije treba odabrati pH vrijednosti, takve da se za svako stanje jonizacije odredi odnos razdvajanja. Kada se ispituju organometalna jedinjenja potrebljavaju se nekompleksirajući puferi. Uzimajući u obzir postojeće znanje o hemiji voda (konstante kompleksacije, konstante disocijacije), uslovi eksperimenta se biraju tako da se može procijeniti specijacija ispitivane supstance u vodenoj fazi. Jonska jačina je jednaka u svim eksperimentima zbog primjene pozadinskog elektrolita.

Poteškoće u ispitivanju mogu se pojaviti u sprovođenju ispitivanja supstanci niske rastvorljivosti u vodi ili visokog P_{OW} zbog činjenice da su koncentracije u vodi postale toliko niske da ih je teško precizno odrediti. Ova ispitna metoda pruža uputstva o rješavanju tog problema.

Informacije o ispitivanoj supstanci

Hemijski reagensi su čistoće analitičkog stepena ili veće. Primjenjuje se neoznačena ispitna supstanca poznatog hemijskog sastava i čistoće od najmanje 99 % ili radioaktivno označenih ispitivanih supstanci poznatog hemijskog sastava i radio-hemijske čistoće. U slučaju obilježivača s kratkim vremenom poluraspada primjenjuju se korekcije za raspadanje. U slučaju radioaktivno označenih ispitivanih supstanci primjenjuju se analitičke metode specifične za tu hemikaliju kako bi se osiguralo da je izmjerena radioaktivnost direktno povezana s ispitivanom supstancom.

Procijenjeni log POW može se dobiti primjenom komercijalno dostupnog softvera za procjenu log POW ili primjenom odnosa rastvorivosti u oba rastvora.

Prije sprovođenja eksperimenta sa sporim miješanjem za određivanje POW dostupne su informacije o ispitivanoj supstanci:

1) strukturna formula;
2) analitičke metode određivanja koncentracije supstanci u vodi i 1-oktanolu;
3) konstanta/e disocijacije jonizirajućih supstanci (Smjernica OECD-a 112 (9));
4) rastvorivost u vodenom rastvoru;
5) abiotička hidroliza;
6) laka biorazgradivost;
7) napon pare.

1.6 Opis metode

Oprema i aparatura

Potrebna je standardna laboratorijaska oprema:

- za miješanje vodene faze koriste se magnetne miješalice i magnetni štapići za miješanje premazani teflonom,
- analitički instrumenti prikladni za određivanje koncentracije ispitivane supstance u slučaju očekivanih koncentracija,
- posuda za miješanje sa slavinom na dnu.

U zavisnosti od procijenjenog log POW i granici detekcije (LOD) ispitivanog jedinjenjea u obzir valja uzeti primjenu reakcione posude jednake geometrije, veće od jedne litre kako bi se dobio dovoljan volumen vode za hemijsku ekstrakciju i analizu. To će rezultirati višim koncentracijama u vodenom ekstraktu te tako pouzdanijim analitičkim određivanjem. Tabela s procjenama minimalnog potrebnog volumena, LOD-a jedinjenjea, njegova procijenjenog log POW i njegove rastvorivosti u vodi nalazi se u Dodatku 1. Tabela se bazira na odnosu log POW i odnosa rastvorivosti u oktanolu i vodi:

$$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}41$$

Gdje je:

$$SR = \frac{S_{oct}}{S_w}$$

Vrijednosti rastvorivosti u vodi izračunate jednačinom su prva procjena. Korisnik može izraditi procjenu rastvorivosti u vodi pomoću svih odnosa za koje smatra da bolje predstavljaju odnos između hidrofobnosti i rastvorivosti. Za čvrsta jedinjenja uključuje se tačka topljenja u predviĐanje rastvorivosti. U slučaju primjene izmijenjene jednačine obezbjeĐuje se jednačina za iizračunavanje rastvorivosti u oktanolu. Shematski prikaz posude za miješanje obložene staklom volumena od oko jedne litre nalazi se u Dodatku 2. Proporcije posude prikazane u Dodatku 2. pokazale su se povoljnima i valja ih se pridržavati u slučaju primjene aparature drukčije veličine, ključno je sredstvo za održavanje temperature konstantnom tokom eksperimenta sa sporim miješanjem. Posude moraju biti izraĐene od inertnog materijala da adsorpcija na površinu posude bude zanemariva.

Priprema ispitnih rastvora

Određivanje POW se vrši sa 1-oktanolom najviše čistoće koja se komercijalno može nabaviti (najmanje + 99 %). Preporučuje se pročišćavanje 1-oktanola ekstrakcijom kiselinom, lužinom i vodom te sušenjem nakon toga. Uz to se 1-oktanol može pročistiti i destilacijom. Pročišćeni 1oktanol treba upotrijebiti za pripremu standardnih rastvora ispitivanih supstanci. Voda za upotrebu pri odreĐivanju POW treba biti destilovana u aparaturi od stakla ili kvarca ili dobijena sistemom prečišćavanja, a može se upotrijebiti i voda stepena čistoće HPLC. Za destilovanu vodu potrebna je filtracija kroz filtar od 0,22 μm, a treba uključiti i slijepe probe kako bi se provjerilo da u koncentriranim ekstraktima koji mogu uticati na ispitivanu supstanca nema nečistoća. U slučaju primjene filtra od staklenih vlakana, filtar treba čistiti pečenjem najmanje tri sata na 400 °C.

Oba se rastvora prije eksperimenta uzajamno zasićuju uravnoteženjem u posudi dovoljne veličine. To se obavlja tokom dva dana pomoću dvofaznog sistema za sporo miješanje.

Izbora se prikladna koncentracija ispitivane supstance i rastvara se u 1-oktanolu (zasićenom vodom). Koeficijent razdvajanja 1-oktanol/vode održuje se u razrijeđenim rastvorama 1-oktanola i vode. Stoga koncentracija ispitivane supstance ne bi smjela preći 70 % njene rastvorivosti s maksimalnom koncentracijom od 0,1 M u bilo kojoj fazi (1). Rastvori 1-oktanola upotrijebljeni u eksperimentu ne smiju sadržavati rastvorene čvrste ispitivane supstanci.

Prikladna količina ispitivane supstance rastvara se u 1-oktanolu (zasićenom vodom). Ako procijenjeni log POW preĐe pet, treba se pobrinuti da rastvori 1-oktanola upotrijebljene za eksperiment ne sadrži rastvorene čvrste ispitivane supstance. S tim ciljem primjenjuje se sljedeći postupak za hemikalije čija je procijenjena vrijednost log POW > 5:

- ispitivana supstanca rastvara se u 1-oktanolu (zasićenom vodom), rastvoru se
- ostavi dovoljno vremena da se rastvorena čvrsta supstanca istaloži.

Tokom perioda taloženja nadzire se koncentracija ispitivane supstance,

— kada izmjerene koncentracije rastvora 1-oktanola postignu stabilne vrijednosti, radni rastvor razrjeĐuje se odgovarajućim volumenom 1- oktanola,

— mjeri se koncentracija razrijeđenog radnog rastvora. Ako se izmjerena koncentracija podudara s razrjeĐenjem, razrijeđen radni rastvor može se upotrijebiti u eksperimentu sa sporim miješanjem.

1.7 Uzimanje i analiza uzoraka

Za analizu ispitivane supstance treba upotrijebiti provjerenu analitičku metodu. Istraživači moraju pružiti dokaz da su koncentracije u 1-oktanolu zasićenom vodom kao i u vodenoj fazi zasićenoj 1oktanolom tokom eksperimenta veće od granice kvantifikacije korištenih analitičkih postupaka u toj metodi. U slučajevima u kojima su potrebne metode ekstrakcije prije eksperimenta potrebno je uspostaviti analitičke rekuperacije ispitivane supstance iz vodene faze i faze 1-oktanola. Analitičke signale treba korigovati slijepim probama i treba voditi računa da se ne dogodi prenošenje analizirane supstanci iz jednog uzorka u drugi.

Vjerovatno će prije analize biti potrebna ekstrakcija u vodenoj fazi organskim rastvorom i prethodnom koncentracijom ekstrakta zbog relativno niskih koncentracija hidrofobnih ispitivanih supstanci u vodenoj fazi. Iz istog razloga potrebno je smanjiti eventualne koncentracije u slijepim probama. Stoga je potrebno upotrebljavati rastvor visoke čistoće, po mogućnosti rastvor za analizu ostataka. Rad sa staklenom opremom koja je prethodno pažljivo očišćena (npr. pranjem rastvorom ili pečenjem na povišenoj temperaturi) može pomoći pri izbjegavanju unakrsne kontaminacije.

Procijenjeni log POW može se dobiti pomoću programa za procjenu ili stručnom procjenom. Ako je vrijednost veća od šest, treba pobliže nadzirati korekcije slijepih proba i prenošenje analizirane supstance. Slično tome, ako procijenjeni log POW prekoračuje šest, obvezna je primjena surogatnog standarda za korekciju rekuperacije kako bi se postigli visoki faktori prethodne koncentracije. Komercijalno su dostupni brojni softverski programi za procjenu log POW (1), npr. Clog P, KOWWIN, ProLogP i ACD log P.

Granice kvantifkacije (LOQ) za određivanje ispitivane supstance u 1-oktanolu i vodi određuju se primjenom prihvaćenih metoda. Kao zlatno pravilo, granica kvantifikacije ove metode može se odrediti kao koncentracija u vodi ili 1-oktanolu koja proizvodi odnos signala i šuma jednak deset. Valja odabrati metodu ekstrakcije i prethodne koncentracije, a također treba navesti i analitičke rekuperacije. Izbora se prikladan faktor prethodne koncentracije kako bi se dobio signal željene veličine nakon analitičkog određivanja.

Na osnovu parametara analitičke metode i očekivanih koncentracija određuje se približna veličina uzorka potrebna za precizno određivanje koncentracije jedinjenja. Treba izbjegavati primjenu uzoraka vode koji su premali za dobijanje dovoljnog analitičkog signala. Također valja izbjegavati primjenu velikih uzoraka vode jer bi u protivnom moglo preostati premalo vode za minimalni broj traženih analiza (n = 5).

Minimalni volumen uzorka izražen je kao funkcija volumena posude, LODa ispitivane supstanci i rastvorivosti ispitivane supstanci.

Kvantifikacija ispitivanih supstanci odvija se upoređivanjem sa kalibracionim krivama odgovarajućeg jedinjenja. Koncentracije u analiziranim uzorcima moraju se tačno odrediti pomoću koncentracija standarda.

Za ispitivane supstance s procijenjenom vrijednošću log POW višom od šest surogatni standard valja ubaciti u uzorak vode prije ekstrakcije kako bi se utvrdili gubici tokom ekstrakcije i prethodne koncentracije uzoraka vode.

Za preciznu korekciju rekuperacije surogati moraju imati svojstva vrlo slična ili identična svojstvima ispitivane supstance. Po mogućnosti se u tu svrhu upotrebljavaju (stabilne) izrastvorično označene analogne supstance od interesa (pr. perdeuterirane ili označene s

13C). Ako nije moguće upotrijebiti označene stabilne izotope, npr. 13C ili 2H, iz pouzdanih podataka treba dokazati da su fizičko-hemijska svojstva surogata vrlo slična svojstvima ispitivane supstance. Tokom ekstrakcije tečno-tečno vodene faze mogu nastati emulzije. Emulzije se mogu smanjiti dodavanjem soli i puštanjem emulzije da se preko noći istaloži. Treba navesti metode koje su se koristile za ekstrakciju i prethodnu koncentraciju uzoraka.

Ako je potrebno, uzorci uzeti iz faze 1-oktanola mogu se prije analize razrijediti prikladnim rastvorom. Štoviše, primjena surogatnih standarda za korekciju rekuperacije preporučuje se za supstance za koje su eksperimenti rekuperacije pokazali visok stepen varijacije u eksperimentima rekuperacije (relativna standardna devijacija > 10 %).

Navode se i pojedinosti analitičke metode, koje obuhvataju metodu ekstrakcije, prethodne koncentracije i faktore razrjeĐivanja, parametre instrumenata, rutinu kalibriranja, raspon kalibriranja, analitičku rekuperaciju ispitivane supstance iz vode, dodavanje surogatnih standarda radi korekcije rekuperacije, vrijednosti slijepih proba, granice detekcije i granice kvantifikacije.

Ssprovođenje ispitivanja

Optimalni odnosi volumena 1-oktanola i vode

Pri izboru volumena vode i 1-oktanola u obzir valja uzeti LOQ u 1-oktanolu i vodi, faktore prethodne koncentracije primijenjene na uzorke vode, količine uzorkovane u 1-oktanolu i vodi te očekivane koncentracije. Zbog razloga vezanih uz eksperiment količinu 1-oktanola u sistemu za sporo miješanje treba odabrati tako da je sloj 1-oktanola dovoljne debljine (> 0,5 cm) kako bi se omogućilo uzorkovanje faze 1-oktanola bez njegovog miješanja.

Tipični odnosi faza koji se koriste za određivanje jedinjenja s log POW od 4,5 i višim iznose 20 do 50 ml 1-oktanola i 950 do 980 ml vode u posudi od jedne litre.

Uslovi ispitivanja

Tokom ispitivanja reakciona posuda temperatura se kako bi se variranje temperature smanjilo na ispod 1 °C. Analizu treba ssprovesti na 25 °C.

Sistem eksperimenta treba zaštititi od daljeg svjetla bilo sprovođenjem eksperimenta u mračnoj prostoriji bilo pokrivanjem reakcione posude aluminijskom folijom.

Eksperiment treba ssprovesti u životnoj sredini bez prašine (koliko je to moguće).

Sistem 1-oktanola i vode miješa se dok se ne postigne ravnoteža. U pilotskom eksperimentu trajanje perioda uravnoteženja određuje se sprovođenjem eksperimenta sa sporim miješanjem i periodičnim uzorkovanjem vode i 1-oktanola.

Trenutke uzorkovanja treba rasporediti tokom minimalnog perioda od pet sati.

Svako određivanje POW treba obaviti primjenom najmanje triju nezavisnih eksperimenta sa sporim miješanjem.

Određivanje trajanja uravnoteženja

Pretpostavlja se da se ravnoteža postigla kad regresija odnosa koncentracije 1-oktanola i vode u zavisnosti od vremena tokom vremenskog perioda od četiri vremenske tačke rezultira nagibom koji se znatno ne razlikuje od nule na p-nivou od 0,05. Minimalno trajanje uravnoteženja iznosi jedan dan prije početka uzorkovanja. Kao zlatno pravilo, uzorkovanje supstanci čiji je procijenjeni log POW manji od pet može se obaviti tokom drugog i trećeg dana. Uravnoteženje će se možda produžiti za više hidrofobnih jedinjenja. Za jedinjenje čiji je log POW 8,23 (dekahlorobifenil) za uravnoteženje su bila dovoljna 144 sata. Uravnoteženje se ocjenjuje ponovljenim uzorkovanjem iz jedne posude.

Početak eksperimenta

Na početku eksperimenta reakciona posuda puni se vodom zasićenom 1-oktanolom. Treba omogućiti dovoljno vremena za postizanje temperature određene termostatom.

Željena količina ispitivane supstance (rastvorene u potrebnom volumenu 1-oktanola zasićenog vodom) pažljivo se dodaje u reakcionu posudu. Ovo je ključni korak u eksperimentu jer treba izbjeći turbulentno miješanje dviju faza. Stoga se faza 1-oktanola može polako pipetirati uz zid eksperimentne posude, blizu površine vode. Kasnije će teći niz stakleni zid i stvoriti film iznad vodene faze. Uvijek treba izbjegavati dekantiranje 1-oktanola direktno. Kapljice 1-oktanola ne smiju pasti direktno u vodu.

Kad se započne s miješanjem, treba ga postupno ubrzavati. Ako se motori za miješanje ne mogu prikladno ugoditi, treba razmisliti o primjeni druge supstance. Brzinu miješanja treba ugoditi tako da se na kontaktu vode i 1-oktanola stvori vrtlog dubine od 0,5 do maksimalno 2,5 cm. Brzinu miješanja treba smanjiti ako je dubina vrtloga veća od 2,5 cm. U protivnom bi se mogle stvoriti mikro-kapljice iz kapljica 1-oktanola u vodenoj fazi, što bi dovelo do previsoke procjene koncentracije ispitivane supstanci u vodi. Maksimalna brzina miješanja od 2,5 cm preporučuje se na osnovu validacione studije s prstenastim testovima. Riječ je o kompromisu između postizanja velike brzine uravnoteženja, ujedno uz ograničavanje formiranja mikro-kapljica 1-oktanola.

Uzorkovanje i obrada uzoraka

Prije uzorkovanja treba isključiti miješalicu i pustiti da se tečnosti prestanu talasati. Po završetku uzorkovanja miješalica se ponovno polako pokreće, kao što je gore opisano, a brzina miješanja postupno se povećava.

Vodena faza uzorkuje se iz ventila na dnu reakcione posude. Baca se volumen vode koji se nalazi u čepovima (otprilike 5 ml u posudi prikazanoj u Dodatku 2.). Voda u čepovima ne miješa se te stoga nije uravnotežena s ostatkom. Zabilježite volumen uzoraka vode i osigurajte da se pri iizračunavanju bilansa mase u obzir uzme i količina ispitivane supstance u bačenoj vodi. Gubici radi isparavanja moraju se svesti na minimum na način da se pusti da voda mirno teče u lijevak za odvajanje tako da se ne uznemiruje sloj vode/1-oktanola.

Uzorci 1-oktanola dobijaju se uzimanjem malog alikvota (oko 100 µl) iz sloja 1-oktanola pomoću štrcaljke od stakla i metala od 100 mikrolitara. Pazljivo raditi kako se ne bi uznemirila granica. Zabilježiti volumen uzorkovane tečnosti. Dovoljan je mali alikvot jer će se uzorak 1-oktanola razrijedi.

Treba izbjegavati nepotrebne korake prenosa uzoraka. Stoga volumen uzorka treba odrediti gravimetrijski. U slučaju uzoraka vode to se može postići skupljanjem uzorka vode u lijevak za odvajanje koji već sadržava potreban volumen rastvora.

Podaci i izvještavanje

Prema ovoj ispitnoj metodi POW se određuje sprovođenjem triju eksperimenta sa sporim miješanjem (triju eksperimentalnih jedinica) predmetnog jedinjenjea uz primjenu identičnih uslova. Regresija primijenjena za pokazivanje stečenog uravnoteženja treba da se bazira na rezultatima najmanje četiri određivanja CO/CW u uzastopnim vremenskim tačkama. To omogućava iizračunavanje varijance kao mjere nesigurnosti prosječne vrijednosti dobijene u svakoj eksperimentnoj jedinici.

POW se može okarakterisati varijancom podataka dobijenih za svaku eksperimentnu jedinicu. Taj se podatak upotrebljava za iizračunavanje POW kao ponderisanog prosjeka rezultata individualnih eksperimentalnih jedinica. Za to se kao faktor ponderisanja upotrebljava obrnuta varijanca rezultata eksperimentalnih jedinica.

Kao rezultat toga, podaci sa velikim odstepenem (izraženim kao varijanca) te time i s manjom pouzdanošću manje utiču na rezultat od podataka s niskom varijancom.

Analogno tome iizračunava se ponderisana standardna devijacija. Ona karakteriše ponavljanje mjerenja POW. Niska vrijednost ponderisane standardne devijacije ukazuje na to da je određivanje POW često ponavljano u jednoj laboratorijai. U nastavku slijedi pregled formalne statističke obrade podataka.

Obrada podataka

Prikaz stečenog stanja ravnoteže

Logaritam odnosa koncentracije ispitivane supstancei u 1-oktanolu i vodi (log (CO/Cw)) iizračunava se za svako vrijeme uzorkovanja. Postizanje hemijske ravnoteže prikazuje se grafičkim prikazom tog odnosa u zavisnosti od vremena. Plato u tom grafikonu bazira se na najmanje četiri uzastopne vremenske tačke pokazuje da je postignuta ravnoteža i da je jedinjenje rastvoreno u 1-oktanolu. Ako to nije slučaj, ispitivanje treba nastaviti sve dok četiri uzastopne vremenske tačke ne daju nagib koji se ne razlikuje značajno od 0 na p-nivou od 0,05, pokazujući da log Co/Cw ne zavisi o vremenu.

Iizračunavanje log POW-

Vrijednost log POW eksperimentne jedinice iizračunava se kao ponderisana prosječna vrijednost log Co/Cw za dio krive log Co/Cw u zavisnosti od vremena za koji se pokazuje ravnoteža. Ponderisani prosjek iizračunava se ponderisanjem podataka s obrnutom vrijednošću varijance tako da uticaj podataka na konačni rezultat bude obrnuto proporcionalan nesigurnosti podataka.

Prosječni log POW

Prosječna vrijednost log POW iz različitih eksperimentalnih jedinica iizračunava se kao prosjek rezultata pojedinačnih eksperimentalnih jedinica ponderisan njihovim odgovarajućim varijancama.

To se iizračunava na sljedeći način:

$$\log P_{ow,A_v} = \quad w_i \times logP_{ow,i} \quad \times \quad w_i^{-1}$$

gdje je log POW,i = vrijednost log POW pojedinačne eksperimentne jedinice i; log POW,Av =

ponderisana prosječna vrijednost određivanja pojedinačnog POW wi = statistički ponder

dodijeljen vrijednosti log POW eksperimentne jedinice i.

Recipročna vrijednost varijance log POW,i upotrebljava se kao:

$$w_i = var \ \ logP_{ow,i}^{\ -1}$$

Greška u prosjeku vrijednosti log POW procjenjuje se kao ponovljivost log Co/Cw određena tokom faze ravnoteže u pojedinačnim eksperimentalnim jedinicama. Izražena je kao ponderisana standardna devijacija vrijednosti log POW,Av (σlogPow,Av) koja je mjera greške povezane s log POW,Av.

Ponderisana standardna devijacija može se izračunati iz ponderirane varijance varlog Pow,Av na sljedeći način:

$$var_{log,Pow,Av} = \quad w_i \times \ logP_{ow,i} - logP_{ow,Av}^{\ \ 2} \times \quad w_i \times \ n-1^{\ -1}$$

$$\sigma_{log,Pow,Av} = \ var_{logPow,Av}^{\ \ 0,5}$$

Simbol n predstavlja broj eksperimentalnih jedinica.

Izvještaj o ispitivanju

U izvještaju o ispitivanju treba navesti sljedeće informacije:

Ispitivana supstanca:

- trivijalni naziv, hemijski naziv, CAS broj, strukturna formula (koja navodi položaj oznake ako se upotrebljava radioaktivno označena supstanca) te relevantna fizičko hemijska svojstva,
- čistoća (nečistoće) ispitivane supstanci, čistoća oznake označenih hemikalija i
- molarna aktivnost (po potrebi), preliminarna procjena vrijednosti log Pow kao i
- metoda korištena za dobijanje te vrijednosti.

Uslovi ispitivanja:

- datumi sprovođenja ispitivanja, temperatura tokom eksperimenta,
- volumeni 1-oktanola i vode na početku ispitivanja, volumeni uzorkovanog 1-
- oktanola i vode,
- volumeni 1-oktanola i vode preostali u ispitnim posudama,
- opis ispitnih posuda i uslova miješanja (geometrija štapića za miješanje i
- ispitne posude, visina vrtloga u mm te, ako je dostupna, brzina miješanja),

- analitičke metode primijenjene za određivanje ispitivane supstanci i granica kvantifikacije metode,

- vremena uzorkovanja,
- pH vodene faze i korišteni puferi ako je pH prilagođen za jonizirajuće molekule,
- broj određivanja.

Rezultati:

- ponovljivost i osjetljivost korištenih analitičkih metoda,
- određene koncentracije ispitivane supstanci u 1-oktanolu i vodi kao funkcija vremena, prikaz bilance mase,
- temperatura i standardna devijacija ili raspon temperature tokom eksperimenta, regresija odnosa koncentracije u zavisnosti od vremena, prosječna vrijednost log Pow,Av i njena standardna pogreška, rasprava i tumačenje rezultata,
- primjeri neobrađenih podataka, brojke reprezentativne analize (svi neobrađeni podaci moraju se čuvati u skladu s GLP standardima), uključujući rekuperaciju surogata te broj nivoa upotrijebljenih pri kalibrisanju (zajedno s kriterijumima za koeficijent korelacije

kalibracione krive) i rezultati osiguranja kvaliteta/kontrole kvaliteta (QA/QC),

- ako je dostupno: izvjetaj o potvrđivanju postupka analize (treba navesti među referencama) sa inertnim materijalom.

A.24. KOEFICIJENT RASPODJELE (N-OKTANOL/VODA), METODA TEČNE HROMATOGRAFIJE VISOKIH PERFORMANSI (HPLC)

1. Uvod

Ova metoda ispitivanja ekvivalentna je smjernici OECD-a za ispitivanje (TG) 117 (2004)

. Koeficijent raspodjele (P) definisan je kao odnos ravnotežnih koncentracija rastvorene supstance u dvofaznom sistemu koji se sastoji od dva koja nije moguće miješati. U slučaju noktanola i vode,

$$P_{ow} = \frac{c_n - oktanol}{C_{voda}}$$

Pošto je koeficijent raspodjele količnik dvije koncentracije, on nema dimenzija i navodi se u obliku svog logaritma za osnovu deset.

P_{ow} je ključni parametar u studijama životnog ciklusa hemijskih supstanci u životnoj sredini. Utvrđen je značajan odnos između P_{ow} nejonizovanog oblika supstanci i njihove bioakumulacije u ribama. Također je pokazano da je P_{ow} koristan parametar u predviđanju adsorpcije u zemljište i sedimente i za utvrđivanje kvantitativnih odnosa strukture i aktivnosti za širok spektar bioloških efekata.

Početna razmatranja

Vrijednosti log P_{ow} u rasponu – 2 do 4 (povremeno do 5 i više) se eksperimentalno određuju uz pomoć metode mućkanja u staklenom balonu (poglavlje A.8 ovog aneksa, smjernica OECD-a za ispitivanje 107). Metoda HPLC obuhvata log P_{ow} u rasponu od 0 do 6. Ta metoda može zahtijevati procjenu P_{ow} radi dodjeljivanja odgovarajućih referentnih supstanci i da bi se potkrijepili svi eventualni zaključci izvedeni iz podataka dobijenih ispitivanjem.

Metode proračuna ukratko su razmotrene u dodatku uz tu metodu ispitivanja. Način funkcionisanja metode HPLC je izokratski.

Vrijednosti P_{ow} zavise od uslova u životnoj sredini kao što su temperatura, pH, jonska snaga i tako dalje, pri čemu te uslove treba utvrditi u eksperimentu radi ispravnog tumačenja podataka o P_{ow}. Za supstance koje se mogu jonizovati može postati dostupna i može se koristiti druga metoda kao alternativna (npr. nacrt smjernice OECD-a o pH metrijskoj metodi za jonizovane supstance (6)).
Iako ovaj nacrt smjernice OECD-a može biti pogodan za određivanje P_{ow} za one supstance koje se mogu jonizovati, u nekim slučajevima prikladnije je koristiti metodu HPLC pri pH vrijednosti koja je relevantna za životnu sredinu.

Načelo metode

HPLC obrnutih faza vrši se u analitičkim kolonama ispunjenim komercijalno dostupnom čvrstom fazom koja sadrži duge ugljovodonične lance (npr. C8, C18) hemijski vezane za silicijum dioksid. Hemikalija ubrizgana u tu kolonu vrši razdvajanje mobilne faze rastvaraća i ugljovodonične stacionarne faze na putu niz kolonu prenošena mobilnom fazom. Supstance se zadržavaju sodnosno koeficijentu raspodjele ugljovodonik-voda, pri čemu hidrofilne supstance eluiraju prve, a lipofilne posljednje. Vrijeme zadržavanja opisano je faktorom kapaciteta k koji se izražavao kao:

$$k = \frac{t_{r-}t_o}{t_o}$$

gdje je t_R vrijeme zadržavanja supstance koja se ispituje, a t_0 mrtvo vrijeme, tj. prosječno vrijeme potrebno da molekul rastvarača prođe kroz kolonu. Kvantitativne analitičke metode nijesu potrebne, a neophodno je samo odrediti vremena zadržavanja. Primjena gornje granice proizilazi iz potrebe da se postigne faza potpune separacije nakon prilagoĐavanja ravnoteže raspodjele i prije uzimanja uzoraka za analitička određivanja. Uz naročitu pažnju, gornja granica se može podići na veće vrijednosti P_{ow}

Koeficijent raspodjele oktanol/voda supstance koja se ispituje može se izračunati eksperimentalnim određivanjem njenog faktora kapaciteta k, koji se zatim unosi u sljedeću jednačinu:

$logP_w = a + b \times logk$ gdje su, a, b koeficijenti linearne regresije.

Navedena jednačina može se dobiti linearnom regresijom logaritma koeficijenata raspodjele oktanol/voda referentnih supstanci u odnosu na logaritam faktora kapaciteta referentnih supstanci.

Metoda HPLC obrnutih faza omogućava vršenje procjene koeficijenata raspodjele u rasponu log Pow od 0 do 6, ali se taj raspon može proširiti tako da u izuzetnim slučajevima obuhvata raspon log P_{ow} od 6 do 10. To može iziskivati modifikovanje mobilne faze. Ova metoda nije primjenljiva na jake kiseline i baze, složena jedinjenja metala, supstance koje reaguju s eluentom, niti na površinski aktivne agense. Mjerenja se mogu vršiti na supstancama koje se mogu jonizovati kada su u svom nejonizovanom obliku (slobodna

kiselina ili slobodna baza), jedino upotrebom odgovarajućeg pufera čija je pH vrijednost ispod pKa ako se radi o slobodnoj kiselini, odnosno iznad pKa ako se radi o slobodnoj bazi. Alternativno, pH-metrijska metoda ispitivanja supstanci koje se mogu jonizovati (6) može postati dostupna i može se koristiti kao alternativna metoda. Ako je vrijednost log P_{ow} određena radi korišćenja za klasifikaciju ekoloških opasnosti ili procjenu ekoloških rizika, ispitivanje treba vršiti u rasponu pH vrijednosti koji je relevantnan za prirodno očvrstenje, tj. u rasponu pH vrijednosti od 5,0 do 9.

U nekim slučajevima nečistoće mogu otežati tumačenje rezultata jer nije moguće sa sigurnošću odediti pikove. Za smješe koje daju nejasan opseg potrebno je navesti gornje i donje granice log
P_{ow}, kao i procenat površine svakog pika vrijednosti log P_{ow}. Za smješe koje su grupa homologa potrebno je navesti i prosječnu ponderisanu vrijednost log P_{ow}, izračunatu na osnovu pojedinačnih vrijednosti P_{ow} i odgovarajućih vrijednosti procenta površine. U proračunu treba uzeti u obzir sve pikove koji predstavljaju 5% ili više ukupne površine svih pikova:

$$ponderisani\ prosječnog\ P_{ow} = \frac{{}_{i}\ logP_{owi}\quad površina\ \%}{ukupna\ površina\ svih\ pikova\ \%} = \frac{logP_{owi}\quad površina\ \%}{{}_{i}\ pvršina\ \%}$$

Ponderisana prosječna vrijednost log P_{ow} validna je samo za supstance ili smješe koje se sastoje od homologa (npr. niz alkana). Smješe se mogu mjeriti tako da se dobiju smisleni rezultati pod uslovom da korišćeni analitički detektor ima istu osjetljivost na sve supstance u smješi i da se one mogu na odgovarajući način rastvoriti.

Informacije o supstanci koja se ispituje

Prije upotrebe metode potrebno je da budu poznati konstanta disocijacije, strukturna formula i rastvorljivost u mobilnoj fazi. Uz to, potrebne su informacije o hidrolizi.

Kriterijumi kvaliteta

Radi veće pouzdanosti vrše se dvostruka određivanja.

Ponovljivost: Vrijednost log P_{ow} izvedena iz ponovljenih mjerenja izvršenih pod identičnim uslovima i uz upotrebu iste grupe referentnih supstanci treba da bude u rasponu od ± 0,1 log jedinica.

Reproduktivnost: Ako se mjerenja ponove sa različitom grupom referentnih supstanci, rezultati se mogu razlikovati. Tipično se koeficijent korelacije R za odnos između log k i log P_{ow} za grupu supstanci koje se ispituju kreće oko 0,9, što odgovara koeficijentu raspodjele oktanol/voda od log P_{ow} ± 0,5 log jedinica.

MeĐulaboratorijasko uporedno ispitivanje pokazalo je da se uz pomoć HPLC metode vrijednosti log P_{ow} mogu dobiti u rasponu od ± 0,5 jedinica vrijednosti dobijenih metodom mućkanja u staklenom balonu. Ostala poreĐenja mogu se naći u literaturi. Grafikoni korelacije zasnovani na strukturno srodnim referentnim supstancama daju najpreciznije rezultate.

Referentne supstance

Radi dovoĐenja u korelativan odnos izmjerenog faktora kapaciteta k neke supstance sa njenim Pow, mora se izraditi kalibracioni grafikon uz upotrebu najmanje 6 tačaka. Referentne supstance treba da imaju vrijednosti log P_{ow} koje obuhvataju vrijednost log P_{ow} supstance koja se ispituje, tj. najmanje jedna referentna supstanca treba da ima vrijednost P_{ow} veću od vrijednosti P_{ow} supstance koja se ispituje, a druga referentna supstanca treba da ima vrijednost P_{ow} manju od vrijednosti P_{ow} supstance koja se ispituje. Ekstrapolaciju treba koristi u izuzetnim slučajevima. Referentne supstance treba da budu strukturno srodne sa supstancom koja se ispituje. Vrijednosti log P_{ow} referentnih supstanci korišćenih za kalibraciju zasnivaju na pouzdanim eksperimentalnim podacima. Međutiim, za supstance sa visokom vrijednošću log P_{ow} (obično iznad 4) koriste se izračunate vrijednosti ukoliko nema dostupnih pouzdanih eksperimentalnih podataka. Ako se koriste ekstrapolirane vrijednosti, potrebno je navesti graničnu vrijednost.

Dostupne su liste vrijednosti log Pow za grupe hemikalija. Ako nijesu dostupni podaci o koeficijentima raspodjele strukturno srodnih supstanci, koristi se opštija kalibracija utvrĐena sa drugim referentnim supstancama. Preporučene referentne supstance i njihove vrijednosti P_{ow} navedene su u tabeli 1. Za supstance koje se mogu jonizovati date vrijednosti odnose se na njihov nejonizovani oblik. Vjerodostojnost i kvalitet vrijednosti provjereni su meĐulaboratorijaskim uporednim ispitivanjem.

Tabela 1. **Preporučene referentne supstance**

	CAS broj	**Referentna supstanca**	**log P_{ow}**	**pKa**
1	78-93-3	2-butanon (Metil etil keton)	0,3	
2	1122-54-9	4-acetilpiridin	0,5	
3	62-53-3	Anilin	0,9	
4	103-84-4	Acetanilid	1,0	
5	100-51-6	Benzil-alkohol	1,1	
6	150-76-5	4-metoksifenol	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Fenoksiacetna kiselina	1,4	pKa = 3,12
8	108-95-2	Fenol	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	Benzonitril	1,6	
11	140-29-4	Fenilacetonitril	1,6	
12	589-18-4	4-metilbenzil alkohol	1,6	
13	98-86-2	Acetofenon	1,7	
14	88-75-5	2-nitrofenol	1,8	pKa = 7,17

15	121-92-6	3-nitrobenzojeva kiselina	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-hloranilin	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Nitrobenzen	1,9	
18	104-54-1	Cinamil alkohol (Cinaminski alkohol)	1,9	
19	65-85-0	Benzojeva kiselina	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	p-krezol	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (trans)	Cinaminska kiselina	2,1	pKa = 3,89 (cis) 4,44 (trans)
22	100-66-3	Anizol	2,1	
23	93-58-3	Metil benzoat	2,1	
24	71-43-2	Benzen	2,1	
25	99-04-7	3-metilbenzojeva kiselina	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-hlorofenol	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	trihloroetilen	2,4	
28	1912-24-9	Atrazin	2,6	
29	93-89-0	Etil benzoat	2,6	
30	1194-65-6	2,6-dihlorobenzonitril	2,6	
31	535-80-8	3-hlorobenzojeva kiselina	2,7	pKa = 3,82
32	108-88-3	Toluen	2,7	
33	90-15-3	1-naftol	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-dihloroanilin	2,8	
35	108-90-7	Hlorobenzen	2,8	
36	1746-13-0	Alil-fenil-eter	2,9	
37	108-86-1	Bromobenzen	3,0	
38	100-41-4	Etilbenzen	3,2	
39	119-61-9	Benzofenon	3,2	
40	92-69-3	4-fenilfenol	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Timol	3,3	
42	106-46-7	1,4-dihlorbenzen	3,4	

43	122-39-4	Difenilamin	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naftalen	3,6	
45	93-99-2	Fenil benzoat	3,6	
46	98-82-8	Izopropilbenzen	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-trihlorofenol	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Bifenil	4,0	
49	120-51-4	Benzil benzoat	4,0	
50	88-85-7	2,4-dinitro-6-sek-butilfenol	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-trihlorobenzen	4,2	
52	143-07-7	Dodekanoinska kiselina	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Difenil eter	4,2	
54	85-01-8	Fenantren	4,5	
55	104-51-8	n-butilbenzen	4,6	
56	103-29-7	Dibenzil	4,8	
57	3558-69-8	2,6-difenilpiridin	4,9	
58	206-44-0	Fluoranten	5,1	
59	603-34-9	Trifenilamin	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

Opis metode

Preliminarna procjena koeficijenta raspodjele

Ako je potrebno, koeficijent raspodjele susptance koja se ispituje može se procijeniti, i to po mogućnosti metodom proračuna (v. Dodatak, ili prema potrebi, upotrebom odnosa rastvorljivosti supstance koja se ispituje u čistim rastvaračima).

Aparatura

Potreban je tečni hromatograf opremljen pumpom niske pulsacije i odgovarajućim sistemom za detekciju. UV detektor koji koristi talasnu dužinu od 210 nm ili RI detektor mogu se primijeniti za širok spektar hemijskih grupa. Prisustvo polarnih grupa u stacionarnoj fazi može ozbiljno narušiti rad kolone HPLC-a. Stoga stacionarne faze treba da imaju minimalni procenat polarnih grupa.

Mogu se koristiti komercijalna pakovanja mikročestica inverzne faze ili gotove kolone. Pretkolona se postavlja između sistema za ubrizgavanje i analitičke kolone.

Mobilna faza

Metanol HPLC kvaliteta i destilovana ili dejonizovana voda koriste se za pripremanje rastvarača za eluiranje, koji se prije upotrebe degasifikuje. Potrebno je primijeniti izokratsku eluaciju, kao i odnose metanola i vode sa minimalnim sadržajem vode od 25%. Mješavina metanola i vode u odnosi 3:1 (v/v) zadovoljavajuća za supstance za eluaciju sa vrijednošću log P od 6 u okviru jednog sata pri brzini protoka od 1 ml/min. Za supstance sa log P iznad 6 može biti neophodno da se skrati vrijeme eluacije (kao i za referentne supstance) smanjenjem polariteta mobilne faze ili dužine kolone.

Supstanca koja se ispituje i referentne supstance moraju biti rastvorljive u mobilnoj fazi u koncentraciji dovoljnoj da se omogući njihova detekcija. Aditivi se mogu koristiti sa mješavinom metanola i vode samo u izuzetnim slučajevima, pošto oni mijenjaju svojstva kolone. U tim slučajevima potvrđuje se da to nema uticaja na vrijeme zadržavanja supstance koja se ispituje i referentnih supstanci. Ako mješavina metanola i vode nije odgovarajuća, mogu se koristiti druge mješavine organskih rastvarača i vode, npr. etanola i vode, acetonitrila i vode ili izopropil alkohola (2-propanola) i vode.

pH vrijednost eluenta od kritične je važnosti za supstance koje se mogu jonizovati. pH-vrijednost treba da bude u okviru radnog opsega pH kolone, što je obično između 2 i 8. Preporučuje se puferiranje. Mora se posvetiti pažnja tome da se izbjegne taloženje soli i propadanje kolone, što se dešava sa nekim mješavinama organske faze i pufera. Mjerenja hromatografijom HPLC sa stacionarnim fazama koje se zasnivaju na silicijum dioksidu a koje imaju pH vrijednost iznad 8 obično se ne savjetuju, pošto upotreba alkalne mobilne faze može prouzrokovati brzo slabljenje rada kolone.

Rastvorene supstance

Supstanca koja se ispituje i referentne supstance moraju biti dovoljno čiste za određivanje pikova u hromatogramima za odgovarajuće supstance. Supstance koje će se koristiti za ispitivanje ili kalibraciju rassupstancaaju se po mogućstvu u mobilnoj fazi. Ako se za rastvaranje supstance koja se ispituje i referentnih supstanci ne koristi mobilna faza već neki drugi rassupstancaač, mobilnu fazu treba koristiti za konačno razblaživanje prije ubrizgavanja.

Uslovi ispitivanja

Kolebanje temperature u toku mjerenja ne smije biti veće od ± 1 °C.

Određivanje mrtvog vremena t_0

Mrtvo vrijeme može se mjeri korišćenjem nezadržanih organskih supstanci (npr. tioureje ili formamida). Preciznije mrtvo vrijeme može se izvesti iz izmjerenih vremena zadržavanja ili iz grupe od približno sedam članova homologlognog niza (npr. n-alkil metal ketona) (17). Vremena zadržavanja t_R (n_C + 1) su u funkciji tR (n_C), gdje je n_C broj atoma ugljenika. Dobija se prava linija t_R (n_C + 1) = A t_R (n_C) + (1 – A) t_0, gdje je A, koja predstavlja k(n_C + 1)/k(n_C), konstanta. Mrtvo vrijeme t_0 dobija se iz presjeka (1 – A) t_0 i nagiba A.

Regresiona jednačina

Sljedeći korak je konstruisanje korelacione krive log k prema log P za odgovarajuće referentne supstance sa vrijednostima log P blizu očekivane vrijednosti za supstancu koja se ispituje. U praksi, iastovremeno se ubrizgava od 6 do 10 referentnih supstanci. Određuju se vremena zadržavanja, po mogućstvu na integratoru za bilježenje rezultata povezanom sa sistemom za detekciju. Odgovarajući logaritmi faktora kapaciteta, log k, ucrtavaju se kao funkcija log P. Regresiona jednačina radi se u redovnim intervalima, a najmanje jedanput dnevno, kako bi se mogle zabilježiti eventualne promjene u radu kolone.

Određivanje vrijednosti p_{ow} supstance koja se ispituje

Supstanca koja se ispituje ubrizgava se u najmanjim količinama koje se mogu detektovati. Vrijeme zadržavanja određuje se dva puta. Koeficijent raspodjele supstance koja se ispituje dobija se interpolacijom izračunatog faktora kapaciteta na kalibracionom grafikonu. Ekstrapolacija je neophodna za veoma niske i veoma visoke koeficijente raspodjele. Naročito se u tim slučajevima pažnja mora posvetiti granicama pouzdanosti regresione linije. Ako je vrijeme zadržavanja uzorka van raspona vremena zadržavanja dobijenih za standard, potrebno je navesti graničnu vrijednost. **Podaci i izvještavanje**

Izvještaj o ispitivanju

26. U izvještaju se mora navesti sljedeće:

- prethodna procjena koeficijenta raspodjele, ako je izvršena, procijenjene vrijednosti i korišćena metoda; ako je korišćena metoda proračuna, njen pun opis uključujući

identifikaciju baze podataka i detaljne informacije o izboru fragmenata;

- supstanca koja je ispitivana i referentne supstance: čistoća, strukturna formula i CAS broj,
- opis opreme i radnih uslova: analitička kolona, pretkolona, mobilna faza,
- sredstvo detekcije, temperaturni raspon, pH; profili eluiranja (hromatogrami);
- mrtvo vrijeme i način njegovog mjerenja;
- podaci o zadržavanju i vrijednosti log P_{ow} iz literature za referentne supstance
- koje se koriste prilikom kalibracije;
- podaci o prilagođenoj regresionoj liniji (log k prema log P_{ow}) i koeficijentu korelacije linije uključujući intervale pouzdanosti;
- podaci o prosječnom zadržavanju i interpolirana vrijednost log P_{ow} za supstancu koja je ispitivana;
- u slučaju smješe: hromatogram profila eluiranja sa navedenim vrijednostima
- pragova; vrijednosti log Pow u odnosu na % površine pika log P_{ow} ; proračun uz
- pomoć regresione linije; izračunate ponderisane prosječne vrijednosti log P_{ow},
- prema potrebi.

Dodatak

Metode izračunavanja P_{ow}

Uvod

Ovaj dodatak sadrži kratak uvod u iizračunavanje vrijednosti P_{ow}. Izračunate vrijednosti P_{ow} koriste se za:

- odlučivanje o tome koja eksperimentalna metoda će se koristiti: metoda mućkanja u staklenom balonu za vrijednosti log P_{ow} između – 2 i 4 i medoda HPLC za vrijednosti log P_{ow} između 0 i 6;

- izbor uslova koji će se koristiti u HPLC metodi (referentne supstance, odnos metanol/voda);
- provjeravanje vjerodostojnosti vrijednosti dobijenih putem eksperimentalnih metoda;
- davanje procjene onda kada se eksperimentalne metode ne mogu primijeniti.

Načelo metoda proračuna

Ovdje predložene metode proračuna zasnivaju se na teoretskoj fragmentaciji molekula na odgovarajuće podstrukture za koje su poznati pouzdani prirasti vrijednosti log P_{ow}. Vrijednost log P_{ow} dobija se sabiranjem vrijednosti fragmenata i korektivnih članova za unutarmolekularne interakcije.

Pouzdanost izračunatih vrijednosti

Govoreći uopšteno, što je složenost supstance koja se proučava veća, pouzdanost metoda proračuna je manja. U slučaju jednostavnih molekula male molekularne mase i koji imaju jednu ili dvije funkcionalne grupe, može se očekivati odstepene od 0,1 do 0,3 log P_{ow} jedinice između rezultata različitih metoda fragmentacije i izmjerenih vrijednosti. Granica greške zavisiće od pouzdanosti korišćenih konstanti fragmenata, sposobnosti prepoznavanja meĐumolekularnih interakcija (npr. vodonične veze) i ispravne upotrebe korektivnih članova. U slučaju jonizujućih supstanci moraju se uzeti u obzir naboj i stepen jonizacije.

Fudžita Hanšova (Fujita-Hansch) π-metoda

Konstanta hidrofobnog supstituenta, π, koju su prvobitno uveli Fudžita i ostali definiše se kao: $\pi X = \log P_{ow}(PhX) - \log P_{ow}(PhH)$ gdje je PhX aromatični derivat, a PhH je matična supstanca.

npr. $\pi Cl = \log P_{ow}(C_6H_5Cl) - \log P_{ow}(C_6H_6)$

$= 2,84 - 2,13$

$= 0,71$

π-metoda je prevashodno od interesa za aromatične supstance. U literature su dostupne πvrijednosti za veliki broj supstituenata.

Rekerova (Rekker) metoda

Upotrebom Rekerove metode vrijednost log P_{ow} iizračunava se kao:

$$LogP_{OW} = \sum_i a_i f_i + \sum_j uslovi\ interakcije$$

gdje je a_i broj pojavljivanja određenog fragmenta u molekulu, a f_i je prirast log P_{ow} fragmenta. Uslovi interakcije mogu se izraziti kao proizvod cijelog broja i samo jedne konstante C_m (takozvana „magična konstanta‖). Konstante fragmenata f_i i C_m određene su iz liste koja sadrži 1054 ekperimentalne vrijednosti P_{ow} za 825 supstanci upotrebom višestruke regresione analize (6)(8).
Određivanje uslova interakcije vrši se u skladu sa utvrĐenim pravilima.

Hanš-Leova (Hansch-Leo) metoda

Upotrebom Hanš-Leove metode vrijednost log Pow iizračunava se kao:

$$\log P_{OW} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

gdje je f_i konstanta fragmenta, F_j je korektivni član (faktor), dok su a_i i b_j odgovarajuća učestalost pojavljivanja. Liste atomskih i grupnih fragmentarnih vrijednosti i korektivnih članova F_j dobijene su metodom pokušaja i greške iz eksperimentalnih vrijednosti P_{ow}. Korektivni članovi podijeljeni su u nekoliko različitih klasa (1)(4). Razvijeni su softverski paketi da bi se uzela u obzir sva pravila i korektivni članovi.

Kombinovana metoda

Iizračunavanje vrijednosti log Pow složenih molekula može se značajno unaprijediti ako se molekul raščlani na veće podstrukture za koje su dostupne pouzdane vrijednosti log Pow, bilo da je to iz tabela ili iz postojećih mjerenja. Takvi fragmenti (npr. heterocikli, antrakinon, azobenzen) mogu se tada kombinovati sa Hanšovim (Hansch) π vrijednostima ili sa Rekerovim (Rekker) ili Leovim (Leo) konstantama fragmenata.

Metode proračuna mogu se primijeniti na djelimično ili potpuno jonizovane supstance samo ako se uzmu u obzir neophodni korektivni faktori.

Ako se može pretpostaviti postojanje unutarmolekularnih vodoničnih veza, moraju se dodati odgovarajući korektivni članovi (približno + 0,6 do + 1,0 log Pow jedinica). Naznake o prisustvu takvih veza mogu se dobiti iz stereo modela ili spektroskopskih podataka.

Ako je moguće postojanje nekoliko tautometrijskih oblika, kao osnovu za proračun treba koristiti onaj oblik koji je najvjerovatniji.

Potrebno je pažljivo pratiti revizije listi konstanti fragmenata.

PRILOG 2

METODE ISPITIVANJA SVOJSTAVA HEMIKALIJA KOJA UTIČU NA ŽIVOT I ZDRAVLJE LJUDI

OPŠTI UVOD

A. OPIS SVOJSTAVA ISPITIVANE SUPSTANCE

Prije početka ispitivanja toksičnosti treba da je poznat sastav ispitivane supstance uključujući i glavne nečistoće i značajna fizička i hemijska svojstva uključujući stabilnost. Fizička i hemijska svojstva ispitivane supstance važni su podaci za izbor puta primjene, plana svake pojedinačne studije,kao i načina rukovanja i čuvanja ispitivane supstance. Početku ispitivabnja prethodi unapreĐivanje analitičke metode za kvalitativnu i kvantitativnu analizu ispitivane supstance (uključujući glavne nečistoće) u vehikulumu za primjenu doze i biološkom materijalu. U Izvještaj o ispitivanju uključeni su svi podaci koje se odnose na identifikaciju, fizička i hemijska svojstva, čistoću i ponašanje ispitivane supstance.

B. BRIGA O ŽIVOTINJAMA

Kontrola uslova smještaja i tehnika o odgovarajućoj brizi o životinjama je važna pri ispitivanju toksičnosti.

A) USLOVI SMJEŠTAJA

Uslovi smještaja u prostorijama i kavezima za eksperimentalne životinje odgovaraju eksperimentalnoj vrsti koja se koristi. Za pacove, miševe i zamorce odgovarajući uslovi su: sobna temperatura od 22°C± 3°C sa relativnom vlažnošću od 30% do 70%; a za kuniće temperatura treba da bude 20°C ± 3°C sa relativnom vlažnošću od 30% do 70%. Neke eksperimentalne tehnike naročito su osjetljive na efekte temperature i u tim slučajevima detalji odgovarajućih uslova uključeni su u opis metode ispitivanja.

U istraživanjima toksičnih efekata temperatura i vlažnost se prate, zabilježe i uključuju u konačni Izvještaj o ispitivanju.

Osvjetljenje je vještačko sa smjenjivanjem 12 sati svijetlosti i 12 sati mraka. Detalji o osvjetljenosti tokom eksperimenta bilježe se i uključuju u konačni Izvještaj o ispitivanju. Ako nije drugačije propisano u metodi ispitivanja, životinje se mogu smještiti u odgovarajući smještaj za pojedinačno i odvojeno držanje ili u kavezima u malim grupama istog pola. U slučaju grupnog smještaja ne stavlja se više od pet životinja u kavez.

U izvještaju o ispitivanju na životinjama važno je naznačiti tip kaveza i broj životinja smještenih u svakom kavezu za vrijeme izlaganja hemikaliji i u svakom kasnijem periodu posmatranja.

B) ISHRANA

Ishrana treba da zadovoljava sve nutritivne zahtjeve vrste koja se koristi u ispitivanju. Kada se ispitivane supstance daju životinjama preko hrane, nutritivna vrijednost je smanjena uslijed međusobnog uticaja supstance i sastojaka hrane. Mogućnost ovakvog uticaja razmatra se pri tumačenju rezultata ispitivanja. Upotrebljava se uobičajena laboratorijaska hrana sa slobodnim pristupom vodi za piće. Na izbor hrane može da utiče potreba da se obezbijedi odgovarajuća smješa ukoliko se ispitivana supstanca daje preko hrane. Nečistoće u hrani za koje se zna da utiču na toksičnost nisu prisutne u koncentracijama koje utiču na rezultate ispitivanja.

C. ALTERNATIVNA ISPITIVANJA

Evropska Unija promoviše razvoj i priznavanje alternativnih metoda koje mogu da daju isti nivo informacija kao sadašnja ispitivanja na životinjama, ali koje koriste manje životinja, izazivaju manje patnje ili izbjegavaju upotrebu životinja. Takve metode, uzimaju se u obzir za karakterizaciju opasnosti i klasifikaciju koja slijedi, kao i za obilježavanje opasnosti i procjenu bezbjednosti hemikalije kad god je to moguće.

D. PROCJENA I TUMAČENJE

Kada se ispitivanja procjenjuju i tumače, razmatraju se ograničenja direktne ekstrapolacije rezultata ispitivanja na životinjama i in vitro studija na čovjeka, i zato se za potvrdu rezultata ispitivanja mogu, kada su dostupni, koristiti dokazi o štetnim efektima na ljude.

B.1bis. AKUTNA ORALNA TOKSIČNOST - METODA FIKSNIH DOZA

DIO I

1. Metoda ispitivanja

Metoda ispitivanja akutne oralne toksičnosti zasniva se na metodi OECD: TG 420 (2001).

1.1. Uvod

U tradicionalnim metodama za određivanje akutne toksičnosti određene ispitivane supstance smrt životinja koristi se kao ciljni pokazatelj ispitivanja toksičnosti (endpoint). Britansko toksikološko udruženje predložilo je 1984. godine, na osnovu primjene niza fiksnih doza[1], novi pristup ispitivanja akutne toksičnosti. Ovaj pristup zasniva se na posmatranju jasnih znakova toksičnosti jednog od niza fiksnih doznih nivoa, kako bi se izbjeglo uginuće životinja kao ciljni pokazatelj. Nakon in vivo validovanih ispitivanja (Velika Britanija[2] i međunarodna), postupak fiksnih doza je 1992. godine prihvaćen kao metoda ispitivanja. Kasnije su statistički podaci postupka fiksnih doza validovani pomoću matematičkih modela u nizu ispitivanja[4,5,6]. Zajedno su in vivo ispitivanja i studije na modelima pokazale da je postupak reproduktivan, koristi se manji broj životinja i u poređenju sa tradicionalnim metodama izaziva manju patnju životinja, a rangira toksičnost supstance podjednako dobro kao i druge razvijene metode ispitivanja akutne toksičnosti.

Uputstva za izbor najbolje metode ispitivanja za određenu namjenu nalaze se u literaturi[7] koja sadrži dodatne informacije o izvoĐenju i tumačenju rezultata dobijenih metodom ispitivanja B.1bis.

Princip ove metode ispitivanja je da se u glavnom ispitivanju koriste umjereno toksične doze, a izbjegavaju potencijalno smrtonosne doze. Izbjegava se i primjena onih doza za koje je poznato da usled pojave korozivnog oštećenja ili jake iritacije izazivaju značajan bol ili stres kod životinja. Životinje koje su na samrti ili su jasno izložene intenzivnom bolu ili stresu, lišavaju se života na human način, a u konačnoj obradi rezultata tretiraju se na isti način kao i životinje koje uginu za vrijeme ispitivanja. U posebnom vodiču[8] dati su kriterijumi prema kojima se životinje koje su na samrti ili jako pate lišavaju života, a definisani su i simptomi na osnovu kojih je lako prepoznati neminovnu smrt. Ova metoda ispitivanja obezbjeđuje podatke o opasnim svojstvima supstance i omogućava procjenu i klasifikaciju prema Globalno harmonizovanom sistemu za klasifikaciju i obilježavanje UN (u daljem tekstu: GHS) u odnosu na akutnu toksičnost. Prije početka studije uzimaju se u obzir svi dostupni podaci o ispitivanoj supstanci. Podaci uključuju identitet i hemijsku strukturu supstance; njena fizička i hemijska svojstva; rezultate obavljenih in vitro ili in vivo ispitivanja toksičnosti; toksikološke podatke o strukturno sličnim supstancama; kao i predviĐene načine korišćenja supstance. Ovi podaci ukazuju na važnost izvoĐenja studije za zaštitu zdravlja ljudi, a pomažu i pri izboru odgovarajuće početne doze.

1.2. Definicije

Akutna oralna toksičnost je svojstvo hemikalije da izazove štetne efekte nakon primjene pojedinačne peroralne doze ili nekoliko peroralnih doza u periodu od 24 sata.

Odložena smrt je uginuće životinja koje ne uginu ili nisu životno ugrožene tokom prvih 48 sati, već do uginuća dolazi u periodu posmatranja od 14 dana.

Doza je količina primjenjene ispitivane supstance. Izražava se kao masa ispitivane supstance po jedinici tjelesne mase (TM) eksperimentalne životinje (mg/kg).

Evidentna toksičnost je toksični efekat kod koga se javljaju jasni znaci toksičnosti nakon primjene ispitivane supstance, koji su toliko intenzivni da bi izlaganje sljedećoj većoj fiksnoj dozi kod životinja dovelo do jakog bola, stresa, iscrpljenosti, stanja na samrti (kriterijumi su prikazani u Vodiču ili do smrtnog ishoda).

GHS je skraćenica za Globalno harmonizovan sistem za klasifikaciju, obilježavanje i pakovanje hemikalija UN. Razvoj ovog sistema je zajednički napor OECD, UN Komisije stručnjaka za transport opasnih hemikalija (fizička i hemijska svojstva) i MeĐunarodne organizacije rada (ILO), a koordinira ga MeĐuorganizacijski program za pravilno upravljanje hemikalijama (IOMC).

Neminovna smrt je očekivana smrt životinje koja je na samrti ili se njena smrt očekuje prije planiranog narednog vremena posmatranja. Simptomi koji ukazuju na ovo stanje kod glodara su konvulzije, lateralni položaj, ležeći položaj ili tremor .

LD_{50} (srednja smrtna doza) je statistički određena pojedinačna doza supstance za koju se očekuje da izaziva smrtnost kod 50 posto ispitivanih životinja kada se primjeni peroralnim

putem. Vrijednost LD_{50} izražava se u jedinici mase ispitivane supstance po jedinici tjelesne mase eksperimentalne životinje (mg/kg).

Granična doza je gornja granična doza koja se koristi u ispitivanju (2.000 mg/kg ili 5.000 mg/kg).

Stanje na samrti je stanje definisano kao nemogućnost preživljavanja ili neminovna smrt životinje, čak i nakon eventualnog tretmana (Vodič[8]).

Predvidljiva smrt je stanje koje karakteriše prisutnost kliničkih znakova koji ukazuju na neminovnu smrt životinje pre završetka eksperimenta, na primjer nemogućnost uzimanja vode ili hrane (Vodič[8]).

1.3. Princip metode

Na grupe životinja istog pola postupno se primjenjuju fiksne doze od 5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg i 2.000 mg/kg (izuzetno, razmatra se i primjena još jedne fiksne doze od 5.000 mg/kg, dio 1.6.2. ove metode). Količina inicijalne doze bira se na osnovu prethodnih ispitivanja. Primjenjuje se ona doza za koju se očekuje da će rezultirati nekim znacima toksičnosti, pri čemu ova doza neće izazvati teško trovanje ili smrt. Klinički znaci ili stanja koja upućuju na jak bol, patnju ili neminovnu smrt životinje detaljno su opisani u OECD Vodiču[8]. Nakon primjene inicijalne doze grupe životinja koje se dalje uključuju u ispitivanje doziraju se većim ili manjim fiksnim dozama, u zavisnosti od toga da li su prisutni znaci koji ukazuju na toksičnost ili uginuće. Ovaj postupak se nastavlja do primjene doze koja izaziva evidentnu toksičnost ili smrt najviše jedne životinje.

Postupak se prekida kada najveća primjenjena doza ne izazove toksične efekte ili kada najniža primjenjena doza dovede do smrti životinja.

1.4. Opis metode

1.4.1. Izbor životinjske vrste

Preporučena vrsta glodara je pacov, iako se za ispitivanja koriste i druge životinjske vrste. Najčešće se koriste ženke[7], jer je na osnovu literature koja se odnosi na ispitivanje LD_{50} uočeno da je mala razlika u osjetljivosti polova pri primjeni ove metode. U slučajevima u kojima je uočena razlika, ženke su pokazale nešto veću osjetljivost[10]. Ako se u literaturi pronađu toksikološki ili toksikokinetički podaci za strukturno slične hemikalije koji ukazuju na to da su mužjaci osjetljivi na određenu ispitivanu supstancu, koristimo mužjake za ispitivanje. Kad se ispitivanje izvodi na mužjacima, navodi se opravdanost za njihovu primjenu.Ispitivanje se izvodi na zdravim mladim jedinkama onih laboratorijaskih sojeva koji se uobičajeno koriste u ovakvim ispitivanjima. Ispitivanje se vrši na ženkama koje nisu ranije rađale i nisu gravidne. Svaka životinja, na početku ispitivanja i primjene prvih doza ispitivane supstance, je stara između 8 i 12 nedjelja, a njena tjelesna masa je u opsegu ± 20% od srednje vrijednosti mase prethodno doziranih životinja.

1.4.2. Uslovi smještaja i ishrana

Temperatura prostorije u kojoj se drže životinje je 22°C (± 3°C). Relativna vlažnost vazduha je najmanje 30%, ali ne više od 70% (osim kada se prostorije čiste). Vlažnost vazduha se održava između 50% i 60%. Osvjetljenje je vještačko, i to u intervalima od 12 sati svijetla i 12 sati mraka. Za ishranu se primjenjuje uobičajena hrana za laboratorijaske životinje, sa slobodnim pristupom vodi za piće. Životinje se prema primjenjenoj dozi ispitivane supstance grupišu u kaveze. Broj životinja po kavezu ni na koji način ne ometa proces praćenja i posmatranja svake životinje.

1.4.3. Priprema životinja

Životinje se biraju nasumice, obilježavaju radi lakšeg razlikovanja, a da bi se prilagodile na laboratorijaske uslove drže se u kavezima najmanje pet dana prije početka eksperimenta i primjene prve doze ispitivane supstance.

1.4.4. Priprema doza

Ispitivane supstance primjenjuju se u konstantnim zapreminama, pa je neophodno prilagoĐavanje koncentracije za pripremanje različitih doza. Pri ispitivanju hemikalije u tečnom stanju, primjena nerazblažene ispitivane supstance, odnosno supstance koja je u smješi u konstantnoj koncentraciji, može da bude značajna za kasniju procjenu rizika od te supstance. Maksimalna pojedinačna zapremina doze se ne prekoračuje. Maksimalna zapremina tečnosti koja se primjenjuje zavisi i od veličine eksperimentne životinje. Zapremina ispitivane supstance koja se primjenjuje kod glodara ne prelazi 1 ml/100g TM životinje; a ukoliko se primjenjuje vodeni rastvor razmatra se doza od 2 ml/100g TM životinje. Kad je rijč o formulaciji i pripremi doze, prvenstveno se preporučuje primjena vodenog rastvora/suspenzije/emulzije, a zatim rastvora/suspenzije/emulzije u ulju (npr. kukuruznom ulju) ili rastvor u nekom drugom vehikulumu. Za sve vehikulume osim vode, znaju se njihove toksikološke karakteristike. Doze se pripremaju neposredno prije primjene, osim ako se radi o supstanci za koju je poznato da je stabilna u rastvoru tokom dužeg vremenskog perioda.

1.5. Postupak

1.5.1. Primjena doza

Ispitivana supstanca primjenjuje se u jednoj dozi sondom direktno u želudac ili intubiranjem kanilom. U posebnim okolnostima, kada jednokratna doza nije moguća, ispitivana supstanca se primjenjuje u nekoliko manjih porcija tokom vremenskog perioda koji nije duži od 24 sata. Prije početka primjene doza ispitivane supstance, potrebno je izgladnjeti životinje (npr. pacovima je potrebno uskratiti hranu, ali ne i vodu preko noći; miševima je potrebno uskratiti hranu, ali ne i vodu na 3 do 4 sata). Nakon perioda gladovanja, potrebno je izmjeriti tjelesnu masu životinja i primjeniti ispitivanu supstancu. Nakon prve doze, hrana može ponovno da se uskrati, i to: kod pacova narednih 3 do 4 sata, a kod miševa naredna 1 do 2 sata. Kada se doza ispitivane supstance primjeni u nekoliko manjih porcija u određenom vremenskom intervalu, može da se ukaže potreba za hranom i vodom ukoliko se radi o produženom vremenskom periodu.

1.5.2. Prethodno ispitivanje

Cilj prethodnog ispitivanja životinja je određivanje odgovarajuće početne doze za glavno ispitivanje. Ispitivana supstanca primjenjuje se na pojedinačnim životinjama postupno kao što je

opisano u dijagramu toka ispitivanja koji je dat u drugom dijelu ove metode. Prethodno ispitivanje je završeno kada je moguće doneti odluku o početnoj dozi (ili u slučajevima kada dođe do uginuća već kod najniže fiksne doze). Početna doza za prethodno ispitivanje je fiksni dozni nivo od 5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg i 2.000 mg/kg, a definisana je kao ona doza koje će izazvati jasne znake toksičnosti, odabrana na osnovu podataka in vivo i in vitro ispitivanja za ispitivanu supstancu ili druge strukturno slične hemikalije. Ukoliko nema ovakvih podataka, za početnu dozu uzima se koncentracija od 300 mg/kg. Pauza se pravi najmanje 24 sata između primjene doza ispitivane supstance kod svake pojedinačne životinje. Životinje se posmatraju kroz vremenski period od najmanje 14 dana.

Izuzetno, i samo u slučajevima kad to opravdavaju specifične potreberazmatra se primjena još jedne veće fiksne doze od 5.000 mg/kg (Dio IV ove metode). Zbog dobrobiti životinja, ne preporučuje se ispitivanje na životinjama za klasifikaciju ispitivane supstance u Kategoriju 5 prema GHS-u (u opsegu doza od 2.000 mg/kg do 5.000 mg/kg), i razmatra se samo u slučajevima kada postoji velika vjerovatnoća da će rezultati ovakvog ispitivanja imati neposredan značaj za zaštitu zdravlja ljudi ili životne sredine.

Kada u prethodnom ispitivanju već kod najniže primjenjene fiksne doze (5 mg/kg) dođe do smrti eksperimentne životinje, ispitivanje se završi, a ispitivana supstanca klasifikuje u Kategoriju 1, prema GHS-u (Dio II ove metode). Dodatna potvrda za ovakvu klasifikaciju je dodatno ispitivanje i to tako što se druga životinja dozira sa 5 mg/kg. Ako dođe do smrti i druge životinje, smatra se potvrđenom klasifikacija u Kategoriju 1 prema GHS-u, i obustavljaju se sva dalja ispitivanja. Ako druga životinja preživi, tada se na najviše tri dodatne životinje primjenjuje doza od 5 mg/kg. Zbog visokog rizika od smrtnosti, naknadno uvedene životinje potrebno je uključivati u eksperiment jednu po jednu radi dobrobiti životinja. Vremenski razmak između doziranja kod pojedinačnih životinja je dovoljno dugačak da može lako da se predvidi preživljavanje prethodne životinje. Ako ipak dođe do drugog slučaja smrti, odmah se završi primjena niza doza ispitivane supstance tako da se ispitivanje ne vrši dalje ni na jednoj životinji. Budući da pojava drugog slučaja uginuća (nevezano od broja životinja koje se ispituju u momentu kada se odluči da se eksperiment završi) spada pod ishod A koji je dat u drugom dijelu ove metode (dve ili više smrti), primjenjuje se klasifikaciono pravilo iz trećeg dijela ove metode pri fiksnoj dozi od 5 mg/kg (klasifikacija u Kategoriju 1 ako dođe do dvije ili više slučaja smrti, ili u Kategoriju 2 ukoliko dođe do smrti kod jedne životinje). U petom dijelu ove metode date su smjernice za klasifikaciju prema Pravilniku o kriterijumima i načinu klasifikacije, pakovanja i označavanja hemikalija i određenog proizvoda u klase opasnosti ("Sl. List CG", br. 53/12 od 24.10.2012),dok ne počne sa primjenom Pravilnik o kriterijumima i načinu klasifikacije, pakovanja i označavanja hemikalija i određenog proizvoda u klase opasnosti u skladu sa Globalno harmonizovanim sistemom za klasifikaciju i obilježavanje UN .

1.5.3. Glavno ispitivanje

1.5.3.1. Broj životinja i dozni nivoi

Na dijagramu toka za glavno ispitivanje (Dio III) ove metode prikazani su postupci koji se preduzimaju u ispitivanju nakon primjene početnog doznog nivoa. Preduzima se jedan od tri koraka: prekid ispitivanja i klasifikacija u odgovarajuću klasu opasnosti ili ispitivanje većom fiksnom dozom ili ispitivanje manjom fiksnom dozom. Da bi se zaštitile životinje, dozni nivo koji je u prethodnom ispitivanju doveo do smrti životinje ne primjenjuje se u glavnom ispitivanju (Dio

III ove metode). Iskustvo je pokazalo da je pri početnom doznom nivu najvjerovatniji ishod glavnog ispitivanja klasifikacija ispitivane supstance, tako da dalja ispitivanja nisu neophodna.

Za ispitivanje pri svakom doznom nivou koristi se ukupno pet životinja istog pola. Grupu od pet životinja čine jedna životinja iz prethodnog ispitivanja (kojoj je primijenjena odabrana fiksna doza) i dodatne četiri životinje (osim u posebnim slučajevima kada se dozni nivo iz glavnog ispitivanja nije koristio u prethodnom ispitivanju).

Vremenski razmak između primjene ispitivane supstance pri svakom doznom nivou određen je početkom, trajanjem i ozbiljnošću znakova toksičnosti. Tretman životinja sljedećom dozom odlaže sve dok se ne uvjerimo u preživljavanje prethodno tretiranih životinja. Vremenski razmak je od 3 do 4 dana između primjene ispitivane supstance pri svakom doznom nivou, kako bi se omogućio dovoljno dug period za posmatranje eventualnih odloženih toksičnih reakcija. Ovaj vremenski interval se mijenja, npr. u slučajevima u kojima su posmatranja nejasna. Kada se razmatra korišćenje fiksne doze od 5.000 mg/kg, prati se postupak iz dijela 1.6.2. ove metode.

1.5.3.2. Ispitivanje granične doze

Ispitivanje granične doze primarno se koristi u situacijama u kojima istraživač ima podatke koji ukazuju da je ispitivana hemikalija vjerovatno netoksična, tj. da postaje toksična iznad propisanih graničnih doza. Podaci o toksičnosti ispitivane hemikalije se preuzimaju iz završenih ispitivanja sa sličnim supstancama ili smješama, ako se uzme u obzir identitet i koncentracija komponenata izražena u procentima, za koje se pouzdano zna da su toksikološki značajne. U slučajevima gdje nema podataka o toksičnosti ili ih nema dovoljno, za ispitivanje granične doze koristi se već ustanovljen postupak, sa početnom dozom definisanom u prethodnom ispitivanju od 2.000 mg/kg (ili izuzetno 5.000 mg/kg) i sa naknadnim uvođenjem dodatne četiri eksperimentne životinje na koje će se primjeniti ista doza.

1.6. Posmatranja

Životinje se posmatraju pojedinačno nakon primjene prve doze ispitivane supstance i to najmanje jednom tokom prvih 30 minuta i periodično tokom sljedeća 24 sata, uz posebnu pažnju na prva 4 sata. Posmatranja se obavljaju jedanput dnevno, u periodu od ukupno 14 dana, osim u slučajevima kada je životinju potrebno isključiti iz ispitivanja (ako je pronađena mrtva) ili je lišiti života na human način imajući u vidu dobrobit životinje. Trajanje posmatranja nije strogo definisano, već ga određuju toksični efekti, početak i trajanje oporavka, a ukoliko postoji potreba i produžava se. Važni su periodi u kojima se pojavljuju i nestaju prvi znaci toksičnosti, posebno ako se znaci toksičnosti javljaju odloženo. Sva posmatranja sistematski se bilježe, a za svaku životinju potrebno je voditi posebni karton sa opažanjima.

Ako životinje neprekidno pokazuju znake toksičnosti vrše se dodatna posmatranja. uključuju se i promjene na koži i krznu, očima i mukoznim membranama, kao i na respiratornom, cirkulatornom, autonomnom i centralnom nervnom sistemu, promjene somatomotorne aktivnosti i promjene ponašanja. Posebna pažnja se obraća na pojavu tremora, konvulzija, salivacije, dijarejua, letargije, pospanosti i kome. Životinje pronađene na samrti ili one koje trpe jak bol ili stres, lišavaju se života na human način. Kada su životinje lišene života iz humanih razloga ili su pronađene mrtve, precizno se zabilježi vrijeme smrti.

1.6.1. Tjelesna masa

Individualna tjelesna masa životinja određuje se neposredno prije primjene ispitivane supstance i najmanje jednom nedeljno nakon tog perioda. Bilježe se i iizračunavaju promjene u tjelesnoj masi. Na kraju ispitivanja, mjeri se tjelesna masa preživjelih životinja, a potom se lišavaju života na human način.

1.6.2. Patološka ispitivanja

Sve ispitivane životinje (uključujući i one koje uginu u toku ispitivanja ili su isključene iz ispitivanja zbog dobrobiti životinje) se postmortalno pregledaju. Za svaku životinju bilježe se sve značajne patološke promjene. Mikroskopskim pregledom organa dobijaju se korisni podaci, pa se obavlja pregled organa koji su postmortalnim pregledom pokazali značajne patološke promjene i to kod životinja koje su preživjele 24 ili više sati nakon prve doze.

2. Podaci

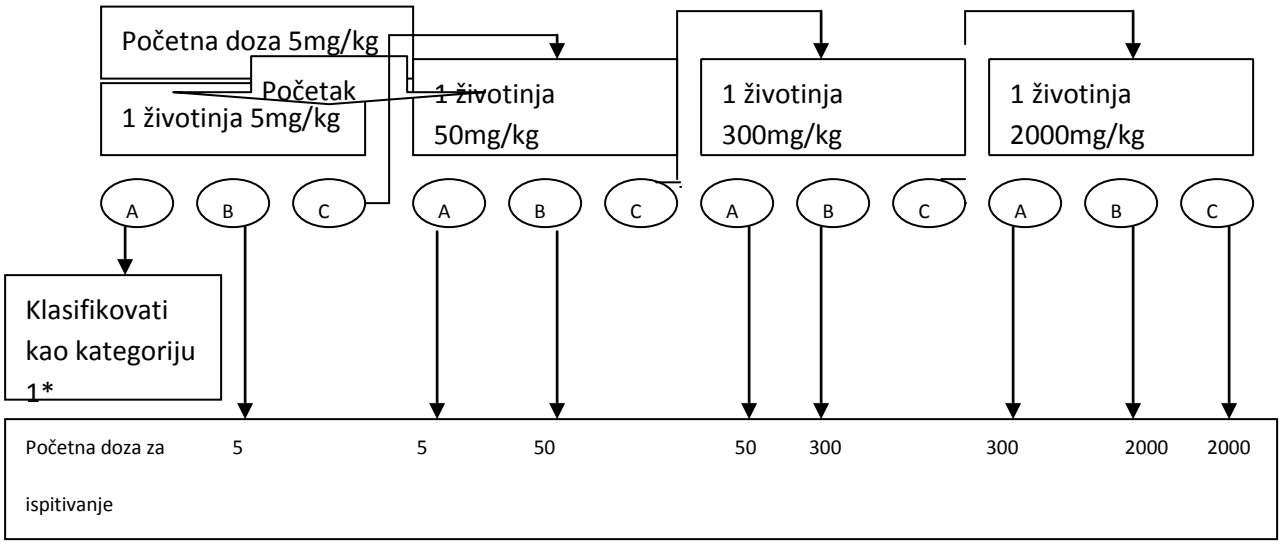
Podaci se prikupljaju za svaku životinju. Svi podaci se tabelarno prikazuju, a za svaku ispitivanu grupu navodi se ukupan broj životinja u grupi, broj životinja koje su pokazale znake toksičnosti, broj životinja koje su pronađene mrtve ili broj onih koje se lišavaju života na human način tokom ispitivanja, vrijeme smrti pojedinačnih životinja, opis i vremenski tok toksičnih efekata i njihovu reverzibilnost, kao i nalaze postmortalnog pregleda.

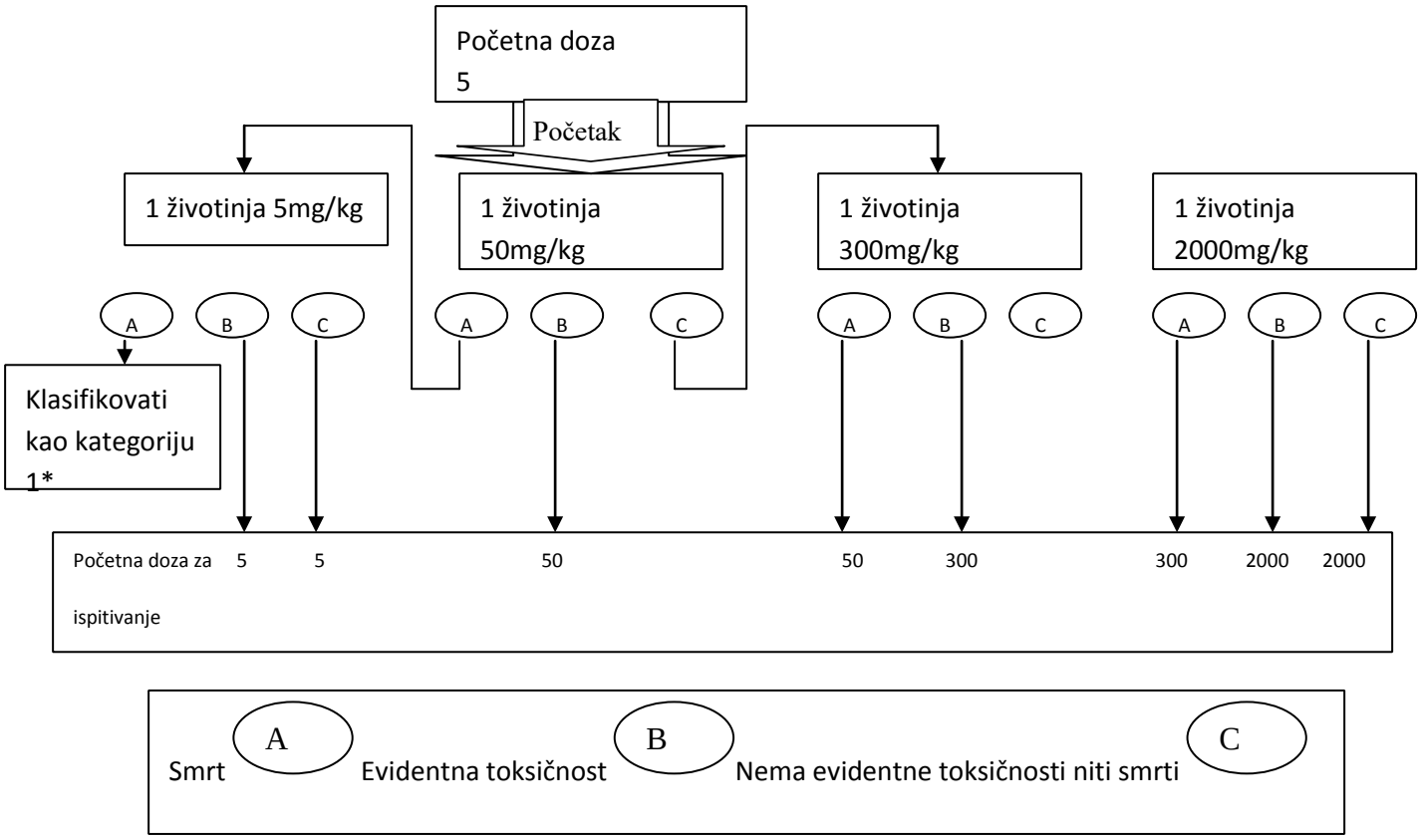
3. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:

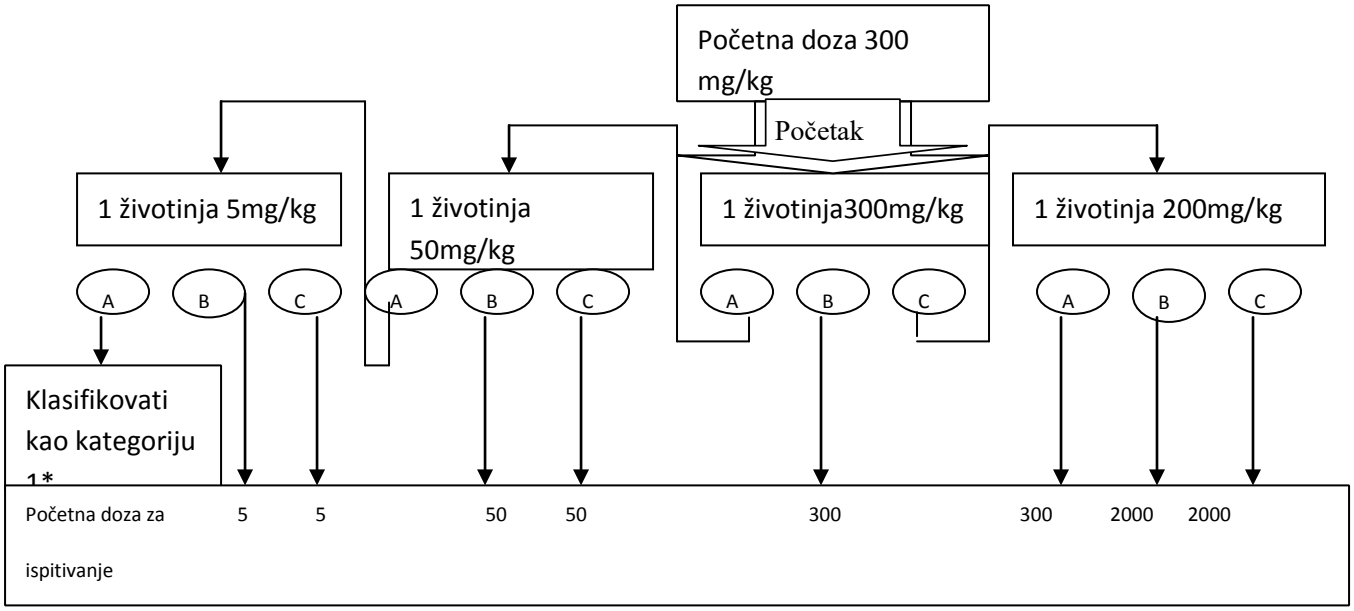
1) ispitivanoj supstanci (fizička svojstva, čistoću, kao i eventualna fizička i hemijska svojstva uključujući izomerizaciju i identifikacione podatke koji uključuju i CAS broj);
2) vehikulumu uz obrazloženje za izbor vehikuluma, ukoliko nije voda;
3) eksperimentnoj životinji (vrsta/soj, mikrobiološki status životinje, ako je poznat, broj, starost i pol životinja, izvor, uslove smještaja, ishrane, itd);
4) uslovima ispitivanja (detalje o formulaciji ispitivane supstance, uključujući fizičko stanje u kome je primjenjena formulacija, detalje o primjeni ispitivane supstance uključujući zapremine doza i vrijeme primjene doze ispitivane supstance, detalje o kvalitetu hrane i vode uključujući detalje o vrsti i izvoru hrane i izvoru vode, obrazloženje za izbor početne doze);
5) rezultatima (tabelarni prikazi rezultata i primijenjene doze za svaku životinju, tabelarni prikaz tjelesne mase i promjena tjelesne mase, individualnu tjelesnu masu životinja na dan primjene doze ispitivane supstance, zatim u nedeljnim intervalima, i u vrijeme uginuća ili žrtvovanja, datum i vrijeme smrti, ako do nje dođe prije predviđenog žrtvovanja, vremenski tok pojave znakova toksičnosti, i da li su znaci bili reverzibilni za svaku životinju, nalaze postmortalnih pregleda i histopatološki nalazi za svaku životinju, ukoliko su dostupni);
6) diskusiju i tumačenje rezultata;
7) zaključke.

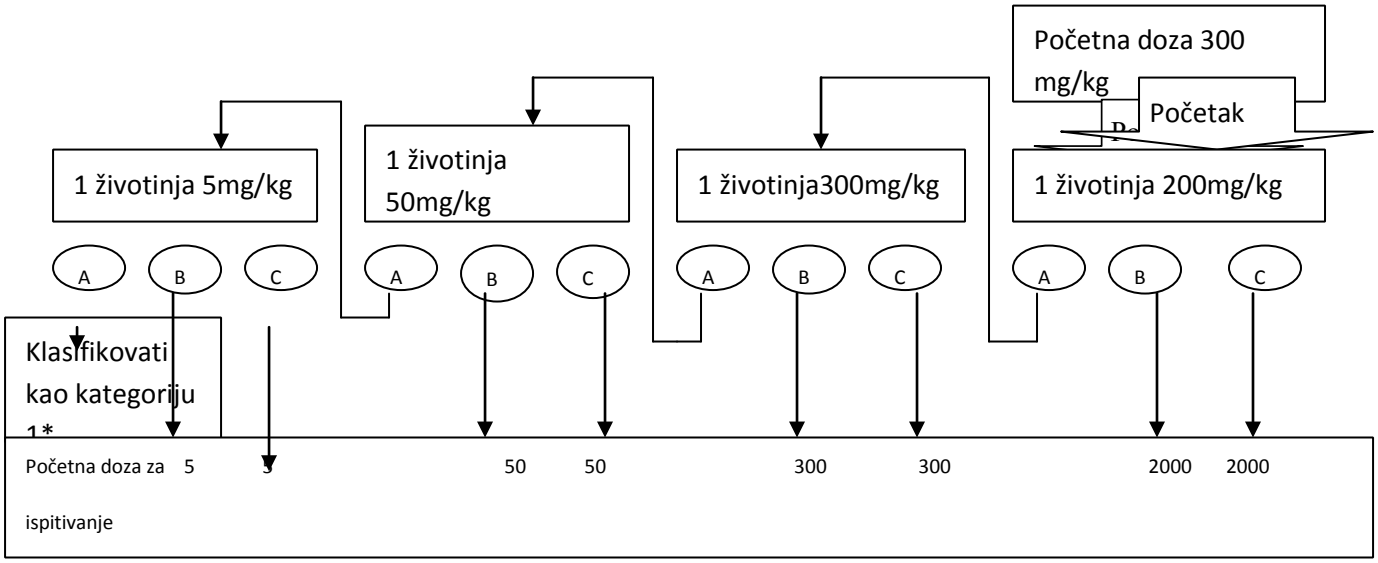
DIJAGRAM TOKA ZA PRETHODNO ISPITIVANJE
DIO II





Za ishod A kod doze od 5mg/kg postoji i dodatni postupak kojim se potvrđuje klasifikacija GHS, (odjeljak 1.5.2.)

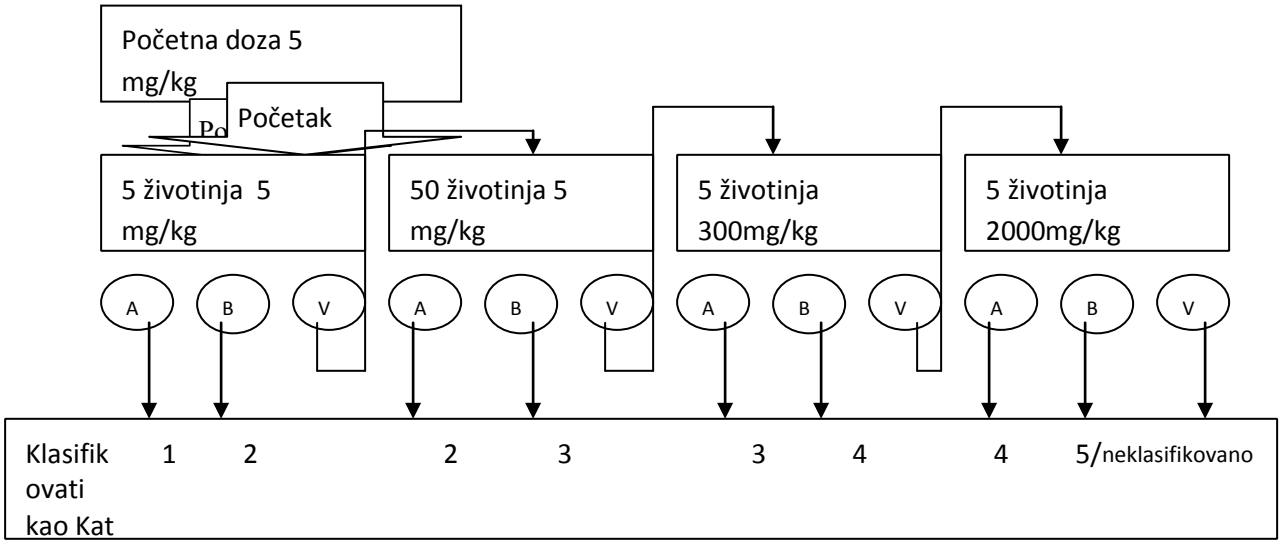


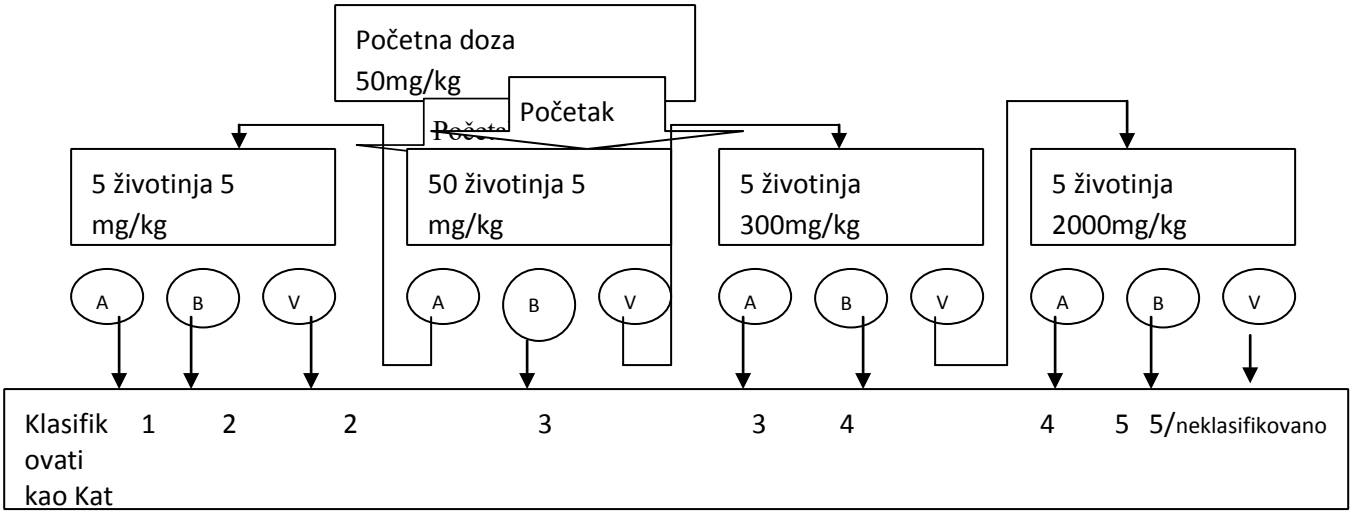


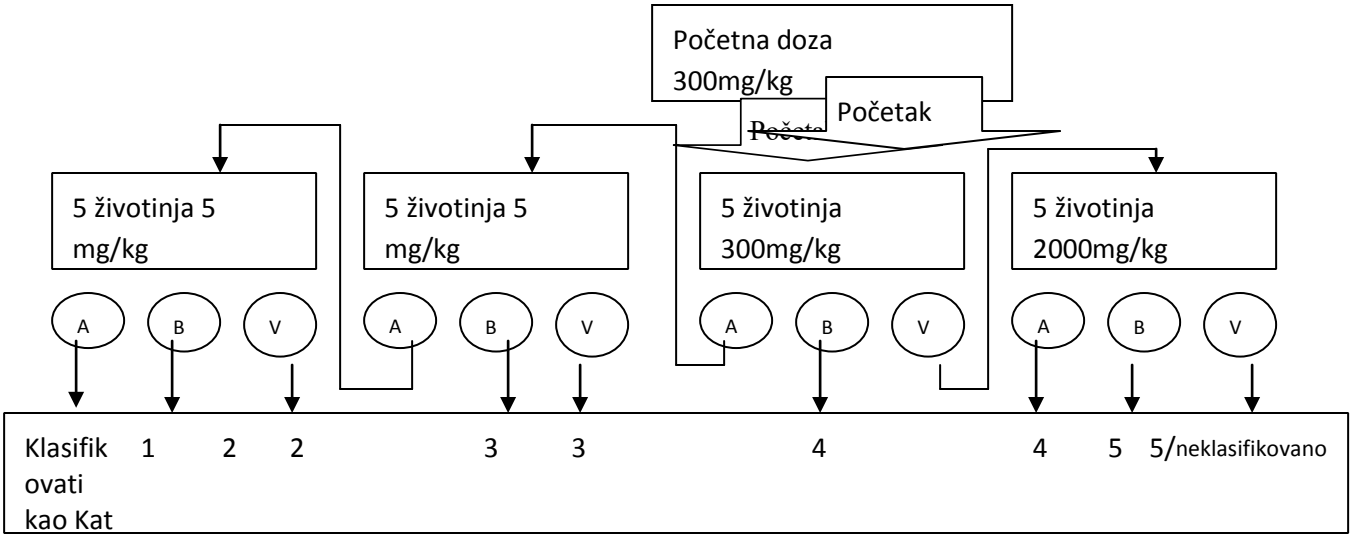
Za ishod A kod doze od 5mg/kg postoji i dodatni postupak kojim se potvrđuje klasifikacija GHS, tačka 1.5.2

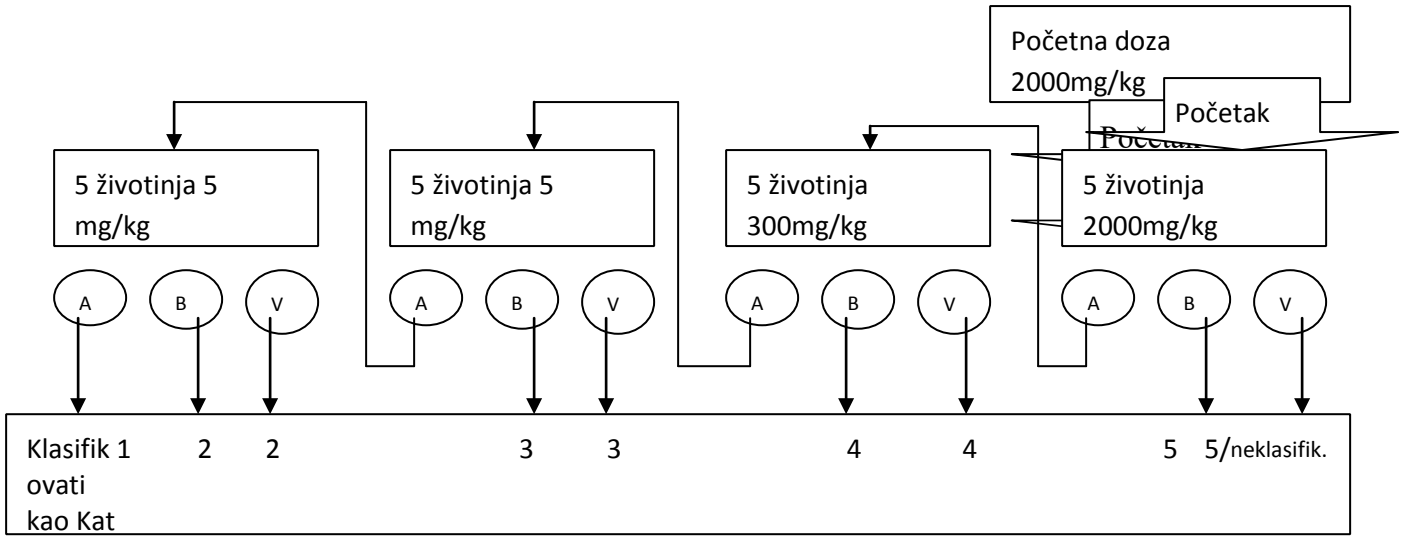
DIJAGRAM TOKA ZA GLAVNO ISPITIVANJE

DIO III


Početna doza 5 mg/kg
Početak
5 životinja 5 mg/kg
50 životinja 5 mg/kg
5 životinja 300mg/kg
5 životinja 2000mg/kg
A
B
V
Klasifikovati kao Kat
1
2
2
3
3
4
4
5/neklasifikovano


Početna doza 50mg/kg
Početak
5 životinja 5 mg/kg
50 životinja 5 mg/kg
5 životinja 300mg/kg
5 životinja 2000mg/kg
A
B
V
Klasifikovati kao Kat
1
2
2
3
3
4
4
5
5/neklasifikovano





A ≥ smrt Evidentna toksičnost

B ≥ 1evidentna toksičnost i/ili smrt

V Nema evidentne toksičnosti niti smrti

Veličina grupe: 5 životinja u svakoj grupi glavnog ispitivanja uključuje i bilo koju

životinju ispitanu na istu dozu iz predhodnog ispitivanja

Dobrobit životinja -ako je ova dozaizazvala smrt u prethodnom ispitivanju, eksp. Se prekida i

	ide se A na

KRITERIJUMI ZA KLASIFIKACIJU ISPITIVANIH SUPSTANCI SA OČEKIVANIM VRIJEDNOSTIMA LD_{50} IZNAD 2.000 mg/kg ZA KOJE SE NE SPROVODE DODATNA ISPITIVANJA
DIO IV

Kriterijum za klasifikaciju u klasu opasnosti akutna toksičnost Kategorija 5 (po GHS-u) omogućava identifikovanje ispitivanih supstanci koje pokazuju nisku akutnu toksičnost, ali koje pod određenim okolnostima predstavljaju opasnost za osjetljive populacije. Ove supstance imaju vrijednosti LD_{50} (peroralno) i LD_{50} (dermalno) u opsegu doza od 2.000 mg/kg do 5.000 mg/kg ili potpuno odgovarajućih doza primjenjenih drugim putevima unosa. Ispitivane supstance klasifikuju se u odgovarajuću kategoriju opasnosti (Kategorija 5 po GHS-u) ako je: 2.000 mg/kg < LD_{50} < 5.000 mg/kg, u sljedećim slučajevima:

a) ako bilo koja od shema ispitivanja datih u Dijelu III ove metode upućuje na ovu kategoriju zbog učestalosti smrtnih slučajeva,
b) ako postoje pouzdani dokazi da je vrijednost LD_{50} u opsegu vrijednosti koji odgovara Kategoriji 5; ili ako druge studije toksičnosti sprovedene na životinjama ili ljudima ukazuju na potencijalne akutne toksične efekte na zdravlje ljudi,
c) ako se ekstrapolacijom, procjenom ili mjerenjem podataka ne ustanovi pripadnost nekoj višoj klasi opasnosti, a:
    - postoje pouzdani podaci koji ukazuju na značajne toksične efekte kod ljudi ili se uoči smrt pri ispitivanjima koja se vrše radi klasifikacije zaključno u Kategoriju 4, peroralnom primjenom odgovarajuće doze ili
    - stručnom procjenom se potvrde značajni klinički znaci toksičnosti, pri ispitivanjima koja se vrše radi klasifikacije zaključno u Kategoriju 4, pri čemu klinički znaci ne uključuju dijareju, piloerekciju ili zapušteni izgled ili
    - se stručnom procjenom potvrdi postojanje značajnih akutnih toksičnih efekata iz drugih ispitivanja sprovedenih na životinjama.

Ispitivanje doza iznad 2.000 mg/kg

Zbog zaštite životinja i njihove dobrobiti ne ispituju se doze od 5.000 mg/kg. Primjena ove doze razmatra se samo u slučajevima kad postoji velika vjerovatnoća da će rezultati ispitivanja imati značajan doprinos zaštiti zdravlja ljudi ili životinja.

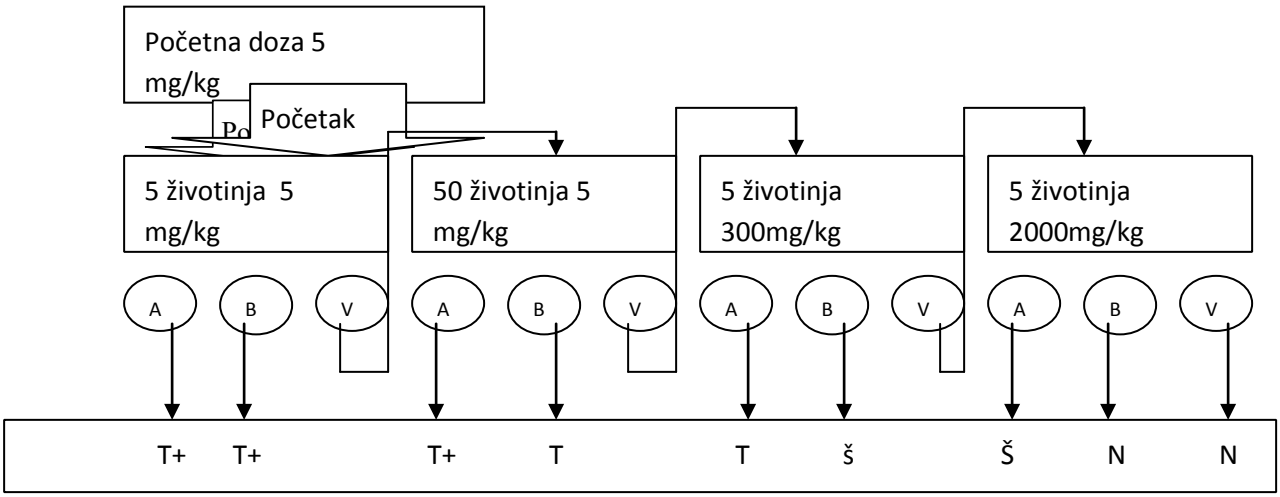
Prethodno ispitivanje

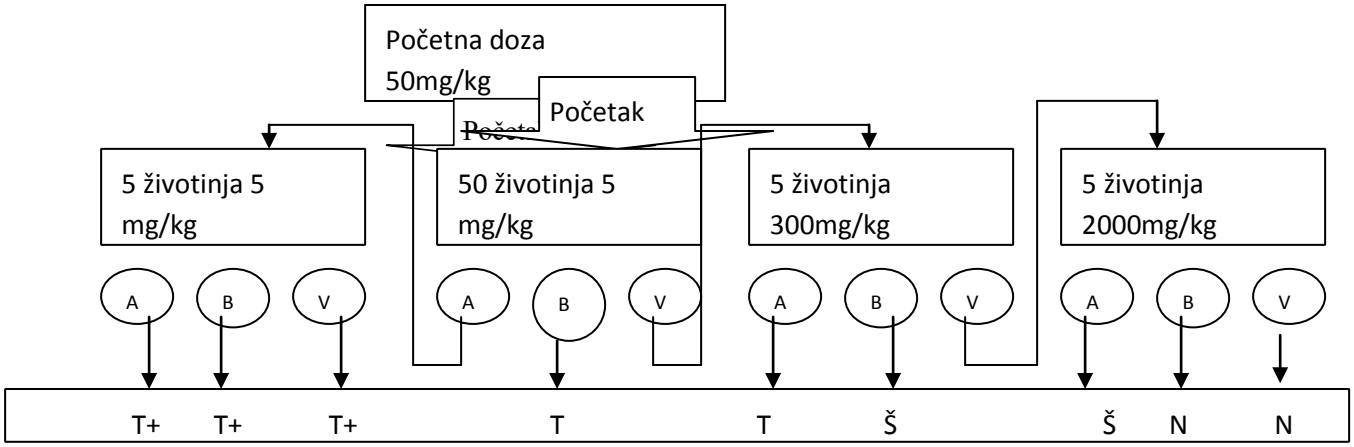
Pravila za primjenu postupka koji se sastoji iz niza koraka dat u Dio II ove metode, proširuju se na primjenu doze od 5.000 mg/kg. Kada se u prethodnom ispitivanju koristi početna doza od 5.000 mg/kg, ishod A (smrt) zahtijeva ispitivanje i druge životinje na primjenu doze od 2.000 mg/kg; ishodi B i V (evidentna toksičnost ili nema toksičnosti) dozvoljavaju primjenu doze od 5.000 mg/kg kao početne doze u glavnom ispitivanju. Ako se ne koristi početna doza od 5.000 mg/kg, ispitivanje se nastavlja do primjene doze od 5.000 mg/kg u slučaju ishoda pod B ili V pri dozi od 2.000 mg/kg; ako kod primjenjene doze od 5.000 mg/kg dođe do ishoda A tada se u glavnom ispitivanju koristi početna doza od 2.000 mg/kg, a ishodi pod B i V nalažu početnu dozu od 5.000 mg/kg u glavnom ispitivanju.

Glavno ispitivanje

Pravila za primjenu postupka iz niza koraka dat u Dio III ove metode, proširuju se na primjenu doze od 5.000 mg/kg. Kada se u glavnom ispitivanju koristi početna doza od 5.000 mg/kg, ishod A (dvije ili više smrti) uslovljava ispitivanje druge grupe životinja primjenom doze od 2.000 mg/kg; dok ishod B (evidentna toksičnost i/ili jedna ili manje smrti) ili ishod V (nema toksičnosti) dovode do klasifikacije supstance prema GHS-u. Ako se ne koristi početna doza od 5.000 mg/kg, u slučaju ishoda V, pri dozi od 2.000 mg/kg, ispitivanje se nastavlja do primjene doze od 5.000 mg/kg. Ishod A kod primjenjene doze od 5.000 mg/kg dovodi do klasifikacije supstance u Kategoriju 5 (prema GHS-u). Ishodi B ili V dovode do nemogućnosti klasifikacije supstance.

METODA ISPITIVANJA B.1 bis-SMJERNICE ZA KLASIFIKACIJU
DIO V



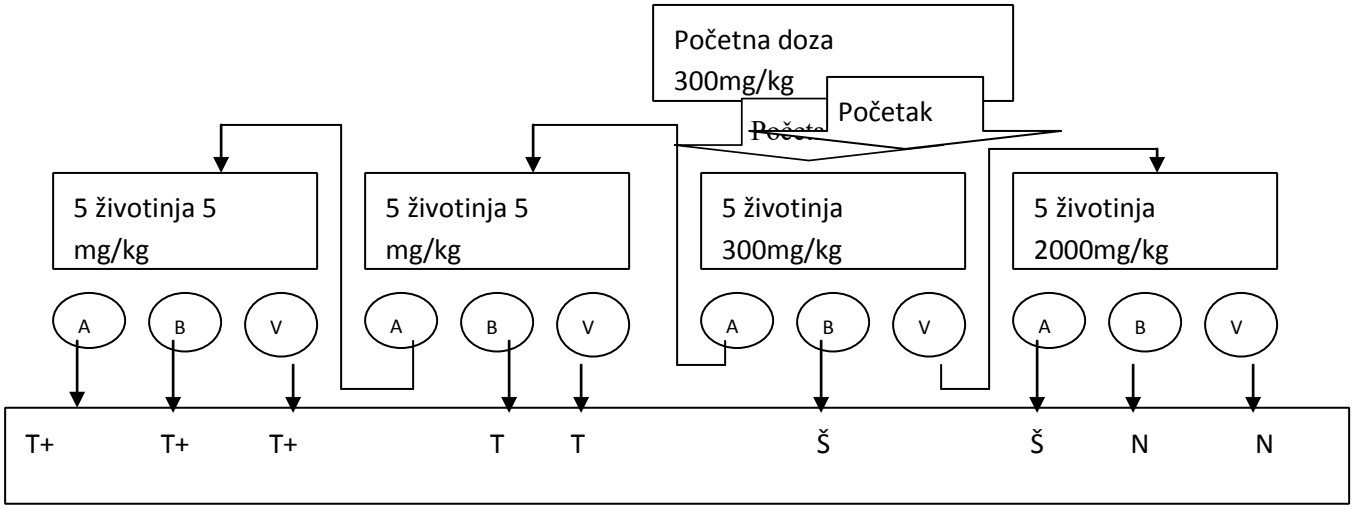


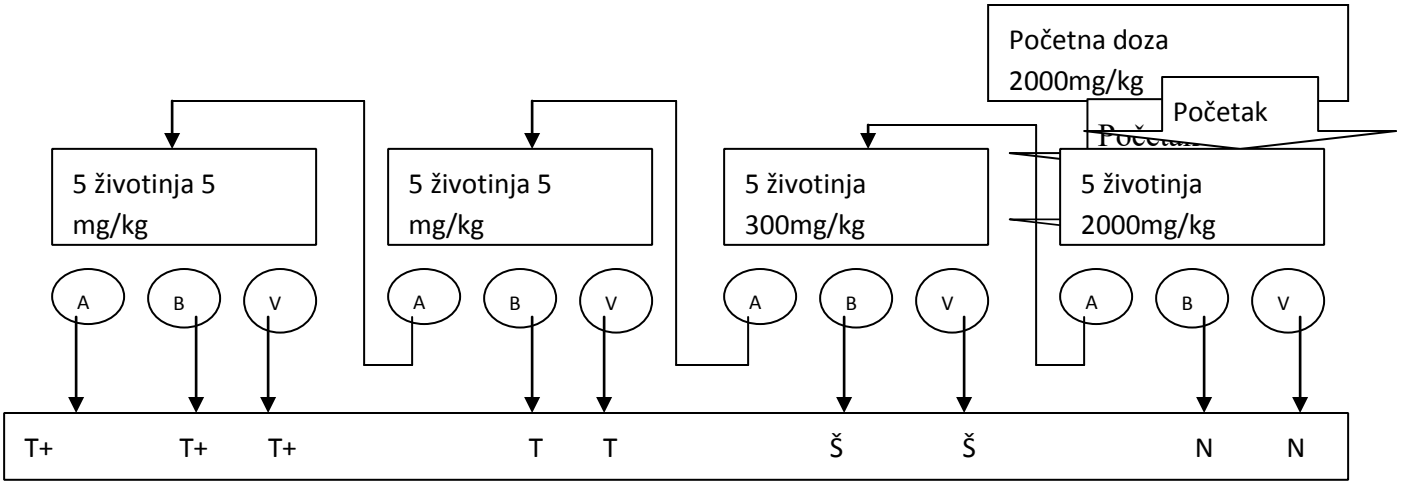
T+ veoma toksično

T toksično

Š štetno

N nikakav efekat





A ≥ smrt Evidentna toksičnost

B ≥ 1evidentna toksičnost i/ili smrt

V Nema evidentne toksičnosti niti smrti

Veličina grupe: 5 životinja u svakoj grupi glavnog ispitivanja uključuje i bilo koju životinju ispitanu na istu dozu iz predhodnog
ispiti vanja

Dobrobit životinja -ako je ova dozaizazvala smrt u prethodnom ispitivanju, eksp. Se prekida i

ide se A na

B.1 tris. AKUTNA ORALNA TOKSIČNOST - METODA ODREĐIVANJA KLASE AKUTNE TOKSIČNOSTI

DIO I

1. Metoda ispitivanja

Metoda ispitivanja akutne oralne toksičnosti zasniva se na metodi OECD: TG 423 (2001).

1.1. Uvod

Metoda određivanja klase akutne toksičnosti koja je data u ovom ispitivanju je postupak u kome se u svakom koraku koriste po tri životinje istog pola. U zavisnosti od smrtnosti odnosno stanja na samrti kod životinja, prolazi prosječno dva do četiri koraka da bi se doneo zaključak o akutnoj toksičnosti ispitivane supstance. Ovaj postupak je reproduktivan (ponovljiv), koristi

veoma mali broj životinja i daje mogućnost klasifikacije supstanci na sličan način kao i ostale metode ispitivanja akutne toksičnosti. Metoda određivanja klase akutne toksičnosti zasnovana je na biometrijskim evaluacijama sa fiksnim dozama koje su razdvojene na odgovarajući način kako bi se omogućilo rangiranje supstance za potrebe klasifikacije i procjenu opasnosti. Kada je ova metoda ispitivanja usvojena, 1996. godine, bila je u velikoj mjeri validirana u *in vivo* ispitivanjima u odnosu na podatke o vrijednosti LD_{50} koji su dobijeni iz nacionalne[6] i međunarodne[7] literature. Ovaj dokument sadrži i dodatne informacije o izvođenju i tumačenju rezultata dobijenih metodom ispitivanja B.1 *tris*.

Ispitivane supstance ne primjenjuju se na životinje u dozama za koje je poznato da izazivaju vidljiv bol i iscrpljenost usled korozivnog ili jakog iritativnog efekta. Životinje koje su na samrti, koje očito trpe jake bolove ili pokazuju znake trajne iscrpljenosti lišavaju se života na human način, i pri tumačenju rezultata ispitivanja uzimaju se u obzir kao i životinje koje su uginule tokom ispitivanja. Kriterijum za donošenje odluke o lišavanju života bolesne ili životinje na samrti, kao i uputstva za prepoznavanje predstojeće i predvidljive smrti dati su u literaturi[9].

U ovoj metodi ispitivanja koriste se unaprijed određene doze, a rezultati ispitivanja omogućavaju da se supstanca rangira i klasifikuje prema Pravilniku o klasifikaciji, pakovanju, obilježavanju hemikalije i određenog proizvoda u skladu sa globalno harmonizovanim sistemom za klasifikaciju i obilježavanje UN odnosno GHS.

Metoda ispitivanja nije namijenjena iizračunavanju precizne vrijednosti LD_{50}, ali omogućava utvrđivanje definisanih opsega doza gde je letalitet očekivan, jer se i u ovoj metodi kao ciljni pokazatelj ispitivanja još uvjek koristi smrt određenog procenta životinja. Metoda ispitivanja omogućava određivanje vrijednosti LD_{50} samo u slučaju kada najmanje dvije primjenjene doze dovode do letaliteta koji je viši od 0% a manji od 100%. Korišćenje unaprijed određenih doza koje su izabrane nezavisno od ispitivane supstance, zajedno sa klasifikacijom koja je jasno povezana sa brojem životinja posmatranih u različitim okolnostima, povećava mogućnost konzistentnih Izvještaja i ponovljivost.

Prije početka studije uzimaju se u obzir svi dostupni podaci o ispitivanoj supstanci. Podaci uključuju identitet i hemijsku strukturu supstance, njena fizička i hemijska svojstva, rezultate drugih *in vivo* ili *in vitro* ispitivanja toksičnosti, toksikološke podatke strukturno sličnih supstanci, kao i predviđene načine korišćenja supstance. Ovi podaci su neophodni da bi se ukazalo na važnost izvođenja studije za zaštitu zdravlja ljudi, a pomažu i pri izboru odgovarajuće početne doze.

1.2. Definicije

Akutna oralna toksičnost je svojstvo hemikalije da izazove štetne efekte nakon primjene pojedinačne peroralne doze ili nekoliko peroralnih doza u periodu od 24 sata.

Odložena smrt je uginuće životinja koje ne uginu ili nisu životno ugrožene tokom prvih 48 sati, već do uginuća dolazi u periodu posmatranja od 14 dana.

Doza je količina primjenjene ispitivane supstance. Izražava se kao masa ispitivane supstance po jedinici tjelesne mase eksperimentalne životinje (mg/kg).

Evidentna toksičnost je toksični efekat kod koga se javljaju jasni znaci toksičnosti nakon primjene ispitivane supstance koji su toliko intenzivni da bi izlaganje sljedećoj većoj fiksnoj dozi kod životinja vjerovatno dovelo do jakog bola, stresa, iscrpljenosti, stanja na samrti ili smrtnog ishoda.

Neminovna smrt je očekivana smrt životinje koja je na samrti ili se njena smrt očekuje prije planiranog narednog vremena posmatranja. Simptomi koji ukazuju na ovo stanje kod glodara su konvulzije, lateralni položaj, ležeći položaj ili tremor.

LD_{50} (srednja smrtna doza) je statistički određena pojedinačna doza supstance za koju se očekuje da izaziva smrtnost kod 50 posto ispitivanih životinja kada se primjeni peroralnim putem. Vrijednost LD_{50} izražava se u jedinici mase ispitivane supstance po jedinici tjelesne mase eksperimentalne životinje (mg/kg).

Granična doza je gornja granična doza koja se koristi u ispitivanju (2.000 mg/kg ili 5.000 mg/kg).

Stanje na samrti je stanje definisano kao nemogućnost preživljavanja ili neminovna smrt životinje, čak i nakon eventualnog tretmana.

Predvidljiva smrt je stanje koje karakteriše prisutnost kliničkih znakova koji ukazuju na neminovnu smrt životinje pre završetka eksperimenta, na primjer nemogućnost uzimanja vode ili hrane (Vodič[8]).

1.3. Princip metode

Princip ispitivanja koje je zasnovano na postupku (korak po korak) uz korišćenje minimalnog broja životinja po koraku, je da se prikupi dovoljno podataka o akutnoj toksičnosti ispitivane supstance kako bi se omogućila njena klasifikacija. Supstanca se daje grupi eksperimentnih životinja peroralno u jednoj od određenih doza. Supstanca se ispituje primjenom postupka (korak po korak), pri čemu se u svakom koraku koriste tri životinje istog pola (uglavnom ženke). Izostanak ili prisustvo znakova koji upućuju na smrt kod životinja kojima se primjenjuje doza u jednom od koraka određuje sljedeći korak postupka, odnosno:

- da dalja ispitivanja nisu potrebna,
- potrebu primjene iste doze na dodatne tri životinje,
- potrebu primjene sljedeće više ili niže doze na dodatne tri životinje.

Detalji postupka ispitivanja dati su u Dio II ove metode. Ova metoda ispitivanja omogućava da se donese zaključak o klasifikaciji, pri čemu se u obzir uzima klasifikacija ispitivane supstance u jednu od niza klasa toksičnosti koje su definisane po fiksnim LD_{50} graničnim vrijednostima.

1.4. Opis metode ispitivanja

1.4.1. Izbor životinjske vrste

Preporučena vrsta glodara je pacov, iako se za ispitivanja koriste i druge životinjske vrste. Najčešće se koriste ženke jer je na osnovu literature koja se odnosi na ispitivanje LD_{50} uočeno da je mala razlika u osjetljivosti polova pri primjeni ove metode. U slučajevima u kojima je uočena razlika, ženke su pokazale nešto veću osjetljivost. Ako se u literaturi nađu toksikološki

ili toksikokinetički podaci za strukturno slične hemikalije koji ukazuju na to da su mužjaci osjetljiviji na određenu ispitivanu supstancu, koriste se mužjaci za ispitivanje. Kad se ispitivanje izvodi na mužjacima, navodi se opravdanost za njihovu primjenu.

Ispitivanje se izvodi na zdravim mladim jedinkama onih laboratorijaskih sojeva koji se uobičajeno koriste u ovakvim ispitivanjima. Ispitivanje se vrši na ženkama koje nisu ranije rađale i koje nisu gravidne. Svaka životinja na početku eksperimenta i primjene prvih doza ispitivane supstance je stara između 8 i 12 nedjelja, a njena tjelesna masa je u opsegu ± 20 % od srednje vrijednosti mase prethodno doziranih životinja.

1.4.2. Uslovi smještaja i ishrana

Temperatura prostorije u kojima se drže životinje je 22°C (± 3°C). Relativna vlažnost vazduha je najmanje 30%, ali ne više od 70% (osim kad se prostorije čiste), a idealno je vlažnost vazduha održavati između 50% i 60%. Osvjetljenje je vještačko, i to u intervalima od 12 sati svijetla i 12 sati mraka. Za ishranu se primjenjuje uobičajena hrana za laboratorijaske životinje, sa slobodnim pristupom vodi za piće. Životinje se prema primjenjenoj dozi ispitivane supstance grupišu u kaveze. Broj životinja po kavezu ni na koji način ne ometa proces praćenja i posmatranja svake životinje.

1.4.3. Priprema životinja

Životinje se biraju nasumice, obilježavaju radi lakšeg razlikovanja, a da bi se prilagodile na laboratorijaske uslove drže se u kavezima najmanje pet dana prije početka eksperimenta i primjene prve doze ispitivane supstance.

1.4.4. Priprema doza

Ispitivane supstance primjenjuju se u konstantnim zapreminama, pa je neophodno prilagođavanje koncentracije za pripremanje različitih doza. Pri ispitivanju hemikalije u tečnom stanju, primjena nerazblažene ispitivane supstance, odnosno supstance koja je u smješi u konstantnoj koncentraciji, značajna je za kasniju procjenu rizika od te supstance. Maksimalna pojedinačna zapremina doze se ne prekoračuje. Maksimalna zapremina tečnosti koja se primjenjuje zavisi i od veličine eksperimentne životinje. Zapremina ispitivane supstance koja se primjenjuje kod glodara ne prelazi 1 ml/100 g TM životinje, a ukoliko se primjenjuje vodeni rastvor razmatra se i doza od 2 ml/100 g TM životinje. Kad je riječ o formulaciji i pripremi doze, primjenjuje se vodeni rastvora/suspenzije/emulzije, a zatim rastvora/suspenzije/emulzije u ulju (npr. kukuruznom ulju) ili rastvor u nekom drugom vehikulumu. Za sve vehikulume osim vode, znaju se njihove toksikološke karakteristike. Doze se pripremaju neposredno prije primjene, osim ako se radi o supstanci za koju je poznato da je stabilna u rastvoru tokom dužeg vremenskog perioda.

1.5. Postupak

1.5.1. Primjena doza

Ispitivana supstanca primjenjuje se u jednoj dozi sondom direktno u želudac ili intubiranjem kanilom. U posebnim okolnostima, kada jednokratna doza nije moguća, ispitivana supstanca se primjenjuje u nekoliko manjih porcija tokom vremenskog perioda koji nije duži od 24 sata.

Prije početka primjene doza ispitivane supstance izgladni se životinja (npr. pacovima je potrebno uskratiti hranu, ali ne i vodu preko noći; miševima je potrebno uskratiti hranu, ali ne i vodu na 3 do 4 sata). Nakon perioda gladovanja, izmjeri se tjelesna masu životinja i primjeni se ispitivana supstanca. Nakon prve doze, hrana se ponovo uskrati, i to: kod pacova narednih 3 do 4 sata, a kod miševa naredna 1 do 2 sata. Kada se doza ispitivane supstance primjeni u nekoliko manjih porcija u određenom vremenskom intervalu, ukazuje se potreba za hranom i vodom ukoliko se radi o produženom vremenskom periodu.

1.5.2. Broj životinja i dozni nivoi

U svakom koraku koriste se po tri životinje. Dozni nivo koji će se koristiti kao početna doza je jedna od fiksnih doza od 5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg i 2.000 mg/kg TM. Početni dozni nivo je doza koja sa najvećom vjerovatnoćom izaziva smrt kod nekih od uključenih životinja. Dijagrami toka ispitivanja dati u Dio II ove metode, opisuju postupak koji se prati pri primjeni svake početne doze. U osmom dijelu ove metode date su smjernice za klasifikaciju prema Pravilniku o kriterijumima i načinu klasifikacije, pakovanja i označavanja hemikalija i određenog proizvoda u klase opasnosti ("Sl. List CG", br. 53/12), dok ne počne sa primjenom Pravilnik o kriterijumima i načinu klasifikacije, pakovanja i označavanja hemikalija i određenog proizvoda u klase opasnosti u skladu sa Globalno harmonizovanim sistemom za klasifikaciju i obilježavanje. Ukoliko dostupni podaci ukazuju da pri primjeni najviše početne doze (2.000 mg/kg TM) neće doći do smrti životinja, obavlja se ispitivanje granične doze. Kad nema podataka o ispitivanoj supstanci, zbog dobrobiti životinja početna doza je od 300 mg/kg TM.

Vremenski razmak između primjene ispitivane supstance pri svakom doznom nivou određen je početkom, trajanjem i ozbiljnošću znakova toksičnosti. Tretman životinja sljedećom dozom se odlaže sve dok se ne uvjerimo u preživljavanje prethodno tretiranih životinja.

Izuzetno, i samo u slučajevima kada to opravdavaju specifične potrebe, razmatra se primjena dodatnog doznog nivoa od 5.000 mg/kg TM (Dio VII ove metode). Zbog dobrobiti životinja, ne preporučuje se ispitivanje na životinjama radi klasifikacije ispitivane supstance u Kategoriju 5 (prema GHS-u) u opsegu doza od 2.000 mg/kg do 5000 mg/kg, i razmatra se samo u slučajevima kada postoji velika vjerovatnoća da će rezultati ispitivanja imati neposredan značaj za zaštitu zdravlja ljudi, životinja i životne sredine.

1.5.3. Ispitivanje granične doze

Ispitivanje granične doze primarno se koristi u situacijama kada istraživač ima pouzdane podatke da je ispitivana hemikalija netoksična, tj. da postaje toksična samo iznad propisanih graničnih doza. Podaci o toksičnosti ispitivanih hemikalija preuzimaju se iz završenih ispitivanja na sličnim hemikalijama, ako se uzme u obzir identitet i procenat komponenata za koje se pouzdano zna da su toksikološki značajne. U slučajevima gdje nema podataka o toksičnosti ili ih nema dovoljno, ili kada se očekuje da će ispitivana hemikalija biti toksična obavlja se glavno ispitivanje.

Ispitivanje granične doze, pri doznom nivou od 2.000 mg/kg TM, sprovodi se na šest životinja (tri životinje po koraku) ili, izuzetno, pri doznom nivou od 5.000 mg/kg TM uvođenjem tri životinje po koraku (Dio VII ove metode). Ukoliko se pokaže da je smrt životinja povezana sa primjenom ispitivane supstance sprovede se dalja ispitivanja i pri nižem doznom nivou.

1.6. Posmatranja

Životinje se posmatraju pojedinačno nakon primjene prve doze ispitivane supstance i to najmanje jednom tokom prvih 30 minuta i periodično tokom sljedeća 24 sata, uz posebnu pažnju i naglasak na prva 4 sata. Posmatranja se zatim obavljaju jednom dnevno, u periodu od ukupno 14 dana, osim u slučajevima kada je životinju potrebno isključiti iz ispitivanja (ako je pronađena mrtva) ili je lišiti života na human način imajući u vidu dobrobit životinje. Trajanje posmatranja nije strogo definisano, već ga određuju toksični efekti, početak i trajanje oporavka, a ukoliko postoji potreba i produžava se. Važni su periodi u kojima se pojavljuju i nestaju prvi znaci toksičnosti, posebno ako se znaci toksičnosti javljaju odloženo[12]. Sva posmatranja sistematski se bilježe, a za svaku životinju vodi se zasebni karton sa opažanjima.

Ako životinje neprekidno pokazuju znake toksičnosti, sprovode se dodatna posmatranja. Potrebno je uključiti i promjene na koži i krznu, očima i mukoznim membranama, kao i na respiratornom, cirkulatornom, autonomnom i centralnom nervnom sistemu, promjene somatomotorne aktivnosti i promjene ponašanja. Posebna pažnja obraća se na pojavu tremora, konvulzija, salivacije, dijareja, letargije, pospanosti i kome. Životinje pronađene na samrti ili one koje trpe jak bol ili stres, lišavaju se života na human način. Kada su životinje lišene života iz humanih razloga ili pronađene mrtve, zabilježava se vrijeme smrti.

1.6.1. Tjelesna masa

Individualna tjelesna masa životinja određuje se neposredno prije primjene ispitivane supstance i najmanje jednom nedeljno nakon tog perioda. Bilježe se i iizračunavaju i promjene u tjelesnoj masi. Na kraju ispitivanja mjeri se tjelesna masa preživjelih životinja, a potom se lišavaju života na human način.

1.6.2. Patološka ispitivanja

Sve ispitivane životinje (uključujući i one koje uginu za vrijeme ispitivanja ili su isključene iz ispitivanja zbog dobrobiti životinje) postmortalnose pregledaju. Sve značajne patološke promjene bilježe se za svaku životinju. Mikroskopskim pregledom organa mogu se dobiti korisni podaci, pa se obavlja pregled organa koji su postmortalnim pregledom pokazali značajne patološke promjene i to kod onih životinja koje su preživjele 24 ili više sati nakon prve doze.

2. Podaci

Podaci se prikupljaju za svaku životinju. Svi podaci se tabelarno prikazuju, a za svaku ispitivanu grupu navodi se ukupan broj životinja u grupi, broj životinja koje su pokazale znake toksičnosti, broj životinja koje su pronađene mrtve ili broj onih koje se lišavaju života na human način tokom ispitivanja, vrijeme smrti pojedinačnih životinja, opis i vremenski tok toksičnih efekata i njihovu reverzibilnost, kao i nalaze postmortalnog pregleda.

3. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj sadrži podatke o:

1) ispitivanoj supstanci (fizička svojstva, čistoća, i eventualna fizička i hemijska svojstva uključujući izodnosizaciju, identifikacione podatke, koji uključuju i CAS broj);
2) vehikulumu uz obrazloženje za izbor vehikuluma, ukoliko nije voda;
3) eksperimentalnoj životinji (vrsta/soj, mikrobiološki status životinje, broj, starost i pol životinja, izvor, uslove smještaja, ishrane, itd.).

4) uslovima ispitivanja (detalje o formulaciji ispitivane supstance, uključujući fizičko stanje u kome je primjenjena formulacija, detalje o primjeni ispitivane supstance koji uključuju zapremine doza i vrijeme primjene doze ispitivane supstance, detalje o kvalitetu hrane i vode, obrazloženje za izbor početne doze);
5) Rezultatima (tabelarni prikaz rezultata i primjenjene doze za svaku životinju, tabelarni prikaz tjelesne mase i promjena tjelesne mase, individualnu tjelesnu masu životinja na dan primjene doze ispitivane supstance, zatim u nedeljnim intervalima, i u vrijeme uginuća ili žrtvovanja, datum i vrijeme smrti, ako do nje doĐe prije predviĐenog žrtvovanja, vremenski dijagram pojave znakova toksičnosti, kao i da li su znaci bili reverzibilni za svaku životinju, nalaze postmortalnih pregleda i histopatološke nalaze za svaku životinju, ukoliko su dostupni); 6) diskusiju i tumačenje rezultata; i
7) zaključke.

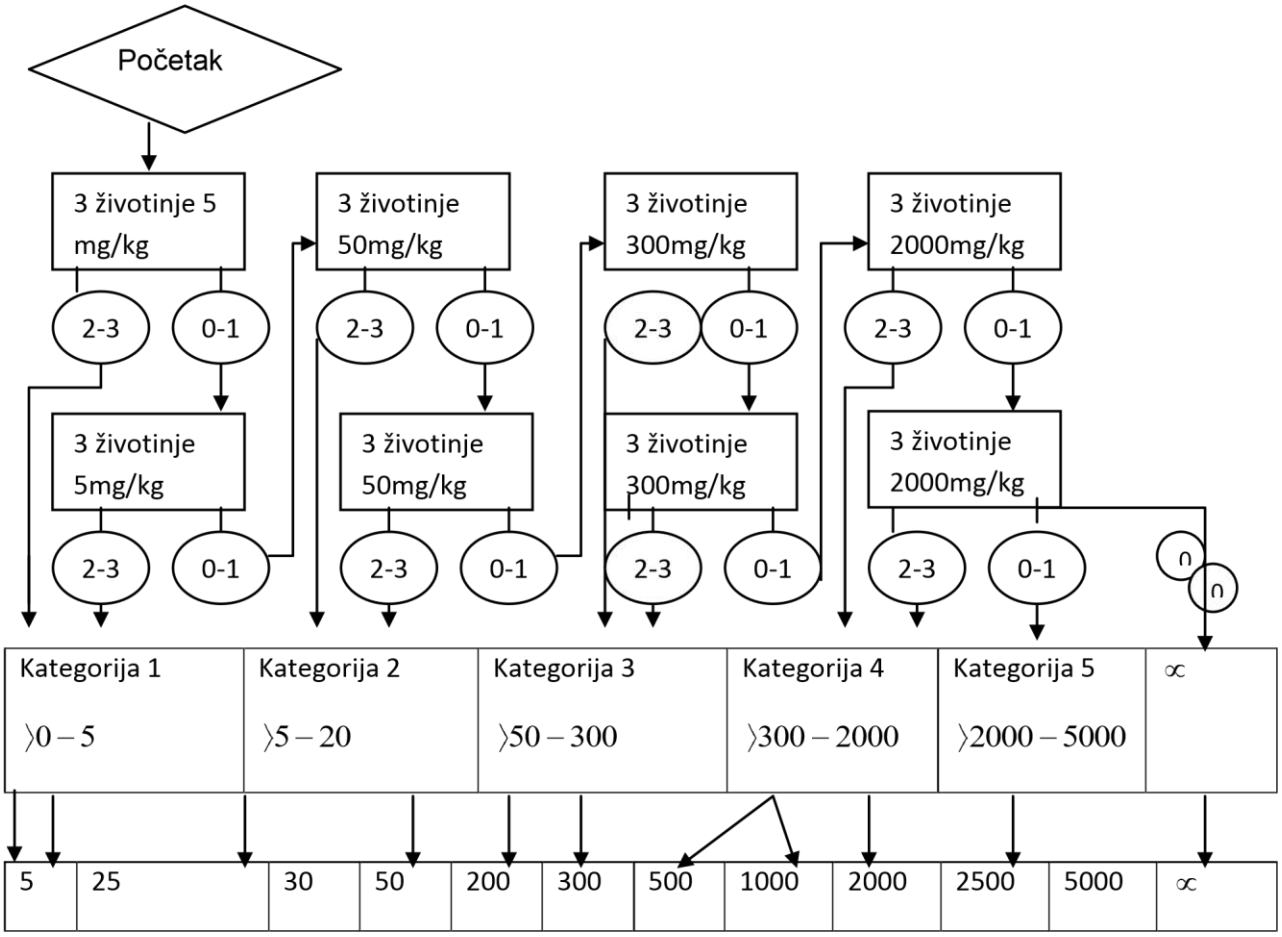
POSTUPCI ZA POČETNE DOZE
DIO II

U Dijelu II date su sheme ispitivanja za svaku početnu dozu:

- Dio III: Početna doza je 5 mg/kg TM
- Dio IV:: Početna doza je 50 mg/kg TM
- Dio V: Početna doza je 300 mg/kg TM
- Dio VI: Početna doza je 2000 mg/kg TM

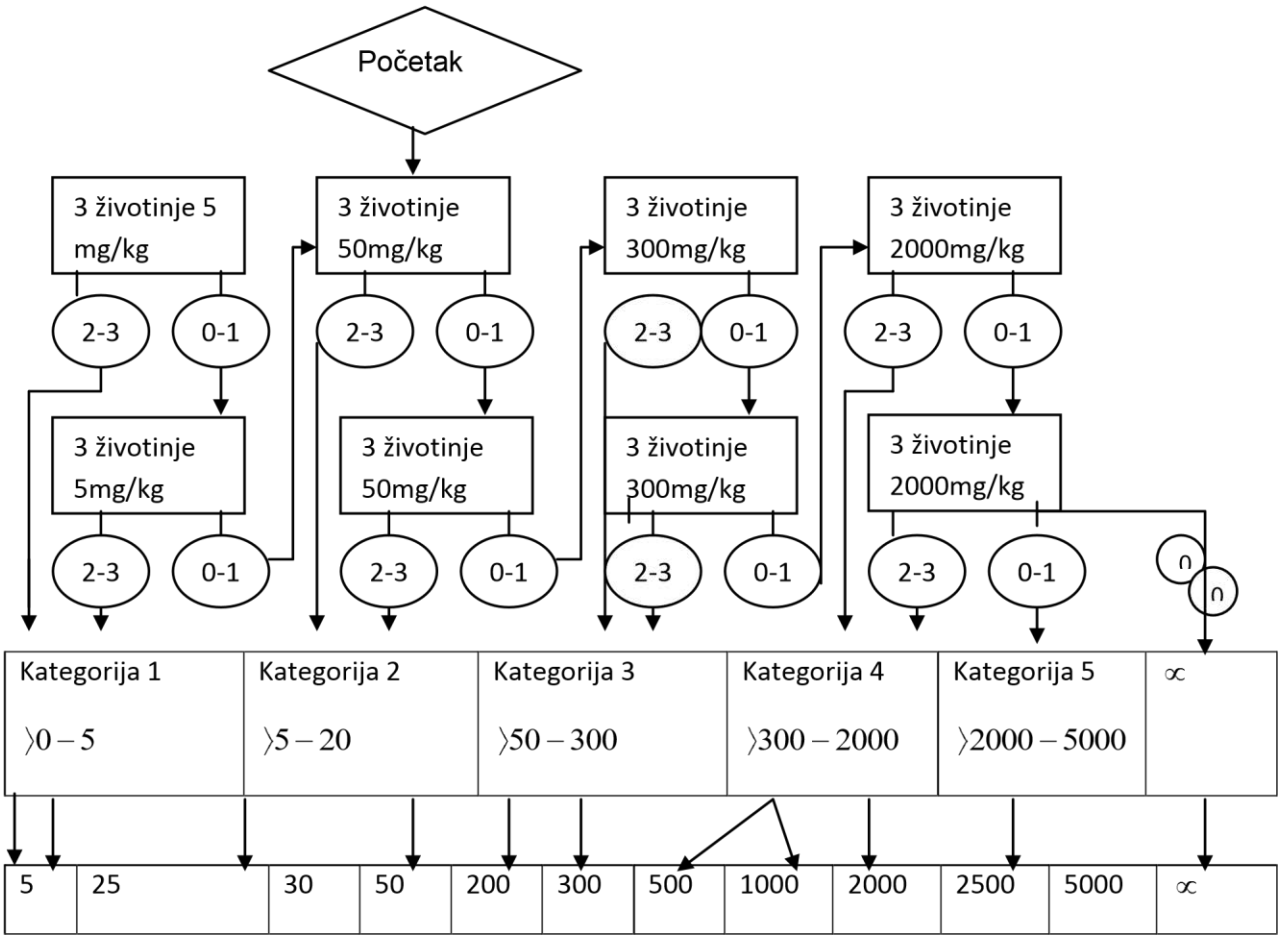
U zavisnosti od broja životinja koje su lišene života na human način postupak ispitivanja označen je strelicama.

POSTUPAK ISPITIVANJA SA POČETNOM DOZOM OD 5 mg/kg TJELESNE MASE
DIO III

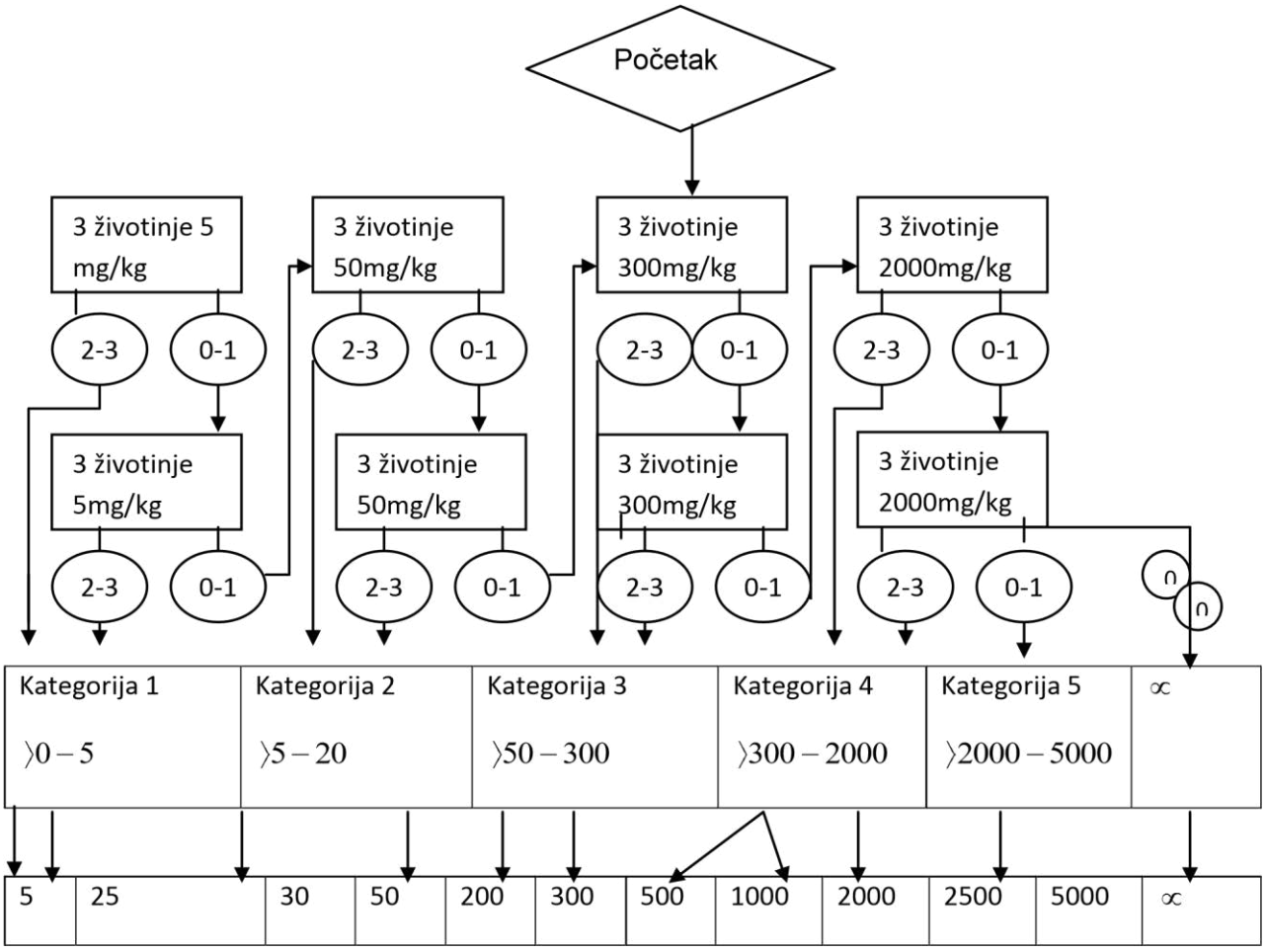


POSTUPAK ISPITIVANJA SA POČETNOM DOZOM OD 50 mg/kg TJELESNE MASE

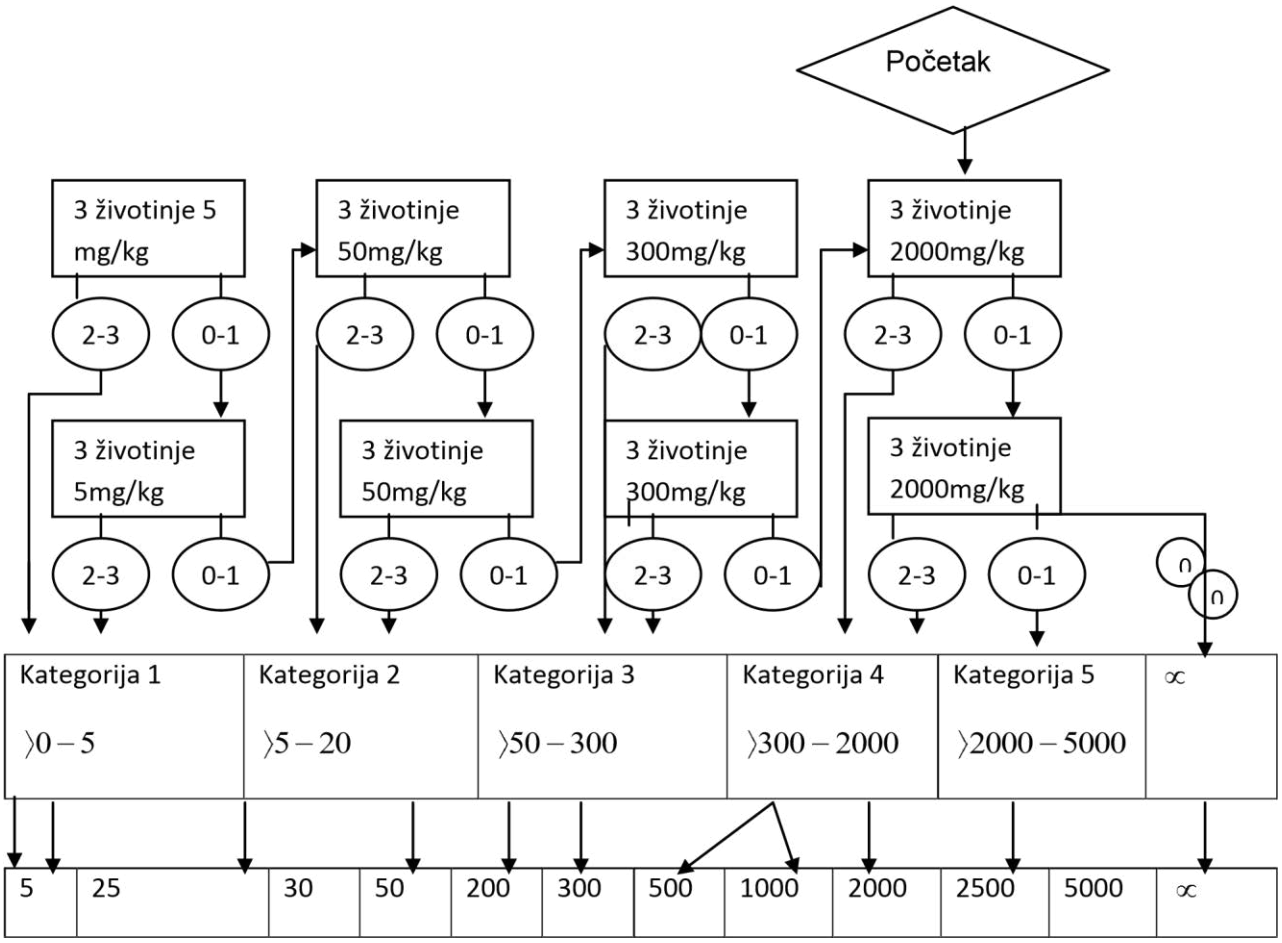
DIO IV


Početak
3 životinje 5 mg/kg
3 životinje 50mg/kg
3 životinje 300mg/kg
3 životinje 2000mg/kg
2-3
0-1
3 životinje 5mg/kg
3 životinje 50mg/kg
3 životinje 300mg/kg
3 životinje 2000mg/kg
Kategorija 1
$\rangle 0-5$
Kategorija 2
$\rangle 5-20$
Kategorija 3
$\rangle 50-300$
Kategorija 4
$\rangle 300-2000$
Kategorija 5
$\rangle 2000-5000$
∝
5
25
30
50
200
300
500
1000
2000
2500
5000
∝

POSTUPAK ISPITIVANJA SA POČETNOM DOZOM OD 300 mg/kg TJELESNE MASE DIO V



POSTUPAK ISPITIVANJA SA POČETNOM DOZOM OD 2000 mg/kg TJELESNE MASE DIO VI



KRITERIJUMI ZA KLASIFIKACIJU ISPITIVANIH SUPSTANCI SA OČEKIVANIM VRIJEDNOSTIMA LD_{50} IZNAD 2.000 mg/kg ZA KOJE SE NE SPROVODI DODATNO ISPITIVANJE

DIO VII

Kriterijum za klasifikaciju u klasu opasnosti akutna toksičnost Kategorija 5 (po GHS-u) omogućava identifikovanje ispitivanih supstanci koje pokazuju nisku akutnu toksičnost, ali koje pod određenim okolnostima predstavljaju opasnost za osjetljive populacije. Ove supstance imaju vrijednosti LD_{50} (peroralno) i LD_{50} (dermalno) u opsegu doza od 2.000 mg/kg do 5.000 mg/kg ili potpuno odgovarajućih doza primjenjenih drugim putevima unosa. Ispitivane supstance klasifikuju se u odgovarajuću kategoriju opasnosti (Kategorija 5 po) ako je: 2.000 mg/kg < LD_{50} < 5.000 mg/kg, u sljedećim slučajevima:

a) ako bilo koja od šema ispitivanja datih u trećem, četvrtom, petom i šestom dijelu ove metode upućuje na ovu kategoriju zbog učestalosti smrtnih slučajeva,
b) ako postoje pouzdani dokazi da je vrijednost LD_{50} u opsegu vrijednosti koji odgovara kategoriji 5; ili ako druge studije toksičnosti sprovedene na životinjama ili ljudima ukazuju na potencijalne akutne toksične efekte na zdravlje ljudi,

c) v) ako se ekstrapolacijom, procjenom ili mjerenjem podataka ne ustanovi pripadnost nekoj višoj klasi opasnosti, a:

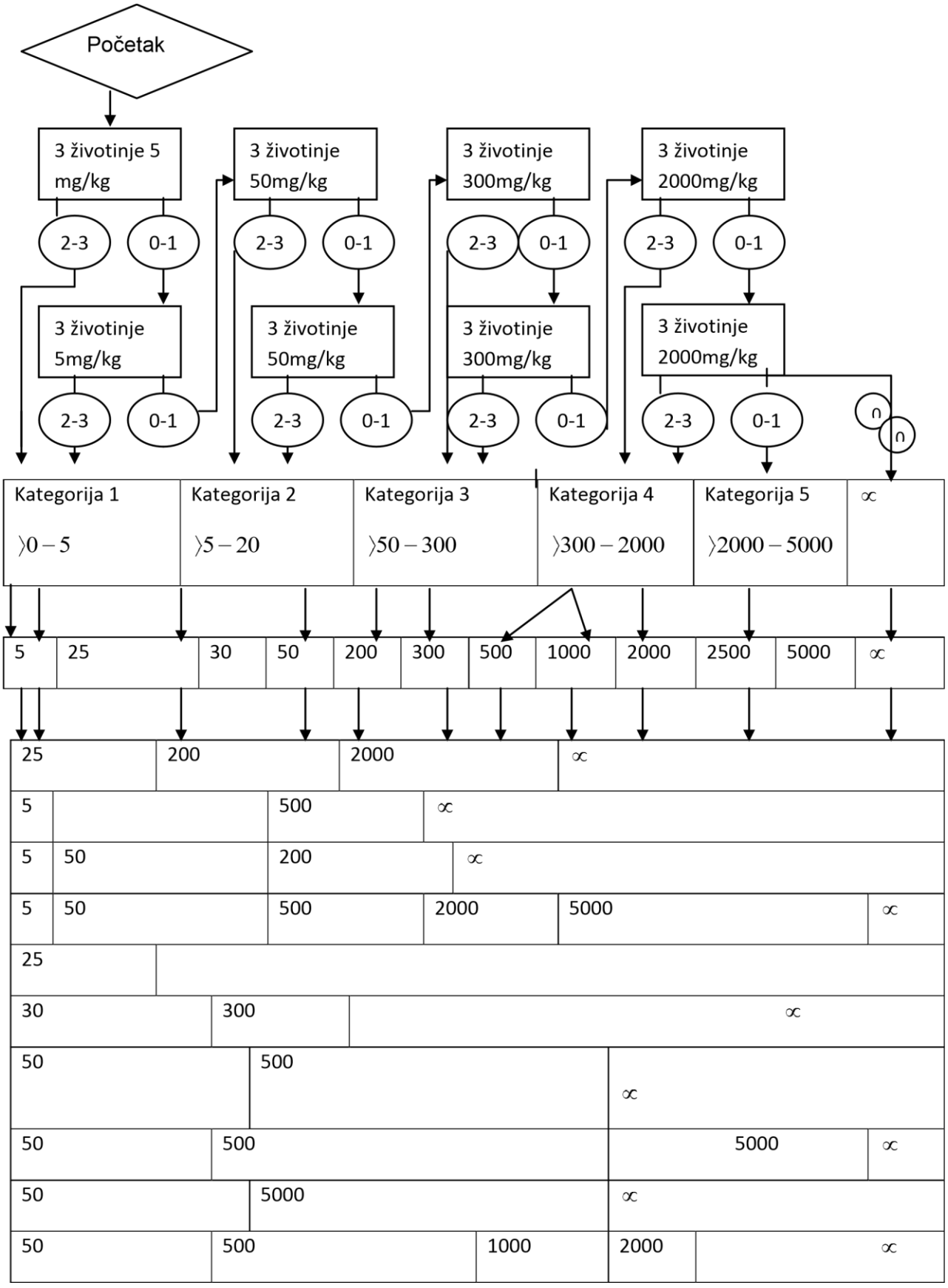
- postoje pouzdani podaci koji ukazuju na značajne toksične efekte kod ljudi ili
- se uoči smrt pri ispitivanjima koja se vrše radi klasifikacije zaključno u Kategoriju 4, peroralnom primjenom odgovarajuće doze ili
- se stručnom procjenom potvrde značajni klinički znaci toksičnosti, pri ispitivanjima koja se vrše radi klasifikacije zaključno u Kategoriju 4, pri čemu klinički znaci ne uključuju dijareju, piloerekciju ili zapušteni izgled ili
- se stručnom procjenom potvrdi postojanje značajnih akutnih toksičnih efekata iz drugih ispitivanja sprovedenih na životinjama.

Ispitivanje doza iznad 2.000 mg/kg

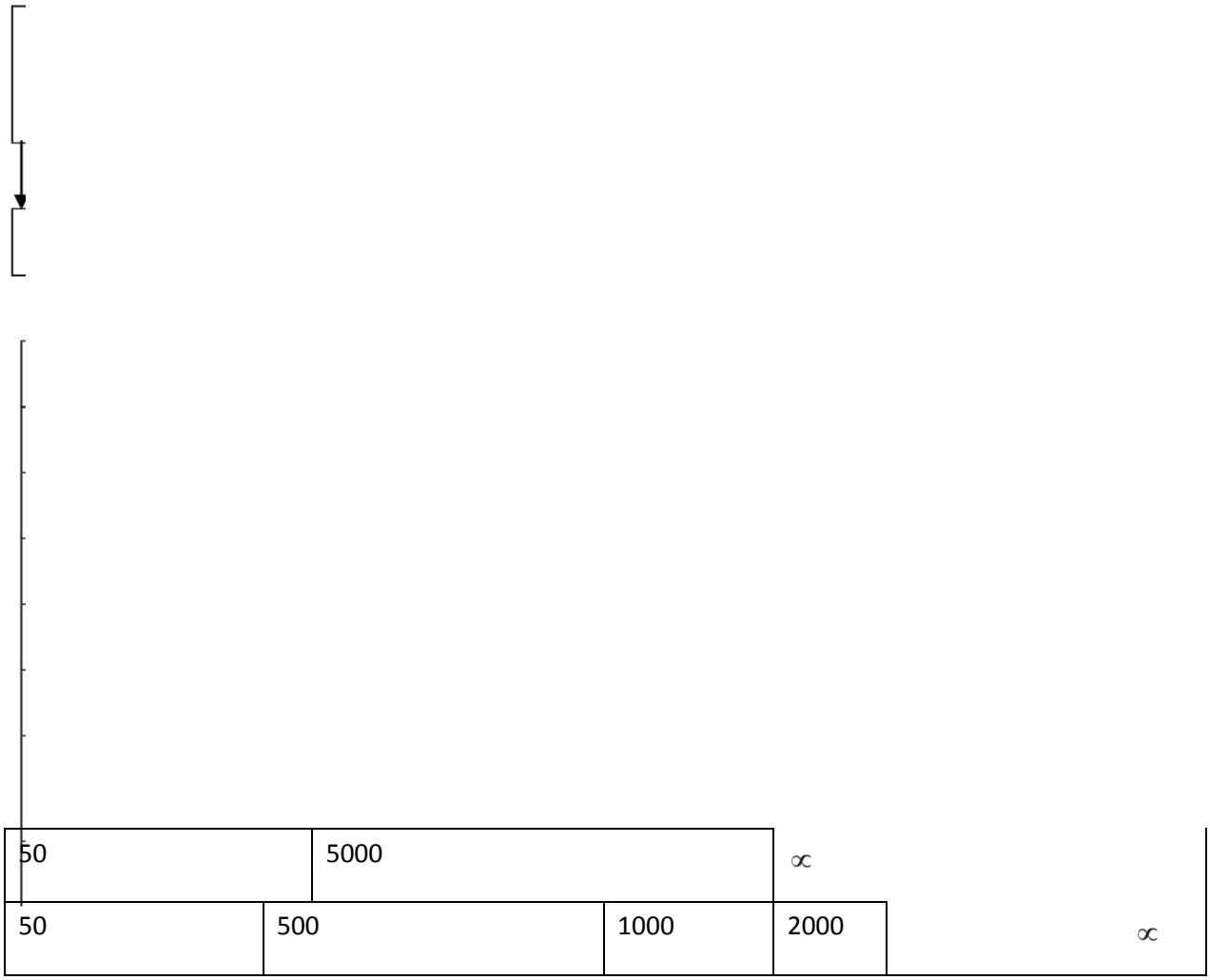
Zbog zaštite životinja i njihove dobrobiti ne sprovodi se ispitivanje doze od 5.000 mg/kg za klasifikaciju u klasu opasnosti akutna toksičnost Kategorije 5 (po GHS-u). Primjena ove doze razmatra se samo u slučajevima kad postoji velika vjerovatnoća da će rezultati ispitivanja imati značajan doprinos zaštiti zdravlja ljudi ili životinja. Dalja ispitivanja sa primjenom visokih doza se ne izvode.

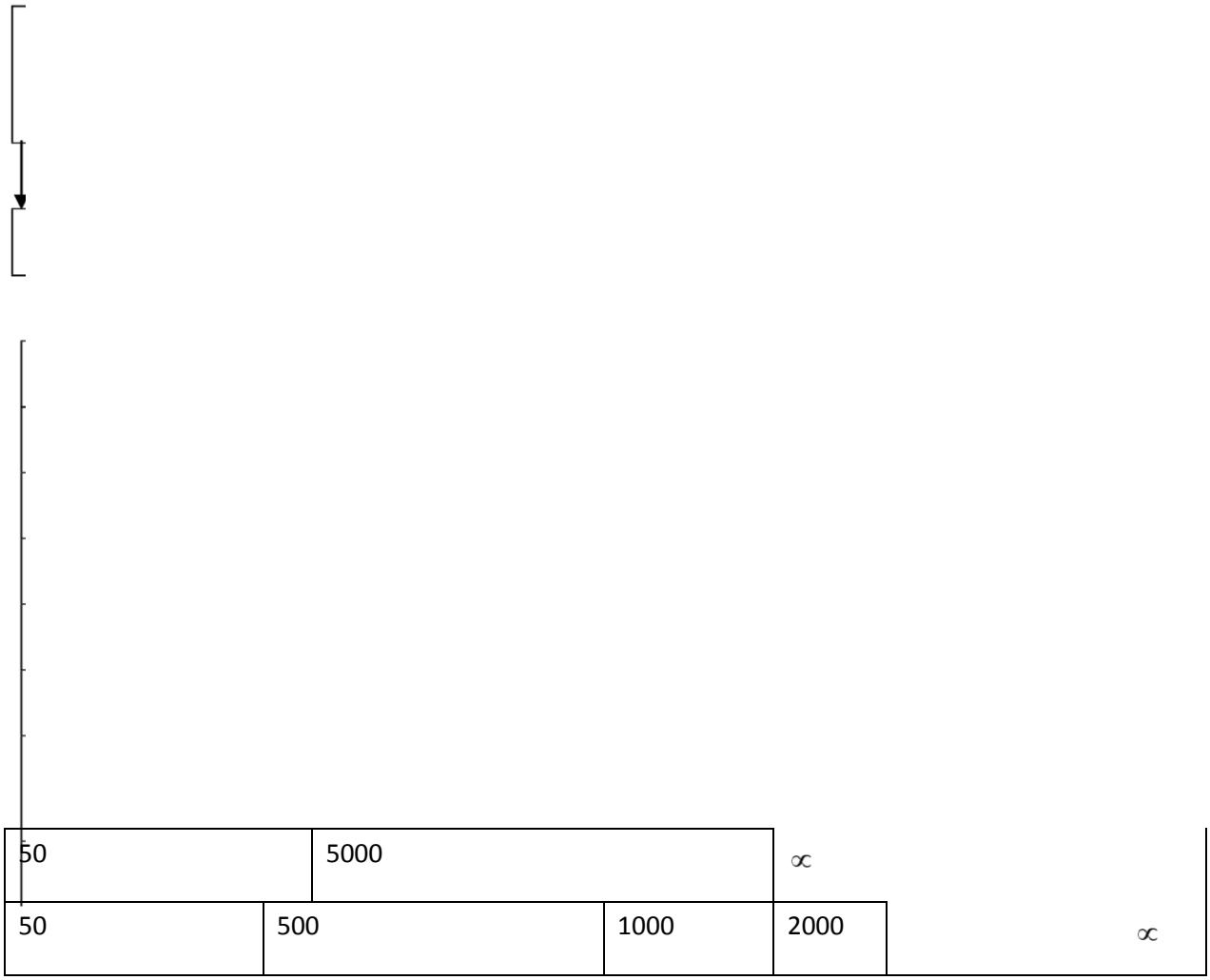
Kada se ispituje doza od 5.000 mg/kg dovoljan je samo jedan korak (npr. tri životinje). Ako ugine prva životinja kojoj se primjenjuje ispitivana supstanca, doza se spušta na 2.000 mg/kg prema pravilima datim u shemi iz drugog dijela ove metode. Ako prva životinja preživi, u ispitivanje se uključuju dodatne dvije životinje. Ako ugine samo jedna od tri životinje, pretpostavlja se da je vrijednost LD_{50} iznad 5.000 mg/kg. Ako uginu dvije životinje, nastavlja se primjena ispitivane supstance u dozi od 2.000 mg/kg.

METODA ISPITIVANJA B.1 tris - SMJERNICE ZA KLASIFIKACIJU
DIO VIII


Početak
3 životinje 5 mg/kg
3 životinje 50mg/kg
3 životinje 300mg/kg
3 životinje 2000mg/kg
2-3
0-1
3 životinje 5mg/kg
3 životinje 50mg/kg
3 životinje 300mg/kg
3 životinje 2000mg/kg
Kategorija 1
$\rangle 0-5$
Kategorija 2
$\rangle 5-20$
Kategorija 3
$\rangle 50-300$
Kategorija 4
$\rangle 300-2000$
Kategorija 5
$\rangle 2000-5000$
∝
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∝
25 200 2000 ∝
5 500 ∝
5 50 200 ∝
5 50 500 2000 5000 ∝
25
30 300 ∝
50 500 ∝
50 500 5000 ∝
50 5000 ∝
50 500 1000 2000 ∝

50	5000	∝		
50	500	1000	2000	∝


50
5000
∝
50
500
1000
2000
∝


50
5000
∝
50
500
1000
2000
∝

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

Potrebno je imati podatke o svojstvima supstance kao što su: raspodjela, veličina čestica, pritisak pare, tačka topljenja, tačka ključanja, tačka paljenja i eksplozivnost (ako se radi o eksplozivnoj supstanci). Opšti uvod (Dio A).

1.2. Referentne supstance

Referentne supstance nijesu date.

1.3. Princip metode

Nekoliko grupa eksperimentalnih životinja izlaže se ispitivanoj supstanci koja se primjenjuje u rastućim koncentracijama kroz definisani vremenski period, tako da se na jednu grupu životinja primjenjuje jedna koncentracija. Bilježe se zapažanja o efektima primjenjenih koncentracija i smrtnost kod životinja. One životinje koje uginu za vrijeme ispitivanja postmortalno se pregledaju. Po završetku ispitivanja i preživjele životinje se žrtvuju i postmortalno pregledaju. One životinje koje pokazuju teške i trajne znake toksičnosti i bola lišavaju se života na human način. Ne primjenjuje se ispitivana supstanca u koncentracijama za koje se pouzdano zna da će kod životinja usled korozivnog ili jakog iritativnog svojstva izazvati značajan bol i patnju.

1.4. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta nijesu dati.

1.5. Opis metode

1.5.1. Priprema

Životinje se čuvaju u odgovarajućim uslovima smještaja i ishrane prema definisanom režimu najmanje pet dana pre početka eksperimenta. Zdrave mlade životinje nasumice se klasifikujeju u prethodno definisani broj grupa. Nije Životinje se ne podvrgavaju simuliranom izlaganju, osim ako to nije posebno navedeno u uputstvu za aparaturu za inhalaciono izlaganje.

Čvrste ispitivane supstance usitnjavaju se do čestica odgovarajuće veličine.

Kada je neophodno,

50	5000	∝	
50	500	1000	2000 ∝

dodaje se vehikulum kojim se postiže odgovarajuća koncentracija ispitivane supstance u atmosferi. Za dodati vehikulum postavlja se i kontrolna grupa. Odabrani vehikulum i drugi aditivi koji se koriste da olakšaju primjenu ispitivane supstance ne izazivaju toksične efekte.

1.5.2. Uslovi ispitivanja

1.6.2.1. Eksperimentalne životinje

Ako ne postoje kontraindikacije, preporučena vrsta je pacov i to sojevi koji se najčešće koriste u laboratorijaskim ispitivanjima. Za oba pola, na početku ispitivanja, opseg u kome se kreće tjelesna masa životinja ne prelazi ± 20 % od srednje vrijednosti.

1.6.2.2.2. Broj i pol

Najmanje 10 glodara (pet ženki i pet mužjaka) koristi se za svaku ispitivanu koncentraciju. Ispitivanje se vrši na ženkama koje nisu ranije rađale i koje nisu gravidne. [20]

1.6.2.3. Koncentracije izlaganja

Koristi se najmanje tri koncentracije ispitivane supstance, a njihov izbor pokriva opseg toksičnih efekata i stope smrtnosti. Podaci omogućavaju konstruisanje krive zavisnosti koncentracije i smrtnosti, i gde je moguće, određivanje vrijednosti LC_{50}.

1.6.2.4. Ispitivanje granične doze

Ako se pet mužjaka i pet ženki izlože koncentraciji od 20 mg/L gasa ili 5 mg/L aerosola ili čestica u trajanju od četiri sata (ili se izlože maksimalnoj mogućoj koncentraciji, kada nije moguće postići ovu koncentraciju zbog fizičkih i hemijskih svojstava uključujući eksplozivna svojstva ispitivane supstance) i pri tome tokom 14 dana ne dođe do smrtnih slučajeva, dalja ispitivanja se obustavljaju.

1.6.2.5. Vrijeme izlaganja

Vrijeme izlaganja je četiri sata.

1.6.2.6. Oprema

[20] U ispitivanjima akutne toksiĉnosti na ţivotinjama višeg reda od glodara, moţe se razmotriti i korišćenje manjeg broja jedinki. Doze moraju paţljivo da se odaberu, uz nastojanje da se izbegnu doze koje su veće od srednjih toksiĉnih doza. U ovakvim ispitivanjima ne smeju da se primjenjuju letalne doze ispitivane supstance.

Životinje se podvrgavaju ispitivanju pomoću opreme koja je dizajnirana tako da omogući dinamički protok vazduha sa najmanje 12 potpunih izmjena u jednom satu, kako bi se omogućila odgovarajuća koncentracija kiseonika i ravnomeran raspored u atmosferi. Kada se koristi komora, ona je dovoljno prostrana za životinje i da omogući maksimalnu izloženost ispitivanoj supstanci udisanjem. Opšte pravilo koje obezbjeđuje stabilnost atmosfere u komori, je da ukupna "zapremina" životinja na koje se primjenjuje ispitivana supstanca nije veća od 5% ukupne zapremine komore. Koristie se različiti tipovi komora koji omogućavaju izloženost čitavog tijela, samo glave ili samo oro-nazalnih otvora životinje. Posljednje dvije komore minimiziraju izloženost ispitivanoj supstanci pri drugim putevima unosa.

1.6.2.7. Vrijeme posmatranja

Posmatranja se obavljaju u trajanju od najmanje 14 dana. Ovaj vremenski interval nije fiksno određen. Njega određuju, između ostalog, toksični efekti, njihova učestalost, kao i vrijeme trajanja oporavka. Vrijeme posmatranja se, po potrebi, i produžava. Zabilježava se vrijeme kod kojeg se jave ili nestanu prvi znaci toksičnosti, kao i vrijeme smrti, pogotovo ako postoji tendencija da vrijeme smrti bude odloženo.

1.5.3. Postupak

Neposredno prije nego što se eksperimentalna životinja izloži ispitivanoj supstanci mjeri se njena tjelesna masa. Životinje se u periodu od četiri sata izlažu ispitivanim koncentracijama u komorama koje su prethodno uravnotežene. Vrijeme potrebno za uravnoteženje koncentracija u komori je kratko. Temperatura na kojoj se obavlja ispitivanje je 22 °C ± 3 °C, a relativna vlažnost između 30% i 70%. U nekim slučajevima (npr. kod ispitivanja aerosola) ovo nije izvodljivo. Održavanjem negativnog pritiska unutar komore (≥ 5 mm vode) spriječiće se curenje isparavane supstance u okolnu zonu. Za vrijeme izlaganja ispitivanoj supstanci životinjama ne daje se hrana i voda. U toku eksperimenta se koriste odgovarajući sistemi za održavanje i praćenje uslova unutar komore. Sistem omogućava stabilne uslove i njihovo uspostavljanje u što kraćem vremenskom roku. Komora je dizajnirana na takav način da omogućava homogenu distribuciju atmosfere za vrijeme ispitivanja. Rade se mjerenja i prate sljedeći parametri:

a) brzina protoka vazduha (neprekidno);
b) koncentracije ispitivane supstance u inhalacionoj zoni najmanje tri puta tokom izlaganja životinja (aerosoli na visokim temperaturama zahtijevaju i češće praćenje).

Tokom perioda izlaganja ispitivanoj supstanci, koncentracije ne variraju više od ± 15 % od srednje vrijednosti. Kod aerosola teško se postiže ovaj nivo kontrole, pa se u tom slučaju tolerišu veće razlike u vrijednostima. Za aerosole se obavlja i analiza veličine čestica (najmanje jedanput u svakoj grupi životinja);

v) temperatura i vlažnost (neprekidno, ako je moguće).

Zapažanja se bilježe sistematično za vrijeme i nakon izlaganja ispitivanoj supstanci, i za svaku životinju vodi se zaseban karton. Prvog dana zapažanja se češće bilježe. Pažljivi klinički pregled životinje se uradi najmanje jedanput svakog radnog dana, a preostala posmatranja bilježe se svakodnevno uz preduzimanje odgovarajućih aktivnosti kojima se na najmanju mjeru

svodi gubitak životinja iz studije. Na uginulim životinjama radi se postmortalni pregled ili se one odlažu na hlaĐenje, a životinje koje su izrazito slabe ili na samrti izdvajaju se iz grupe ili se žrtvuju.

Bilježe se promjene na koži i krznu, očima, mukoznim membranama, respiratornom, cirkulatornom, autonomnom i centralnom nervnom sistemu, kao i somatomotorna aktivnost i način ponašanja. Posvetiti pažnju načinu disanja, tremoru, konvulzijama, salivaciji, dijareji, letargiji, pospanosti i komi kod životinja. Vrijeme smrti bilježi se što preciznije. Tjelesna masa svake pojedinačne životinje određuje se jednom nedeljno nakon prvobitnog izlaganja ispitivanoj supstanci, kao i u vrijeme smrti (žrtvovanja). Životinje koje uginu za vrijeme ispitivanja i one koje prežive do samog kraja postmortalno se pregledaju sa posebnom pažnjom na promjene u gornjem i donjem respiratornom traktu. Sve značajnije patološke promjene se bilježe. Kada je neophodno, uzimaju se i uzorci tkiva za histopatološka ispitivanja.

2. Podaci

Podaci se navode tabelarno. Za svaku ispitivanu grupu životinja navodi se: broj životinja na početku ispitivanja, vrijeme smrti za svaku životinju, broj onih koje su pokazale znake toksičnosti, opis toksičnih efekata i nalazi postmortalnog pregleda. Kada životinje prežive duže od jednog dana iizračunavaju se i bilježe promjene u njihovoj tjelesnoj masi. Životinje koje se lišavaju života na human način, zbog intenziteta izazvanog efekta ili bola, navode se kao uginuća izazvana djelovanjem supstance. Vrijednost LC_{50} određuje se primjenom jedne od standardnih metoda ispitivanja. Procjena podatka uključuje i potencijalnu povezanost između izloženosti životinje ispitivanoj supstanci i učestalosti pojave i težine uočenih abnormalnosti. Navode se i promjene u ponašanju, kliničke promjene, pojava većih oštećenja, promjene tjelesne mase, smrtnost, kao i drugi toksični efekti.

3. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) eksperimentalnoj životinji (vrsta, soj, izvor, uslovi smještaja, ishrana itd);
2) uslovima ispitivanja (npr. opis aparature za inhalaciono izlaganje: dizajn, tip, dimenzije, izvor vazduha, sistem za stvaranje aerosola, metodu za kondicioniranje vazduha i način smještaja životinja u komori kada se koristi. Opisuje se i aparatura za mjerenje temperature, vlažnosti, koncentracije aerosola i određivanje raspodjele veličine čestica);
3) izlaganju ispitivanoj supstanci (navode se tabelarno zajedno sa srednjim vrijednostima i mjerama odstepena (standardna devijacija), a uključuju i podatke o: brzini protoka vazduha, opremi za inhalaciju; temperaturi i vlažnosti vazduha; nominalnoj koncentraciji (ukupnom sadržaju ispitivane supstance u opremi za inhalaciju, podijeljenom sa zapreminom vazduha); prirodi vehikuluma; tačnoj koncentraciji supstance u zoni udisanja; prosječnom aerodinamičkom prečniku (The mass median aerodynamic diameter, MMAD) i geometrijskoj standardnoj devijaciji (The geometric standard deviation, GSD); vremenu predviĐenom za postizanje ravnoteže u komori; vremenu izlaganja)
4) rezultatima (tabelarni prikaz podataka podijeljenih prema polu i nivou izloženosti, vrijeme smrti za vrijeme ili nakon izlaganja, razlozi i kriterijumi za usmrćivanje životinja na human način, sva opažanja, LC_{50} vrijednosti za svaki pol određene na kraju perioda posmatranja, 95% interval pouzdanosti za LC_{50} vrijednosti; kriva zavisnosti doza/smrtnost i nagib, nalazi post-mortalnih pregleda, svi histopatološki nalazi, obrazloženje rezultata i tumačenje rezultata.

3.2. Procjena podataka i tumačenje rezultata

Procjena podataka i tumačenje rezultata dati su u Opšti uvod (Dio G).

1. Metoda ispitivanja

Ekvivalentna međunarodna ispitna metoda navedena je u tabeli 2 dijela 0.

1.1. Uvod

Uvod je dat u Dio A opšteg uvoda.

1.2. Referentne supstance

Referentne supstance nijesu propisane.

1.3. Princip metode

Ispitivana supstanca primjenjuje se na kožu kod više grupa životinja, u rastućim dozama, tako da se jednoj grupi životinja primjenjuje jedna doza. Nakon toga posmatraju se efekti primjenjenih doza i bilježi broj uginulih životinja. Životinje koje uginu tokom ispitivanja post-mortalno se pregledaju. Na kraju ispitivanja i preživjele životinje se žrtvuju i post-mortalno pregledaju.

Životinje koje pokazuju izrazite znake patnje i bola, lišavaju se života na human način. Izbjegava se primjena ispitivane supstance u koncentracijama za koje se pouzdano zna da će kod životinja izazvati znatan bol i patnju usled iritacije ili korozivnog efekta.

1.4. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta nijesu propisani.

1.5. Opis metode

1.5.1. Priprema

Životinje se drže u eksperimentalnim kavezima i hrane se po definisanom eksperimentalnom režimu najmanje pet dana pre početka ispitivanja. Zdrave mlade životinje nasumice se dele u prethodno definisani broj grupa. Približno 24 sata pre početka ispitivanja životinjama se uklanja krzno brijanjem dorzalnog dela tijela. Kod šišanja ili brijanja krzna potrebno je obratiti pažnju da se ne ozledi koža jer bi to moglo da utiče na njenu permeabilnost (propustljivost). Za primjenu ispitivane supstance potrebno je da se pripremi najmanje 10% od ukupne površine kože životinje. Ako se ispituje čvrsta supstanca, koja se po potrebi može usitniti do praha, dobijeni prašak potrebno je dobro ovlažiti vodom ili nekim drugim vehikulomom kako bi se omogućio dobar kontakt sa kožom. Ako se koristi određeni vehikulum, mora se uzeti u obzir i njegov uticaj

na pjenetraciju (prodiranje) ispitivane supstance kroz kožu. Ispitivane supstance koje se već nalaze u tečnom obliku najčešće se koriste nerazblažene.

1.5.2. Uslovi ispitivanja

1.5.2.1. Eksperimentalne životinje

Za ispitivanje najčešće se koriste zečevi ili pacovi. I druge vrste životinja mogu da se koriste, ali to zahtijeva dodatno obrazloženje, budući da se preporučuju već ustaljene životinjske vrste. Na početku ispitivanja, opseg tjelesne mase životinja za svaki pol ne prelazi ± 20% od odgovarajuće srednje vrijednosti.

1.5.2.2. Broj i pol

Najmanje pet životinja koristi se za svaki dozni nivo. Sve životinje su istog pola. Ako se koriste ženke, ispitivanje se vrši na ženkama koje nisu ranije rađale i koje nisu gravidne. Ako postoje podaci na osnovu kojih je pokazano da je određeni pol osjetljivi kod ovakvih ispitivanja, koristi se taj pol. [21]

1.5.2.3. Dozni nivoi

Koristi se najmanje tri doze ispitivane supstance, a njihov izbor je takav da kod ispitivane grupe životinja izazove čitav opseg toksičnih efekata i smrtnost. Kod određivanja primjenjenih doza, se uzimaju u obzir potencijalni iritativni i korozivni efekti. Vodi se računa i o količini dobijenih podataka kako bi se mogla konstruisati kriva doza/odgovor, a gde je to moguće, određuje se i vrijednost LD_{50}.

1.5.2.4. Ispitivanje granične doze

Ispitivanje granične doze pri jednom doznom nivou može da se izvodi primjenom ispitivane supstance od 2.000 mg/kg TM na grupi od pet mužjaka i pet ženki, prema postupku koji se zasniva na Metodi ispitivanja iz tačke 1.5.3. Ako dođe do smrti usled primjene navedene doze ispitivane supstance, razmarta se cijela studija.

1.5.2.5. Period posmatranja

Period posmatranja traje najmanje 14 dana. Ovaj vremenski period nije strogo određen. Njega određuju, između ostalog, toksične reakcije, njihova učestalost, kao i vrijeme trajanja oporavka. Vrijeme posmatranja može da se produži. Važno je da se zabilježi vrijeme pojave ili nestanka prvih znaci toksičnosti, kao i vrijeme smrti, pogotovo ako se primjeti da je vrijeme smrti odloženo.

1.5.3. Postupak

[21] U ispitivanjima akutne toksičnosti na životinjama višeg reda od glodara, može da se razmotri i korišćenje manjeg broja životinja. Doze moraju pažljivo da se odaberu, i ne treba da se koriste doze veće od srednje toksičnih doza. U ovakvim ispitivanjima izbegavaju se letalne doze ispitivane supstance.

Životinje se drže u kavezima za pojedinačno i odvojeno držanje. Ispitivana supstanca primjenjuje se ravnodnosno preko površine koja iznosi otprilike 10% od ukupne površine kože. Za primjenu veoma toksičnih supstanci, izložena površina može da bude i manja, ali se u tom slučaju vodi računa da se primjenjeni sloj ravnodnosno rasporedi u što tanjem sloju.

Ispitivana supstanca drži se u kontaktu sa kožom tokom 24 sata pomoću porozne gaze na koju se nanosi, pri čemu se gaza ljepljivom trakom-flasterom prilijepi na kožu životinje. Mjesto primjene dodatno se može prekriti kako bi se osiguralo da ispitivana supstanca ne dođe u kontakt sa ustima životinje. Ako je neophodno, na životinju se stavljaju i dodatni štitnici kojima se sprječava peororalno unošenje ispitivane supstance. Ne preporučuje se potpuna imobilizacija životinje.

Nakon propisanog vremena izlaganja ispitivanoj supstanci, uklanja se višak ispitivane supstance ili vodom gde je to moguće ili nekim drugim odgovarajućim načinom za čišćenje kože.

Zapažanja se bilježe sistematično. Za svaku životinju vodi se zasebni karton. Prvog dana zapažanja se češće bilježe. Pažljivi klinički pregled životinje se radi najmanje jedanput svakog radnog dana, a preostala posmatranja bilježe se svakodnevno uz preduzimanje odgovarajućih aktivnosti kojima se na najmanju mjeru svodi gubitak životinja iz studije. Na uginulim životinjama se uradi post-mortalni pregled ili se one odlažu na hlađenje, a životinje koje su izrazito slabe ili na samrti izdvajaju se iz grupe ili žrtvuju.

Bilježe se promjene na koži i krznu, očima, mukoznim membranama, respiratornom, cirkulatornom, autonomnom i centralnom nervnom sistemu, kao i somatomotorna aktivnost i način ponašanja. Posvetiti načinu disanja, tremoru, konvulzijama, salivaciji, dijareju, letargiji, pospanosti i komi kod životinja. Vrijeme smrti bilježi se što preciznije. Životinje koje uginu za vrijeme ispitivanja i one koje ostanu žive do samog kraja post-mortalno se pregledaju. Sve značajnije patološke promjene se zabeleže. Kada postoje indikacije, uzimju se i uzorci tkiva za histopatološka ispitivanja.

Procjena toksičnosti kod suprotnog pola:

Po završetku studije u kojoj se koriste životinje samo jednog pola, ista doza ispitivane supstance primjenjuje se na najmanje jednu grupu od pet životinja suprotnog pola da bi se utvrdilo da li suprotni pol pokazuje veću osjetljivost pri primjeni ispitivane supstance razmatra se i korišćenje manjeg broja životinja, zavisno od okolnosti. Kada su dostupni odgovarajući podaci na osnovu kojih je pokazano da je pol životinja koje su odabrane u prvobitnom ispitivanju značajno osjetljivi na ispitivanu supstancu, izostavlja se ispitivanje na životinjama suprotnog pola.

2.Podaci

Podaci se navode tabelarno. Za svaku ispitivanu grupu životinja navodi se: broj životinja na početku ispitivanja, vrijeme smrti za svaku životinju, broj onih koje su pokazale znake toksičnosti, opis toksičnih efekata i nalaze postmortalnog pregleda. Individualna tjelesna masa životinja mjeri se i bilježi neposredno prije primjene ispitivane supstance, zatim jednom

nedeljno, i u vrijeme smrti. Kada životinje prežive duže od jednog dana iizračunavaju se i bilježe promjene u njihovoj tjelesnoj masi. Životinje koje se lišavaju života na human način, zbog intenziteta patnje ili bola, navode se kao uginuća izazvana djelovanjem supstance. Vrijednost LD_{50} određuje se jednom od standardnih metoda ispitivanja.

Procjena podatka uključuje i potencijalnu povezanost između izloženosti životinje ispitivanoj supstanci i učestalosti pojave i težine uočene abnormalnosti. Navode se promjene u ponašanju, kliničke promjene, pojava većih oštećenja, promjene tjelesne mase, smrtnost kao i drugi toksični efekti.

2. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1. eksperimentalnoj životinji kao što su: vrsta, soj, izvor, uslovi smještaja, ishrana itd.
2. uslovima ispitivanja:
   - način korišćen za čišćenje kože i tip obloga; okluzivni ili ne-okluzivni;
   - dozni nivoi (koncentracija vehikuluma, ako je korišćen);
   - pol eksperimentalnih životinja;

3. rezultatima:

- tabelarni prikaz podataka koji su podijeljeni prema polu i doznim nivoima (broj uginulih ili žrtvovanih životinja tokom trajanja ispitivanja; broj životinja koje su pokazale znake toksičnosti; broj izloženih životinja, itd.);
- vrijeme smrti nakon izlaganja, uzroci i kriterijumi za lišavanje života na human način; - sva posmatranja;
- vrijednost LD_{50} za onaj pol životinja koji je korišćen u ispitivanju, određen nakon 14 dana primjenom propisane metode ispitivanja;
- 95% interval pouzdanosti za LD_{50} vrijednosti (kada je moguće);
- kriva zavisnosti doza/smrtnost i nagib (kada metoda omogućava njeno konstruisanje); - nalazi postmortalnog pregleda;
- histopatološki nalazi;
- obrazloženje rezultata (posebna pažnja se posveti uticaju koje lišavanje života na human način za vrijeme ispitivanja može da ima na izračunatu vrijednost LD_{50});
- tumačenje rezultata.

B.5. AKUTNA TOKSIČNOST: IRITACIJA/TEŠKO OŠTEĆENJE OKA

DIO I

1. Metoda ispitivanja

Metoda ispitivanja akutne toksičnosti: iritacija/teško oštećenje oka zasniva se na metodi OECD: TG 405 (2002). Ekvivalentna međunarodna ispitna metoda navedena je u tabeli 2 dijela 0.

1.1. Uvod

U pripremi ažurirane verzije ove metode ispitivanja posebna pažnja posvećena je mogućim poboljšanjima u odnosu na dobrobit životinja, kao i na procjenu svih postojećih podataka o ispitivanoj supstanci, sa ciljem da se izbjegnu nepotrebna ispitivanja na životinjama. Metoda ispitivanja zasniva se na preporuci da se prije in vivo ispitivanja akutnog iritativnog/korozivnog oštećenje oka obavi analiza kvaliteta postojećih podataka. Kada nema dovoljno podataka, moguće je dobiti ih primjenom ispitivanja korak po korak. Strategija ispitivanja uključuje i obavljanje validovanih i prihvaćenih in vitro ili ex vivo ispitivanja koja su opisana u trećem dijelu ove metode. Prije izvoĐenja in vivo ispitivanja oka preporučuje se korišćenje in vivo ispitivanja iritacije/korozivnog oštećenja kože koja predviđaju iritaciju oka.

U interesu naučne zasnovanosti i dobrobiti životinja je da se in vivo studije započinju nakon procjene svih dostupnih podataka koji su relevantni za procjenu potencijala supstance da izazove iritaciju/teško oštećenje oka. Takvi podaci proizlaze iz prethodno dobijenih nalaza kod ljudi odnosno sprovedenih ispitivanja na laboratorijaskim životinjama, iz dokaza o iritaciji /korozivnom oštećenju jedne ili više strukturno sličnih supstanci ili smješa takvih supstanci, ali i iz podataka koji ukazuju na jaku kiselost ili baznost ispitivane supstance, ili iz prethodno već validovanih i prihvaćenih in vitro ili ex vivo ispitivanja iritacije/korozivnog oštećenja kože. Studije se sprovode ranije ili da nastanu kao rezultat analize kvaliteta postojećih podataka.

Za neke supstance analiza ukazuje na potrebu za in vivo ispitivanja potencijala supstance za iritaciju/teškog oštećenja oka. U svim takvim slučajevima, prije in vivo ispitivanja efekata na oku, preporučuje se in vivo ispitivanje efekata na koži u skladu sa metodom ispitivanja B.4. koja je sastavni dio ovog priloga. Primjena analize kvaliteta postojećih podataka i studije ispitivanja korak po korak smanjuje potrebu za in vivo ispitivanjima iritacije/teškog oštećenja oka za supstance za koje postoje dovoljno podataka iz drugih studija. Ako potencijal supstance da izazove iritaciju/teško oštećenje oka ne određuje se korišćenjem metode ispitivanja korak po korak čak ni nakon ispitivanja iritacije/korozivnog oštećenja kože, pristupa se in vivo ispitivanju iritacije/teškog oštećenja oka.

U Dio III ove metode data je strategija ispitivanja korak po korak koja uključuje i obavljanje validovanih i prihvaćenih in vitro ili ex vivo ispitivanja iritacije/korozivnog oštećenja. Ova strategija se preporučuje prije bilo kakvih in vivo ispitivanja. Za nove supstance, ispitivanje korak po korak je preporučeni pristup za dobijanje naučno zasnovanih podataka o njihovim iritativnim/korozivnim efektima. Za supstance koje su već obuhvaćene ispitivanjima, ista strategija se koristi za upotpunjavanje podataka o iritativnim/korozivnim efektima na oko i kožu. Primjenu drugačije strategije ispitivanja ili postupka, ili odluku da se ne primjeni ova usvojeno ispitivanje korak po korak, objašnjava se i obrazlaže.

1.2. Definicije

Iritacija oka je nastanak promjena u oku do kojih dolazi nakon primjene ispitivane supstance na poljašnju površinu oka, koje su potpuno reverzibilne u periodu od 21 dana nakon primjene. Teško oštećenje oka je oštećenje tkiva oka ili ozbiljno pogoršanje vida nakon primjene ispitivane supstance na poljašnju površinu oka, koje nije potpuno reverzibilno u periodu od 21 dana nakon primjene.

1.3. Princip metode

Supstanca koja se ispituje primjenjuje se u jednoj dozi u jedno oko eksperimentalne životinje. Netretirano oko služi kao kontrola. Stepen iritacije/teškog oštećenja oka procjenjuje se ocjenjivanjem lezija konjuktive, rožnjače i dužice, u prethodno određenim vremenskim intervalima. Da bi se obezbijedila kompletna procjena efekata opisuju se i druge promjene na oku i sistemski štetni efekti. Ispitivanje traje dovoljno dugo da se procjeni reverzibilnost ili ireverzivbilnost efekata.

Životinje koje u bilo kom dijelu ispitivanja pokazuju stalne znake patnje odnosno bola lišavaju se života na human način, a supstanca se procjenjuje u skladu sa tim. Kriterijumi za donošenje odluke o lišavanju života na human način životinja koje su na samrti i pokazuju znake izrazite patnje.

1.4. Opis metode

1.4.1. Priprema za in vivo ispitivanje

1.4.1.1. Izbor životinja

Koriste se zdrave mlade jedinke albino zečeva. Ukoliko se koristi druga životinjska vrsta, navode se razlozi za to korišćenje.

1.4.1.2. Priprema životinja

Kod svake eksperimentalne životinje koja je prethodno odabrana za ispitivanje pregledaju se oba oka 24 sata prije početka ispitivanja. Životinje kod kojih je uočena iritacija oka, nedostatak ili već postojeća povreda rožnjače ne koriste se za ispitivanje.

1.4.1.3. Uslovi smještaja i ishrana

Životinje se smještaju u odgovarajući smještaj za pojedinačno i odvojeno držanje. Temperatura smještajnog prostora u kome se drže zečevi se održava na 20°C (± 3°C). Relativna vlažnost vazduha je najmanje 30% i da ne prelazi 70% (osim u slučajevima kada se prostorija sa životinjama čisti). Idealna vlažnost je između 50% i 60%. Osvjetljenje je vještačko i to u intervalima od 12 sati svijetla i 12 sati mraka. Životinje se hrane uobičajenom hranom za laboratorijaske životinje, sa slobodnim pristupom vodi za piće.

1.4.2. Postupak ispitivanja

1.4.2.1. Primjena ispitivane supstance

Ispitivana supstanca primjenjuje se u konjuktivalnu kesu jednog oka svake životinje nakon što se lagano povuče donji kapak očne jabučice. Kapci se zatim nježno jedinjenjee na otprilike jednu sekundu da bi se spriječio gubitak supstance. Drugo oko, koje nije tretirano supstancom, služi za kontrolu.

1.4.2.2. Ispiranje

Oči životinja najmanje 24 sata od primjene se ne ispiraju, osim ako se primjenjuje čvrsta supstanca (tačka 1.4.2.3.2. ove metode) i u slučaju neposrednog korozivnog ili iritativnog efekta. Nakon 24 sata od primjene, ukoliko se procjeni da je potrebno, oko se ispera. Ne koriste se propratne grupe životinja za istraživanje uticaja koji se javljaju nakon ispiranja, osim ukoliko je naučno opravdano. Ako je potrebno koristiti propratnu grupu životinja, uzimaju se dva zečeva. Uslovi ispiranja pažljivo se dokumentuju, npr. vrijeme ispiranja, sastav i temperatura tečnosti za ispiranje; trajanje, intenzitet i brzina primjene.

1.4.2.3. Dozni nivoi

1.4.2.3.1. Ispitivanje tečnosti

Za ispitivanje tečnosti koristi se doza ispitivane supstance u zapremini od 0,1 mL. Za ukapavanje supstance direktno u oko ne koriste se sprejevi sa pumpicom. Tečni sprej se istiskuje i sakuplja u bočice prije ukapavanja 0,1 mL u oko.

1.4.2.3.2. Ispitivanje čvrstih supstanci

Kada se ispituje čvrsta supstanca, pasta, supstance u obliku čestica zapremina koja se koristi je 0,1 mL ili je to masa koja nije veća od 100 mg. Ispitivana supstanca je usitnjena u fini prah. Količina čvrste supstance mjeri se nakon što je pažljivo sabijena i stavljena u posudu za mjerenje. Ako se kod prvog posmatranja koje je se obavlja jedan sat nakon nanošenja čvrste ispitivane supstance uoči da ona nije odstranjena iz oka životinje pomoću fizioloških mehanizama, oko se ispira fiziološkim rastvorom ili destilovanom vodom.

1.4.2.3.3. Ispitivanje aerosola

Preporučuje se prikupljanje svih sprejeva sa pumpicom i aerosola prije nanošenja (ukapavanja) u oko. Izuzetak su supstance u aerosol bočicama pod pritiskom, koje se zbog isparavanja ne prikupljaju unaprijed. U tim slučajevima oko se drži otvoreno i ispitivana supstanca se nanosi u jednom potezu direktno u oko u trajanju oko jedne sekunde, sa udaljenosti od 10 cm. Ova udaljenost može da varira, u zavisnosti od pritiska spreja i njegovog sastava. Vodi se računa da pritisak u spreju ne ošteti oko. U nekim slučajevima, postoji potreba za procjenom mogućnosti za "mehaničko" oštećenje oka koje su izazvale sile spreja.

Procjena doze ispitivane supstance spreja utvrđuje se simuliranjem ispitivanja na sljedeći način: supstanca se naprska po papiru za mjerenje kroz otvor veličine oka zečeva. Povećanje mase papira približno je dozi koja je naprskana u oko. Kod isparljivih supstanci, doza se utvrđuje mjerenjem bočice prije i nakon prskanja ispitivane supstance.

1.4.2.4. Inicijalno ispitivanje

(In vivo ispitivanje iritacije/teškog oštećenja oka na jednoj životinji)

Primjenjuje se in-vivo ispitivanje na jednoj životinji opisano u strategiji ispitivanja korak po korak (Dio III ove metode). Ako rezultati pokažu da supstanca izaziva teško oštećenje ili jaku iritaciju oka pri korišćenju propisane metode, ne sprovode se dalja ispitivanja na oku.

1.4.2.5. Lokalni anestetici

Lokalni anestetici se koriste zavisno od slučaja. Ako analize kvaliteta postojećih podataka ukazuju da supstanca izaziva bol ili inicijalno ispitivanje pokaže prisustvo bolnih reakcija, prije nanošenja ispitivane supstance se upotrebljava lokalni anestetik. Vrsta, koncentracija i doza lokalnog anestetika bira se pažljivo, da se spriječe odstepena u reakciji na ispitivanu supstancu zbog njegovog korišćenja. Kontrolno oko je takođe pod lokalnom anestezijom.

1.4.2.6. Ispitivanje kojim se potvrđuje

(In vivo ispitivanje iritacije oka na dodatnim životinjama)

Ako u inicijalnom ispitivanju nije uočeno teško oštećenje oka, iritacija ili negativan rezultat, ono se potvrđuje korišćenjem najviše dvije dodatne životinje. Ukoliko se u inicijalnom ispitivanju uoči značajna iritacija koja ukazuje da se ponavlja jak (ireverzibilan) efekat i u ispitivanju kojim se potvrđuje, ispitivanje kojim se potvrđuje se izvodi postepeno, prvo na jednoj pa na drugoj životinji, prije nego da se ispitivanje izvodi na obije životinje istovremeno. Ako druga životinja pokaže znake iritacije ili teškog oštećenja oka, ispitivanje se ne nastavlja. Dodatne životinje mogu da budu potrebne kada se utvrĐuju znaci slabe ili srednje teške iritacije.

1.4.2.7. Period posmatranja

Posmatranje traje dovoljno dugo da bi se u potpunosti utvrdio značaj i reverzibilnost uočenih efekata. Eksperiment se obustavlja uvjek kada životinja pokazuje neprekidne znake bola ili patnje. Da bi se utvrdila reverzibilnost efekata, životinje se posmatraju 21 dan nakon primjene supstance. Ako se prije isteka 21-og dana uoči da su efekti reverzibilni, eksperiment se prekida.

1.4.2.7.1. Klinička posmatranja i ocjenjivanje reakcija na oku

Pregled očiju obavlja se nakon 1 sata, 24 sata, 48 sati i 72 sata od primjene supstance. Životinje se ne drže u ispitivanju nakon što se dobiju definitivni podaci. Životinje koje pokazuju neprekidne znake jakog bola ili patnje lišavaju se života na human način bez odlaganja, a supstanca se procjenjuje u skladu sa tim. Životinje koje se nakon primjene ispitivane supstance lišavaju života na human način imaju sljedeća oštećenja oka: perforirana rožnjača ili jaka ulceracija rožnjače koja obuhvata stafilom, krv u prednjoj komori oka, četvrti stepen zamućenja rožnjače koji traje 48 sati, nedostatak refleksa na svijetlost (ocjena 2 reakcije irisa koji traje 72 sat, ulceracija membrane konjuktive, nekroza konjuktive ili membrane sa trepavicama ili deskvamacija. Razlog za lišavanje života na human način je što su ove lezije (oštećenja) uglavnom trajne. Životinje kod kojih se lezije oka ne razviju, se tretiraju tek nakon trećeg dana od primjene.
Životinje sa slabim do srednje teškim oštećenjima posmatraju se do uočavanja jasne lezije ili tokom 21 dan, nakon čega se ispitivanje prekida. Posmatranja se obavljaju 7 dana, 14 dana i 21 dan da bi se utvrdio obim oštećenja i njihova reverzibilnost ili ireverzibilnost.

Ocjenjivanje reakcije na oku (konjuktiva, rožnjača i dužica) je zabilježeno kod svakog ispitivanja (Dio II ove metode). Sva druga oštećenja oka (panus, prebojenost) i druge promjene se navode.

Ispitivanje reakcija vrši se uz korišćenje binokularne lupe, ručne slit-lampe, biomikroskopa ili drugog odgovarajućeg pribora. Nakon bilježenja rezultata posmatranja nakon 24 sata, oči se dodatno pregledaju flourescentnom lampom.

Ocjenjivanje nalaza na oku po svojoj prirodi je subjektivno. Kako bi se podstaklo da ocjenjivanje nalaza oka bude usklaĐeno meĐu različitim laboratorijaama, potrebno je da se osoblje laboratorijaa adekvatno obuči za ocjenjivanje i tumačenje rezultata.

2. Podaci

2.2. Procjena rezultata

Ocjena iritacije oka procjenjuje se u skladu sa prirodom i težinom lezija i njihovom reverzibilnošću ili ireverzibilnošću. Pojedinačne ocjene same za sebe ne ukazuju na iritativna svojstva hemikalije, budući da se procjenjuju i ostali efekti. Pojedinačne ocjene se posmatraju kao preporuka i značajne su samo ukoliko su podržane potpunim opisom i procjenom svih uočenih efekata.

3. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) Razlozima za in vivo ispitivanje:
- analiza procjene kvaliteta postojećih podataka, uključujući i rezultate strategije ispitivanja korak po korak;
- opis relevantnih podataka dobijenih iz prethodnih ispitivanja;
- podaci dobijeni iz svakog koraka strategije ispitivanja;
- opis in vitro izvedenih ispitivanja uključujući detalje o postupku i rezultate dobijene za ispitivanu/referentnu supstancu;
- opis in vivo izvedene studije iritacije/teškog oštećenja oka, uključujući dobijene rezultate;
- analiza kvaliteta podataka za izvoĐenje in vivo studije. 2) Ispitivanoj supstanci:
- identifikacioni podaci (npr. CAS broj, porijeklo, čistoća, poznate nečistoće, broj serije);
- fizičko stanje i fizička i hemijska svojstva (npr. pH, isparljivost, rastvorljivost, stabilnost, hemijska reakcija sa vodom);
- kod smješa: sastav i relativni procenti sastojaka;
- ako se koristi lokalni anestetik: identifikacija, čistoća, tip, doza, eventualna interakcija sa supstancom.

3) Vehikulumu, kao što su identifikacija, koncentracija (po potrebi), zapremina koja se koristi i opravdanost za izbor vehikuluma.

4) Eksperimentalnim životinjama:
- vrsta/soj, razlog za korišćenje druge vrste a ne albino zečeva;
- starost svake životinje na početku studije;
- broj životinja oba pola u ispitivanju i kontrolnim grupama (po potrebi); - tjelesna masa pojedinačnih životinja na početku i kraju ispitivanja;
- izvor životinja, uslovi smještaja, ishrana itd. 5) Rezultatima:
- opis metode koja je korišćena za ocjenjivanje reakcije pri svakom vremenu posmatranja (npr. ručna slit-lampa, biomikroskop, fluorescentno svetlo);

- tabelarni prikaz nalaza iritacije/teškog oštećenja za svaku životinju pri svakom vremenu posmatranja do uklanjanja životinje iz ispitivanja;
- opis stepena i prirode uočene iritacije ili teškog oštećenja;

opis drugih uočenih lezija na oku (npr. vaskularizacija, formiranje panusa, prebojenost, adhezija);

- opis svih lokalnih efekata koji nisu na oku i sistematskih štetnih efekata, i histopatološki nalazi ukoliko ih ima. - tumačenje rezultata.

3.2. Tumačenje rezultata

Rezultati studije iritacije oka na laboratorijaskim životinjama mogu se ekstrapolisati na ljude, i validni su u ograničenom stepenu. U mnogim slučajevima albino kunić pokazuje veću osjetljivost na iritanse ili korozive oka od čovijeka.

Tumačenje rezultata mora da bude precizno da bi se isključila iritacija koja je rezultat sekundarne infekcije.

OCJENJIVANJE OŠTEĆENJA OKA
DIO II

Rožnjača

Zamućenost: stepen zamućenosti (očitava se nalaz sa mjesta najveće gustine)[22]

Nema ulceracija ni zamućenja.....0
Rasute ili difuzne površine zamućenja (osim neznatnog gubitka normalnog sjaja); dužica jasno vidljiva.....
1
Lako raspoznatljiva providna površina; dužica blago zamućena.....2
Nekrotična površina; detalji dužice nisu vidljivi; veličina zenica se jedva raspoznaje.....3 Zamućenje rožnjače; dužica se ne raspoznaje kroz zamućenje.....4

Mogući maksimum: 4

Dužica
Normalna
……...0
Izrazito duboka bora, kongestija, oticanje, umjerena hiperemija oko rožnjače; ili nadraženost; dužica reaguje na svijetlost (spora reakcija se smatra efektom)
……....1 Krvarenje, obimna destrukcija, izostanak reakcije na svijetlost
…… ……...2

[22] Bilježi se veličina površine zamućenja rožnjače.

Mogući maksimum: 2

Konjuktiva
Crvenilo (odnosi se na palpebralni i bulbarni deo konjuktive; izuzev rožnjače i dužice)

Normalna
……....0
Hiperemija nekih kapilara...……....1
Difuzno crvenilo (tamno crvena), pojedinačni kapilari nisu jasno vidljivi……....2
Difuzno crvenilo boje mesa……....3

Mogući maksimum: 3

Hemoza
Oticanje (odnosi se na kapke odnosno treći kapak)

Normalna
……....0
Oticanje iznad normale…...……....1
Jasno oticanje, sa parcijalnim uvrtanjem kapaka.....……....2
Oticanje, sa kapcima zatvorenim na pola.....……....3 Oticanje, sa kapcima zatvorenim više od pola ……....……....4

Mogući maksimum: 4

STRATEGIJA ISPITIVANJA IRITACIJE I TEŠKOG OŠTEĆENJA OKA KORAK PO KORAK DIO III

1. Opšta razmatranja

U interesu naučne zasnovanosti i zbog dobrobiti životinja, važno je izbjegavati nepotrebno korišćenje životinja ili ispitivanja koja će kod životinja vjerovatno izazvati jak odgovor. Pre in vivo ispitivanja iritacije/teškog oštećenja oka, potrebno je procjeniti sve postojeće podatke koji se odnose na potencijal ispitivane supstance da izazove iritaciju/teško oštećenje oka. Ako postoji dovoljno podataka i dokaza za klasifikaciju određene supstance u odnosu na potencijal da izazove iritaciju/teško oštećenje oka, može da se izbjegne ispitivanje na laboratorijaskim životinjama. Na osnovu analize kvaliteta podataka i strategije ispitivanja korak po korak

smanjiće se potreba za in vivo ispitivanjima, naročito ako se sumnja na mogućnost da će ispitivana supstanca izazvati intenzivne reakcije.

Analiza kvaliteta postojećih podatka koristi se za procjenu postojećih podataka o iritaciji/teškom oštećenju oka koje izaziva ispitivana supstanca kako bi se utvrdilo da li je osim in vivo ispitivanja na koži neophodno obaviti i dodatna ispitivanja koja doprinose da se bolje opiše ovaj potencijal ispitivane supstance. Kada se pokaže potreba za dodatnim ispitivanjima, za prikupljanje novih relevantnih eksperimentalnih podatka preporučuje se primjena strategije ispitivanja korak po korak. Za supstance koje prethodno nisu ispitivane, takođe je potrebno primjeniti strategiju ispitivanja korak po korak za određivanje njenih efekata na oku. Strategiju ispitivanja opisanu u ovom Dijelu razvili su članovi radne grupe OECD[1], a ista je kasnije potvrđena i proširena u sklopu Globalno harmonizovanog sistema za klasifikaciju hemijskih supstanci u odnosu na efekte po zdravlje ljudi i na životnu sredinu, na 28-om zajedničkom Simpozijumu hemijske komisije i radne grupe za hemiju, u novembru 1998. godine[2].

Iako ova strategija ispitivanja korak po korak nije sastavni dio metode ispitivanja B.5. koja je data u ovom prilogu, ona odražava preporučeni pristup za određivanje svojstava supstanci na osnovu iritativnih/korozivnih efekata na oku. Sa aspekta etike i prakse metoda ispitivanja predstavlja najbolji pristup za in vivo ispitivanja iritacije/teškog oštećenja na oku. Metoda ispitivanja služi i kao uputstvo za izvođenje in vivo ispitivanja i zbraja faktore koje je potrebno sagledati pre početka ispitivanja na životinjama. Strategija takođe daje preporuku za procjenu postojećih podataka o ispitivanoj supstanci kao i način na koji je potrebno prikupiti nove podatke za supstance za koje su potrebna dodatna ispitivanja ili za supstance za koje nisu prethodno sprovedena nikakva ispitivanja. Strategija kao prvo uključuje izvođenje validiranog i prihvaćenog in vitro ili ex vivo ispitivanja, a zatim metodu ispitivanja B.4. koja je data u ovom prilogu iritativnih/korozivnih efekata na koži pod specifičnim uslovima.

2. Opis strategije ispitivanja korak po korak

Pre početka ispitivanja u sklopu metode ispitivanja korak po korak (Slika), potrebno je procjeniti postojeće podatke kako bi se odredila potreba za in vivo ispitivanjima na oku. Iako je značajne podatke moguće dobiti procjenom jednog parametara (npr. visoki pH), za donošenje konačne odluke o ispitivanjima moraju se razmotriti i svi drugi dostupni podaci, kao što su štetni efekti ispitivane supstance ili njenih analoga. Na kraju je potrebno iznjeti i objašnjenje za donijetu odluku. Akcenat je na postojećim podacima o ispitivanoj supstanci dobijenim iz podataka na osnovu nalaza kod ljudi i ispitivanja na životinjama, i na ishodu in vitro ili ex vivo ispitivanja. In vivo studije korozivnih supstanci za koje se unaprijed zna da su štetne, treba izbjegavati gde god je to moguće. Faktori koji se uzimaju u obzir u strategiji ispitivanja uključuju: Procjenu postojećih podataka dobijenih na osnovu nalaza kod ljudi i na ispitivanja kod životinja. (korak 1). Prvo se razmatraju postojeći podaci na osnovu nalaza kod ljudi, npr. kliničke studije, studije nakon profesionalne izloženosti, prikazi slučaja, odnosno podaci iz studija na oku životinja, budući da se dobijaju podaci koji su direktno vezani za efekte na oko. Procjenjuju se dostupni podaci iz studija u kojima su vršena istraživanja iritacije/korozivnog oštećenja na osnovu nalaza kod ljudi odnosno ispitivanja kod životinja. Supstance za koje je poznato da izazivaju jaku iritaciju/ korozivno oštećenje oka ne smeju se unositi u oko životinja, kao ni supstance sa istim efektom na koži, jer je to siguran pokazatelj da su iritativni/korozivni i za oko. Supstance za koje ima dovoljno dokaza da ne izazivaju iritaciju/teško oštećenje oka u prethodno izvedenim ispitivanjima, ne treba ispitivati u in vivo studijama oka.

Analizu odnosa strukture i aktivnosti (u daljem tekstu: SAR) (korak 2). Razmatraju se rezultati ispitivanja strukturno sličnih supstanci, ako su dostupni. Kada dovoljno dostupnih podataka o strukturno sličnim supstancama/smješama tih supstanci ukazuju na njihov potencijal za iritaciju/korozivni efekat na oku, može se pretpostaviti da će ispitivana supstanca dati slične nalaze. U takvim slučajevima supstancu nije potrebno dodatno ispitivati. Negativni rezultati, odnosno podaci koji ukazuju na izostanak ovakvih efekata iz studije na strukturno sličnim supstancama ili smješama takvih supstanci, ne predstavljaju dovoljno čvrst dokaz o neškodljivosti supstance koja je u postupku ispitivanja. Validovani i prihvaćeni SAR pristup koristi se za identifikaciju potencijala za iritativni i korozivni efekat ispitivane supstance na oku i koži.

Fizička i hemijska svojstva i hemijsku reaktivnost (korak 3). Supstance koje imaju ekstremne pH vrijednosti kao ≤ 2,0 ili ≥ 11,5 mogu imati izražene lokalne efekte. Ako je ekstremni pH osnova za ocjenjivanje potencijala supstance da izazove teško oštećenje oka, mora se razmotriti i njena kiselo-bazna rezerva (ili puferski kapacitet). Ako puferski kapacitet ukazuje na to da supstanca ne izaziva teško oštećenje oka, neophodno je obaviti dodatna ispitivanja kako bi se potvrdila ova pretpostavka, i to ako je moguće primjenom validovanih i prihvaćenih in vitro ili ex vivo ispitivanja (korak 5 i 6).

Razmatranje ostalih postojećih podataka (korak 4). U ovom koraku procjenjuju se svi dostupni podaci o sistemskoj toksičnosti kod dermalnog puta primjene. Akutna dermalna toksičnost ispitivane supstance takođe se razmatra. Ako se pokaže da je ispitivana supstanca veoma toksična ako se primjeni na kožu, ne postoji potreba za ispitivanjem na oku, jer ako je veoma toksična nakon dermalnog puta primjene, može se pretpostaviti da će izazvati jaku reakciju ako se nanese u oko. Taj podatak takođe može da bude razmotren u koraku 2 i 3.

Rezultate in vitro ili ex vivo ispitivanja (korak 5 i 6). Ispitivanje na životinjama nije potrebno vršiti za supstance koje su pokazale korozivno ili jako iritativno svojstvo u in vitro ili ex vivo ispitivanjima koja su validirana i prihvaćena upravo za procjenu iritacije/teškog oštećenja oka ili kože. Može se pretpostaviti da takve supstance pokazuju slične efekte in vivo. Ako ne postoje validirana i prihvaćena in vitro/ex vivo ispitivanja, korak 5 i 6 se preskaču i direktno se pristupa koraku 7.

In vivo procjenu iritacije ili korozivnog oštećenja kože (korak 7). Kada nema dovoljno dokaza za izvođenje zaključne analize kvaliteta podataka o potencijalu supstance da izazove iritaciju/teško oštećenje oka na osnovu pomenutih studija, prvo se procjenjuje in vivo potencijal iritacije/korozivnog oštećenja kože korišćenjem metode ispitivanja B.4. koja je data u Dio III ovog priloga, datom uz metodu ispitivanja . Ako se pokaže da supstanca izaziva korozivno oštećenje ili tešku iritaciju kože, a ne postoje drugi podaci koji dokazuju suprotno, pretpostavlja se da je supstanca korozivna/iritativna i za oko. U tom slučaju nema potrebe za izvođenjem in vivo ispitivanja na oku. Ako supstanca nije korozivna/iritativna za kožu, izvodi se in vivo ispitivanje na oku.

In vivo ispitivanje na zečevima (korak 8 i 9). In vivo ispitivanje na oku započinje inicijalnim ispitivanjem korišćenjem jedne životinje. Nije potrebno izvoditi dalje ispitivanje ako rezultati ispitivanja ukažu da je supstanca jak iritans ili koroziv za oko. Ako ispitivanje ne pokaže nikakve značajne reakcije, potrebno je, sa dve dodatne životinje, izvesti ispitivanje kojim se potvrđuje (confoirmatory test).

ISPITIVANJE I STRATEGIJA PROCJENE ZA IRITACIJU/TEŠKO OŠTEĆENJE OKA
DIO IV

Aktivnost	Nalaz	Zaključak
Postojeći podaci dobijeni na osnovu ispitivanja kod ljudi, životinja koji pokazuju efekte na očima	Teško oštećenje oka	Supstanca je korozivna za oko. Dalja ispitivanja se ne sprovode.
	Iritacija oka	Supstanca je iritativna za oko. Dalja ispitivanja se ne sprovode.
	Nema oštećenja/iritacije oka	Supstanca nije iritativna/korozivna za oko. Dalja ispitivanja se ne sprovode.
Postojeći podaci dobijeni na osnovu ispitivanja kod ljudi/životinja koji pokazuju korozivne efekte na koži	Korozivno oštećenje kože	Pretpostavlja se da je korozivna za oko. Dalja ispitivanja se ne sprovode.
Postojeći podaci dobijeni na osnovu ispitivanja kod ljudi/životinja koji pokazuju jake iritativne efekte na koži	Jaka iritacija kože	Pretpostavlja se da je iritativna za oko. Dalja ispitivanja se ne sprovode.
↓ Nema dostupnih podataka, ili su dostupni podaci neadekvatni ↓		
Izvršiti SAR procjenu za iritaciju teško oštećenje oka	Predviđa se Oštećenje oka	Pretpostavlja se da je teško supstanca korozivna za oko. Dalja ispitivanja se ne sprovode.

	Predviđa se iritacija Oka	Pretpostavlja se da je supstanca iritativna za oko. Dalja ispitivanja se ne sprovode.
Izvršiti SAR procjenu za korozivno oštećenje kože	Predviđa se korozivno oštećenje kože	Pretpostavlja se da je supstanca korozivna za oko. Dalja ispitivanja se ne sprovode.
↓ Nije moguće predvidjeti ili su predviđanja negativna i nejasna ↓		
Odrediti pH (po potrebi, razmotriti puferski)	pH ≤ 2 ili ≥ 11,5 (sa visokim puferskim kapacitetom, po potrebi)	Pretpostavlja se da je supstanca korozivna za oko. Dalja ispitivanja se ne sprovode.
↓ 2 < pH <11,5, ili pH ≤ 2,0 ili ≥ 11,5 sa malim bez puferskog kapaciteta, po potrebi ↓		
Procjeniti podatke koje se odnose na sistemsku toksičnost putem primjene na kožu	Veoma toksično pri koncentracijama u kojima se ispituje na oku	Supstanca bi bila previše toksična za ispitivanje. Dalja ispitivanja se ne sprovode.
↓ Takvi podaci nisu dostupni ili supstanca nije veoma toksična		
Izvršiti validirana i prihvaćena in vitro ili ex vivo ispitivanja teškog oštećenja oka	Korozivna reakcija	Pretpostavlja se da je supstanca korozivna za oko. Dalja ispitivanja se ne sprovode.

↓ Validirane in vitro ili ex vivo metode ispitivanja teškog oštećenja oka još nisu razvijene ili supstanca nema korozivni efekat ↓		
Izvršiti validirana i prihvaćena in vitro ili ex vivo ispitivanja iritacije oka	Iritativna reakcija	Pretpostavlja se da je supstanca iritativna za oko. Dalja ispitivanja se ne sprovode.
↓ Validirane in vitro ili ex vivo metode ispitivanja iritacije oka još nisu razvijene ili supstanca nema iritativni efekat ↓		
Eksperimentalno procjeni potencijal in vitro iritacije korozivnog oštećenja kože vidi metodu ispitivanja 13.4 uključujući Deo treći	Korozivna ili jaka iritativna reakcija	Pretpostavlja se da je supstanca korozivna za oko. Dalja ispitivanja se ne sprovode.
↓ Supstanca ne dovodi do korozivnog oštećenja ili jake iritacije kože ↓		
Izvršiti inicijalno in vivo ispitivanje oka na jednom kuniću	Teško oštećenje oka	Supstanca je korozivna za oko. Dalja ispitivanja se ne sprovode.
↓ Nema teških oštećenja ili nema reakcije ↓	Korozivno ili iritativno	Supstanca je korozivna ili

Obaviti na jednoj ili dve dodatne životinje ispitivanje kojim se potvrđuje	Nije korozivno ili iritativno	iritativna za oko. Dalja ispitivanja se ne sprovode. Supstanca nije korozivna ili iritativna za oko. Dalja ispitivanja se ne sprovode.

B.4. AKUTNO KOROZIVNO OŠTEĆENJE/KOROZIVNO OŠTEĆENJE KOŽE

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 404 (TG). Smjernice OECD-a za ispitivanje hemikalija periodično se preispituju kako bi se osiguralo da odražavaju najbolje dostupne naučne podatke. Kod preispitivanja Smjernice OECD-a za ispitivanje 404 posebna je pažnja posvećena mogućim poboljšanjima u vezi s dobrobiti životinja i procjeni svih postojećih informacija o ispitivanoj hemikaliji kako bi se izbjegla nepotrebna ispitivanja na laboratorijaskim životinjama. Ažurirana verzija Smjernice OECD-a za ispitivanje 404 (izvorno donesena 1981., revidirana 1992., 2002. i 2015.) uključuje upućivanje na Smjernice o integrisanim pristupima ispitivanju i procjeni (IATA) za korozivno oštećenje/korozivno oštećenje kože (1.), u kojima se predlaže modularan pristup ispitivanju nadraživanja i korozivnog oštećenja kože. U IATA-i je opisano nekoliko modula u kojima se grupišu izvori informacija i alati za analizu te i. pružaju se smjernice o tome kako integrirati i upotrijebiti postojeće podatke o ispitivanju i podatke koji se dobijaju bez ispitivanja za procjenu potencijala hemikalija da uzrokuju korozivno oštećenje i korozivno oštećenje kože te ii. predlaže se pristup kad je potrebno dalje ispitivanje[23]. Osim toga, u toj se smjernici, prema potrebi, kod početnog ispitivanja in vivo preporučuje postupna, a ne istovremena primjena tri ispitne krpe(patch test) na životinju.

POČETNA RAZMATRANJA

Kako bi se obezbijedila pouzdanost naučnih rezultata i dobrobit životinja, in vivo ispitivanje ne bi trebalo započeti sve dok se analizom snage dokaza ne ocijene svi rapoloživi podaci koji su relevantni za moguće korozivno/nadražujuće djelovanje ispitivane hemikalije na kožu, kako je navedeno u Smjernicama o integrisanim pristupima ispitivanju i procjeni za nagrizanje i korozivno oštećenje kože, tj. u tri dijela tih smjernica i njihovim odgovarajućim modulima. Ukratko, u dijelu 1. postojeći se podaci razmatraju u sedam modula kojima su obuhvaćeni podaci dobijeni ispitivanjima na ljudima, podaci dobijeni metodom in vivo, podaci dobijeni metodom in vitro, podaci o fizičko-hemijskim svojstvima (npr. pH-vrijednost, jaka kiselost ili baznost) i metode koje ne uključuju ispitivanje. U dijelu 2. sprovodi se analiza snage dokaza. Ako analiza snage dokaza i dalje nije dovoljna, trebao bi ssprovesti dio 3. s dodatnim

[23] 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).

ispitivanjem, pri čemu se počinje s in vitro metodama, a in vivo ispitivanja koriste se kao posljednja opcija. Ta bi analiza stoga trebala smanjiti potrebu za in vivo ispitivanjem korozivnog/nadražujućeg djelovanja ispitivanih hemikalija na kožu za koje u pogledu te dvije krajnje tačke već postoji dovoljno dokaza na osnovu drugih istraživanja.

NAČELO IN VIVO ISPITIVANJA

Jedna doza ispitivane hemikalije nanosi se na kožu ispitne životinje; netretirani dijelovi kože ispitne životinje služe za kontrolu. Stepen nadraženosti/nagriženosti posmatra se i bilježi u određenim vremenskim intervalima i zatim se dodatno opisuje kako bi se mogla napraviti kompletna ocjena efekata. Istraživanje treba trajati dovoljno dugo da bude moguće ocijeniti jesu li uočeni efekti reverzibilni ili ireverzibilni.

Životinje koje pokazuju stalne znake jakog stresa i/ili boli u bilo kojoj fazi ispitivanja treba humano usmrtiti te ispitivanu hemikaliju s tim u skladu ocijeniti. Kriterijumi za donošenje odluke o humanom usmrćivanju životinja koje su na umoru i koje jako pate navedeni su u posebnom dokumentu sa smjernicama (2.).

PRIPREME ZA IN VIVO ISPITIVANJE

Izbor životinjske vrste

Kao eksperimentalne životinje preporučuje se upotrijebiti albino zečeve, i to zdrave, mlade odrasle primjerke. U slučaju da se koristi neka druga životinjska vrsta, treba navesti razloge za to.

Priprema životinja

Otprilike 24 sata prije ispitivanja životinjama se s leđnog dijela trupa uklanja dlaka šišanjem neposredno uz kožu. Pritom treba paziti da se koža ne ošteti te treba koristiti samo životinje sa zdravom, netaknutom kožom.

Kod nekih su sojeva zečeva određeni dijelovi kože prekriveni vrlo gustom dlakom, što je posebno izraženo u određeno doba godine. Na takvima se gusto obraslim dijelovima kože ispitivanja ne bi smjela obavljati.

Uslovi smještaja i hranjenja

Životinje treba smještiti pojedinačno. Kad su u pitanju zečevi, temperatura prostorije u kojoj se drže eksperimentalne životinje treba biti 20 °C (±3 °C). Iako bi relativna vlaga trebala biti najmanje 30 % te je poželjno da ne pređe 70 %, osim tokom čišćenja prostorije, cilj bi trebao biti 50–60 %. Rasvjeta bi trebala biti vještačka uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Kad je riječ o hranjenju, može se primjenjivati standardna hrana za laboratorijaske životinje uz neograničene količine vode za piće.

ISPITNI POSTUPAK

Primjena ispitivane hemikalije

Ispitivanu hemikaliju treba nanijeti na malu površinu (približno 6 cm^2) kože i prekriti gazom koju treba pričvrstiti nenadražujućom ljepljivom trakom. U slučajevima kad direktno nanošenje nije moguće (npr. Tečnosti ili neke paste) ispitivanu hemikaliju prvo treba nanijeti na gazu koja se zatim stavlja na kožu. Krpicu treba držati labavo u kontaktu s kožom s pomoću odgovarajućeg poluokluzivnog obloga tokom cijelog perioda izlaganja. Ako se ispitivana hemikalija nanosi na krpicu, na kožu je treba pričvrstiti na takav način da se ossupstanci dobar kontakt između hemikalije i kože te da hemikalija bude jednoliko raspoređena po koži. Životinju treba spriječiti da dosegne krpicu te da hemikaliju unese u organizam gutanjem ili udisanjem.

Tečno ispitivane hemikalije obično se koriste nerazrijeđene. Kad se ispituju čvrste supstance (koje mogu biti usitnjene u prah ako se smatra potrebnim), ispitivanu hemikaliju treba navlažiti najmanjom mogućom količinom vode (ili, prema potrebi, nekim drugim odgovarajućim nosačem) koja je dovoljna da omogući dobar kontakt s kožom. Kad se koriste drugi nosači, a ne voda, potencijalni uticaj nosača na nadraženost kože izazvanu ispitivanom hemikalijom treba biti minimalan ili nikakav.

Na kraju perioda izlaganja, koje obično traje četiri sata, ostatke ispitivane hemikalije po mogućnosti treba ukloniti vodom ili odgovarajućim rastvaračem, ne mijenjajući nastao odgovor ili integritet površinskog sloja kože (epiderme).

Visina doze

Na pripremljeni dio kože nanosi se doza od 0,5 ml supstance u tečnom obliku ili 0,5 g u čvrstom obliku ili u obliku paste.

Početno ispitivanje (ispitivanje nadražujućih/nagrizajućih svojstava in vivo na jednoj životinji)

Ako se na osnovu analize snage dokaza ili prethodnog in vitro ispitivanja utvrdi da je ispitivana hemikalija korozivna, nadražujuća ili neklasifikovana, dalje in vivo ispitivanje obično nije potrebno. Međutim, u slučajevima u kojima se smatra da su potrebni dodatni podaci sprovodi se in vivo ispitivanje u kojem se prvo upotrebljava jedna životinja i primjenjuje se sljedeći pristup. Na kožu jedne životinje u slijedu se stavljaju najviše tri krpe. Prva se krpica uklanja nakon tri minute. Ako se na koži ne uoči jaka reakcija, na drugo se mjesto stavlja druga krpica koja se uklanja nakon jednog sata. Ako se na osnovu zapažanja u ovoj fazi može zaključiti da ne bi bilo nehumano produžiti izlaganje, stavlja se treća krpica koja se uklanja nakon četiri sata i utvrđuje stepen odgovora.

Ako se nakon bilo kojeg od tri izlaganja u nizu uoči korozivno djelovanje, ispitivanje se odmah prekida. Ako se nakon uklanjanja posljednje krpice ne uoči korozivno djelovanje, životinja se uočava 14 dana, osim u slučaju da do nagrizanja dođe ranije.

U slučajevima kad se ne očekuje da će ispitivana hemikalija uzrokovati nagrizanje, ali da može biti nadražujuća, treba na jednu životinju staviti jednu krpicu i držati je četiri sata.

Potvrdni test (ispitivanje korozivnog oštećenja kože in vivo na dodatnim životinjama)

Ako se tokom početnog ispitivanja ne uoči nagrizajući efekat, nadražujući ili negativan odgovor treba potvrditi ispitivanjem na najviše dvije dodatne životinje, od kojih na svaku treba primijeniti po jednu krpicu u trajanju od četiri sata. Ako se tokom početnog ispitivanja uoči nadražujući efekat, potvrdno se ispitivanje može izvesti sekvencionalno ili istovremenim izlaganjem dvije dodatne životinja. U određenim slučajevima kod kojih se početno ispitivanje ne sprovodi, može se tretirati dvije ili tri životinje jednom krpicom koja se nakon četiri sata uklanja. Ako pri korištenju dviju životinja obje pokažu isti odgovor, dalje ispitivanje nije potrebno. U suprotnom, ispitivanju se podvrgava i treća životinja. Dvosmislene odgovore ponekad treba ocijeniti ispitivanjem na dodatnim životinjama.

Period zapažanja

Uočavanje treba trajati dovoljno dugo da se u potpunosti može utvrditi reverzibilnost uočenih efekata. Međutim, eksperiment treba prekinuti u bilo kojem trenutku ako životinja pokazuje trajne znake jake boli ili stresa. Da bi se utvrdila reverzibilnost efekata, životinje treba uočavati do 14 dana nakon uklanjanja krpica. Ako se reverzibilnost utvrdi prije isteka 14 dana, eksperiment odmah treba prekinuti.

Klinička zapažanja i stepenovanje reakcija na koži

Sve životinje treba pregledati kako bi se vidjelo pokazuju li znake crvenila kože (eritema) ili otoka (edema) i to nakon 60 minuta, a zatim nakon 24, 48 i 72 sata po skidanju krpice. Za početno ispitivanje na jednoj životinji mjesto ispitivanja pregleda se i odmah nakon uklanjanja krpice. Stupen reakcije na koži utvrđuje se i bilježi prema stupenima opisanim u tabeli u nastavku. Ako se na koži pojavi oštećenje koje se nakon 72 sata ne može definisati kao nadraženost ili nagriženost, možda će za utvrđivanje reverzibilnosti efekata biti potrebno uočavanje u trajanju od 14 dana. Uz zapažanja povezana s nadraženosti kože treba detaljno opisati i zabilježiti sve lokalne toksične efekte, kao što je isušivanje kože, i sve sistemske štetne efekte (npr. klinički znaci toksičnosti i promjene u tjelesnoj masi). U slučaju dvosmislenih odgovora trebalo bi razmotriti mogućnost histopatološkog pregleda.

Stepenovanje odgovora na koži po svojoj je prirodi subjektivno. Da bi se poboljšala usklađenost u stupenovanju odgovora na koži te da bi se u tom smislu pomoglo ispitnim laboratorijaima i onima koji obavljaju zapažanja i tumače rezultate, osoblje koje obavlja ta zapažanja treba proći odgovarajuće osposobljavanje za primjenu sistema ocjenjivanja (vidjeti tabelu u nastavku). Od pomoći bi mogao biti ilustrovani priručnik za utvrđivanje stupena nadraženosti i drugih lezija kože[24]

PODACI I IZVJEŠTAVANJE

Rezultate istraživanja treba rezimirati u obliku tabele u konačnom izvještaju o ispitivanju.

Ocjena rezultata

[24] ECD (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).

Indikatore nadraženosti kože treba ocijeniti u zavisnosti od vrste i stupena lezija te o njihovoj reverzibilnosti ili ireverzibilnosti. Pojedinačni rezultati ne predstavljaju apsolutni standard za nadražujuća svojstva određenog ispitnog materijala, s obzirom na to da se ocjenjuju i drugi njegovi efekti. Umjesto toga, na pojedinačne rezultate treba gledati kao na referentne vrijednosti koje se ocjenjuju u kombinaciji sa svim ostalim uočavanjima iz istraživanja.

Kod ocjenjivanja nadraženosti kože treba uzeti u obzir reverzibilnost lezija. Ako reakcije kao što su alopecija (ograničena površina), hiperkeratoza, hiperplazija i perutanje ostanu prisutne do kraja 14-dnevnog perioda zapažanja, ispitivanu hemikaliju treba smatrati nadražujućom.

Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju mora sadržati sljedeće informacije:

Razlozi za ispitivanje in vivo:

- analiza snage dokaza postojećih podataka dobijenih prethodnim ispitivanjima, uključujući rezultate dobijene primjenom strategije sekvencijskog ispitivanja,
- opis relevantnih podataka dobijenih ranijim ispitivanjima,
- podaci dobijeni u svakoj fazi primijenjene strategije ispitivanja,
- opis obavljenih in vitro ispitivanja, uključujući pojedinosti o pokolonama i rezultate dobijene ispitivanjem ispitivanih/referentnih supstanci,
- analiza snage dokaza radi ssprovođenja istraživanja in vivo.

Ispitivana hemikalija:

- supstanca s jednim sastojkom: hemijske identifikacione oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi, itd.,
- supstanca s više sastojaka, smješa i supstanca nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcioni proizvodi ili biološki materijali (UVCB): opis (koliko je to moguće) hemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizičko -hemijskih svojstava sastojaka,
- fizički izgled, rastvorljivost u vodi i druga relevantna fizičko -hemijska svojstva,
- izvor, broj serije, ako su dostupni,
- tretiranje ispitivane hemikalije/kontrolne supstance prije ispitivanja, ako je primjenljivo (npr. grijanje, mljevenje),
- stabilnost ispitivane hemikalije, rok upotrebe ili datum za ponovnu analizu ako je poznat,
- uslovi skladištenja.

Nosač:

- I dentifikacijska oznaka, koncentracija (prema potrebi), upotrijebljeni volumen,
- obrazloženje za izbor nosača

- Ispitne životinje:
- upotrijebljena vrsta/soj, razlozi za upotrebu drugih životinja umjesto albino zečeva,
- broj životinja svakog pola,
- tjelesna masa pojedinačnih životinja na početku i na kraju ispitivanja,
- dob na početku istraživanja,
- porijeklo životinja, uslovi smještaja, prehrana itd.

Ispitni uslovi:

— tehnika pripremanja mjesta na koje će se staviti krpica,
— pojedinosti o upotrijebljenim materijalima i tehnici stavljanja krpice,
— pojedinosti o pripremi ispitivane hemikalije, nanošenju i uklanjanju.

Rezultati:

— tablični prikaz stepena nadražujućeg/korozivnog odgovora za svaku životinju u svakoj vremenskoj tački u kojoj se sprovodi uočavanje,
— opis svih uočenih lezija,
— detaljni opis vrste i stepena uočene nadraženosti ili nagrizanja i svi histopatološki nalazi,
— opis drugih štetnih lokalnih (npr. isušivanje kože) i efekata koji se javljaju pored nadraživanja i korozivnog oštećenja kože.

Rasprava o rezultatima

Zaključci

Tabela: Utvrđivanje Stepena Reakcije na Koži

Nema eritema…	0
Lagano izraženi eritemi (jedva uočljivi)	1
Dobro definisani eritemi…	2
Srednje do jako izraženi eritemi…	3
Jako izraženi eritemi (tamno crvenilo, poput boje govedine) uz stvaranje eshara koji sprečavaju utvrđivanje stepena eritema.	4
Najviši mogući stepen: 4	
Nema edema…	0
Vrlo lagani edemi (jedva uočljivi)	1
Lagani edemi (rubovi površine izdignuti i jasno definisani)	2

Srednji edemi (izdignuti približno 1 mm)	3
Jaki edemi (izdignuti više od 1 mm i šire se izvan površine izlaganja)	4
Najviši mogući stepen: 4	
U slučaju dvosmislenih odgovora može se obaviti histopatološki pregled.	

B.6. SENZIBILIZACIJA KOŽE

DIO I

1. Metoda ispitivanja

Ekvivalentna međunarodna ispitna metoda navedena je u tabeli 2 dijela 0.

1.1. Uvod

Osjetljivost i mogućnost ispitivanja kojim se određuje potencijal supstanci koje izazivaju senzibilizaciju kože kod ljudi, smatraju se važnim u sistemu klasifikacije na osnovu toksičnosti i važni su za javno zdravlje. Ne postoji metoda ispitivanja koja na odgovarajući način identifikuje sve supstance koje izazivaju preosjetljivost kože ljudi i koja je relevantna za sve supstance. Činioci kao što su fizička svojstva supstance, uključujući njihovu sposobnost prodiranja u kožu, uzimaju se u obzir pri izboru odgovarajuće metode ispitivanja.

Razvijene su dvije vrste metoda ispitivanja u kojima se koriste zamorci: metode ispitivanja sa adjuvansom u kojima se alergijska reakcija izaziva rastvaranjem ili suspendovanjem ispitivane supstance "Frojndovom kompletnom adjuvansu" (u daljem tekstu: FCA), i metode ispitivanja bez adjuvansa. Metode ispitivanja sa adjuvansom su tačnije u predviđanju da supstanca kod ljudi izaziva senzibilizaciju kože, za razliku od metoda ispitivanja koje ne koriste FCA. Zbog ovoga se koriste metode ispitivanja sa adjuvansom.

Test maksimizacije na zamorcima (The Guinea-Pig Maximisation Test, u daljem tekstu: GMPT) je test sa adjuvansom. Za otkrivanje potencijala izazivanja preosjetljivosti neke supstance koristi se nekoliko različitih metoda ispitivanja, ali se preporučuje GMPT metoda ispitivanja sa adjuvansom. U slučaju većine klasa hemikalija, eksperimentalne metode ispitivanja bez adjuvansa (prednost se daje Buehler testu) smatraju se manje osjetljivim.

U određenim slučajevima postoji opravdan razlog za primjenu Buehler testa u kome se ispitivana supstanca primjenjuje topikalno, a ne u obliku intradermalne injekcije, kao što je slučaj u GMPT. Za korišćenje Buehler testa, daje se i naučno zasnovano obrazloženje.

GMPT i Buehler test dati su u ovoj metodi ispitivanja. Ostale metode ispitivanja koriste se ako su prethodno potvrđene i ako je njihovo korišćenje naučno opravdano. Ako se u skrining testu dobije pozitivan rezultat, ispitivana supstanca se označava kao potencijalni uzročnik senzibilizacije. U tom slučaju ne nastavljaju se dalja ispitivanja na zamorcima. Ako se u skrining testu dobije negativan rezultat, ispitivanje na zamorcima se sprovodi koristeći postupke date u ovoj metodi.

1.2. Definicije

Senzibilizacija kože (Alergijski kontaktni dermatitis) je imunološki posredovana, kožna reakcija na određenu supstancu. Kod ljudi odgovor je okarakterisan svrabom, crvenilom, otokom, papulama (bubuljicama), vezikulama (mjehurićima), bulama (plikovima) ili njihovom kombinacijom. Kod drugih vrsta reakcije se razlikuju, i javlja se eritem ili edem.

Indukcija je eksperimentalno izlaganje jedinke ispitivanoj supstanci sa namjerom izazivanja reakcije preosjetljivosti.

Faza indukcije jeste vremenski period u trajanju od najmanje nedelju dana nakon indukcije tokom kojeg dolazi do razvoja reakcije preosjetljivosti.

Provokacije jesu ponovljeno izlaganje ispitivanoj supstanci prethodno tretirane životinje nakon faze indukcije kako bi se odredilo da li jedinka razvija preosjetljivost.

1.3. Referentne supstance

Osjetljivost i pouzdanost eksperimentalne metode ispitivanja koja se koristi provjerava se svakih šest mjeseci primjenom supstanci za koje je poznato da imaju svojstvo blage do srednje senzibilizacije kože.

U dobro obavljenom ispitivanju, pozitivan odgovor od najmanje 30% kod metode ispitivanja sa adjuvansom ili 15% kod metode ispitivanja bez adjuvansa očekuje se za supstance koje izazivaju slabu do umjerenu senzibilizaciju.

Preporučuju se sljedeće supstance:

Tabela 1.

CAS broj	EINECS broj	EINECS nazivi	Uobičajeni nazivi
101-86-0	202-983-3	α-heksilcinamaldehid	α-heksilcinamaldehid
149-30-4	205-736-8	benzotiazol-2-tiol	kaptaks
94-09-7	202-303-5	benzokain	norkain

Postoje okolnosti u kojima se mogu koristiti druge kontrolne supstance koje zadovoljavaju navedene kriterijume, ako se navede adekvatno opravdanje za njihovu upotrebu.

1.4. princip metode ispitivanja

Ispitivane životinje početno se izlažu ispitivanoj supstanci putem intradermalnih injekcija odnosno epidermalnom primjenom (indukcija). Nakon perioda pauze u trajanju od 10 do 14 dana
(nakon faze indukcije), tokom koga može doći do razvoja imunološkog odgovora, životinje se izlažu drugoj, ponovljenoj dozi. Stepen prouzrokovane reakcije na koži nakon provokacije kod

eksperimentalnih životinja poredi se sa onom reakcijom kod životinja iz kontrolne grupe koje su bile podvrgnute lažnom tretmanu indukcije, i koje su bile podvrgnute provokaciji.

1.5. Opis metode ispitivanja

Ako je potrebno uklanjanje ispitivane supstance, ona se uklanja pomoću vode ili odgovarajućeg rastvarača tako da se ne utiče na nalaz na koži ili da se ne naruši integritet epidermisa.

1.5.1. Test maksimizacije na zamorcima (GMPT)

1.5.1.1. Priprema

Zdravi, mladi albino zamorci drže se radi privikavanja najmanje pet dana pre početka ispitivanja u eksperimentalnim uslovima. Pre ispitivanja, slučajnim izborom životinja, formiraju se grupe za tretman. Uklanjanje dlake sa kože životinja vrši se šišanjem, brijanjem ili hemijskom depilacijom, u zavisnosti od primjenjene metode ispitivanja. Pazi se da u proceduri ne dođe do oštećenja kože. Tjelesna masa životinja mjeri se pre početka ispitivanja i na kraju ispitivanja.

1.5.1.2. Uslovi ispitivanja

1.5.1.2.1. Eksperimentalne životinje

Koriste se uobičajene vrste albino zamoraca.

1.5.1.2.2. Broj i pol

Koriste se mužjaci ili ženke. Ako se koriste ženke, ispitivanje se vrši na ženkama koje nisu ranije rađale i koje nisu gravidne.

Minimum 10 životinja koristi se u tretiranoj grupi i najmanje 5 životinja u kontrolnoj grupi. Kada se koristi manje od 20 tretiranih i 10 kontrolnih zamoraca, i kada nije moguće zaključiti da li ispitivana supstanca dovodi do senzibilizacije, preporučuje se ispitivanje na dodatnim životinjama kako bi se dostigao ukupan broj od najmanje 20 tretiranih i 10 kontrolnih životinja.

1.5.1.2.3. Dozni nivoi

Koncentraciju ispitivane supstance koja se koristi za indukciju životinje treba dobro da podnose u smislu sistemskih efekata, i treba da bude najveća moguća doza koje će dovesti do slabe ili srednje izražene iritacije kože. Koncentracija koja se koristi za provokaciju treba da bude najveća moguća koja ne dovodi do iritacije kože. Odgovarajuće koncentracije najbolje je odrediti u pilot ispitivanju na dve ili tri životinje, ako drugi podaci nisu dostupni. U ovu svrhu, može se razmotriti i korišćenje FCA-tretiranih životinja.

1.5.1.3. Postupak

1.5.1.3.1. Indukcija

Dan 0 - tretirana grupa:

Tri para intradermalnih injekcija zapremine 0,1 mL daju se u području ramenog regiona koje je prethodno obrijano tako da se po jedna injekcija primjeni sa svake strane tijela.

Injekcija 1: 1:1 smješa (v/v) FCA/voda ili fiziološki rastvor.

Injekcija 2: ispitivana supstanca u određenoj koncentraciji u odgovarajućem vehikulumu.

Injekcija 3: ispitivana supstanca u određenoj koncentraciji pripremljena kao 1:1 smješa (v/v) FCA/voda ili fiziološki rastvor.

U injekciji 3 supstance rastvorljive u vodi rastvaraju se u vodenoj fazi pre miješanja sa FCA. Supstance rastvorljive u lipidnoj fazi ili potpuno nerastvorne suspenduju se u FCA pre miješanja sa vodenom fazom. Završna koncentracija ispitivane supstance mora biti jednaka onoj korišćenoj u injekciji 2.

Injekcije 1 i 2 daju se jedna pored druge blizu glave, dok se injekcija 3 daje u ivični deo ispitivane površine.

Dan 0 - kontrolna grupa:

Tri para intradermalnih injekcija zapremine 0,1 mL daju se u isto područje kao kod tretiranih životinja.

Injekcija 1: 1:1 smješa (v/v) FCA/voda ili fiziološki rastvor.

Injekcija 2: nerazreĐeno pomoćno sredstvo.

Injekcija 3: 50% m/v formulacija vehikuluma u 1:1 smješi (v/v) FCA/voda ili fiziološki rastvor.

Dan 5-7 - tretirane i kontrolne grupe:

Ako ispitivana supstanca nije iritans, nakon šišanja odnosno brijanja i to otprilike 24 sata pre topikalne primjene, na površinu kože nanosi se 0,5 mL 10% natrijum lauril sulfata u vazelinu, kako bi se izazvala lokalna iritacija kože.

Dan 6-8 - tretirana grupa:

Sa tretiranog dela kože ponovo se uklanja dlaka. Na filter papir veličine 2 cm x 4 cm nanese se u debelom sloju ispitivana supstanca rastvorena u odgovarajućem vehikulumu i drži u kontaktu sa kožom uz pomoć okluzivnog zavoja narednih 48 sati. Izbor vehikuluma potrebno je obrazložiti. Čvrste supstance se pre primjene usitne do praha i suspenduju u odgovarajućem vehikulumu. Tečnosti se mogu primjeniti i nerazblažene.

Dan 6-8 - kontrolna grupa:

Sa površine kože koja se ponovno tretira uklanja se dlaka. Zatim se samo vehikulum, bez ispitivane supstance, nanosi na kožu uz pomoć okluzivnog zavoja i drži u kontaktu sa kožom narednih 48 sati.

1.5.1.3.2. Provokacija

Dan 20-22 - tretirane i kontrolne grupe:

Sa bokova životinja iz tretiranih i kontrolnih grupa uklanja se dlaka. Na jedan bok svake životinje nanosi se obloga dobro natopljena ispitivanom supstancom, a na drugi bok obloga natopljena vehikulumom. Obloge se drže u kontaktu sa kožom naredna 24 sata pomoću okluzivnog zavoja. 1.5.1.3.3. Posmatranja i ocjenjivanje: tretirane i kontrolne grupe

Približno 21 sat nakon uklanjanja obloga sa mjesta provokacije, koža na tom mjestu se, po potrebi, čisti i ponovo brija ili depilira.

Približno 3 sata kasnije (48 sati od početka provokacije) posmatraju se reakcije na koži i ocjenjuju prema kriterijumima i ocjenama datim u Dio II ove metode.

Približno 24 sata nakon prve ocjene (nakon ukupno 72 sata) obavlja se i drugo posmatranje reakcija na koži i bilježi se ocjena.

Preporučuje se nasumično ocjenjivanje životinja iz tretiranih i kontrolnih grupa.

Ako je potrebno pojasniti rezultate dobijene nakon prve provokacije, može se obaviti i druga provokacija, i to nakon približno nedelju dana, sa odgovarajućom novom kontrolnom grupom. Druga provokacija može se obaviti i na životinjama iz originalne kontrolne grupe. Sve reakcije na koži kao i neuobičajeni nalazi, uključujući sistemske reakcije, koji su poslijedica indukcije ili provokacije ispitivanom supstancom bilježe se i ocjenjuju prema Magnusson/Kligman skali (Dio II ove metode). Drugi postupci, kao što su histopatološka ispitivanja, mjerenja debljine kože i sl., mogu se obaviti kako bi se razjasnile nedovoljno jasne reakcije.

1.5.2. Buehler test

1.5.2.1. Priprema

Zdravi, mladi albino zamorci drže se radi privikavanja najmanje pet dana prije početka ispitivanja u eksperimentalnim uslovima. Prije ispitivanja, nasumičnim izborom, životinje se klasifikujeju u grupe za tretman. Uklanjanje dlake sa kože životinja vrši se šišanjem, brijanjem ili hemijskom depilacijom, u zavisnosti od primjenjene metode ispitivanja. Pazi se da ne doĐe do oštećenja kože. Tjelesna masa životinja mjeri se prije početka ispitivanja i na kraju ispitivanja.

1.5.2.2. Uslovi ispitivanja

1.5.2.2.1. Eksperimentalne životinje

Koriste se već uobičajene vrste albino zamoraca.

1.5.2.2.2. Broj i pol

Koriste se mužjaci ili ženke. Ako se koriste ženke, ispitivanje se sprovodi na ženkama koje nijesu ranije raĐale i koje nisu gravidne.

Minimum 20 životinja koristi se u tretiranoj grupi i najmanje 10 životinja u kontrolnoj grupi.

1.5.2.2.3. Dozni nivoi

Koncentracija ispitivane supstance koja se koristi pri indukciji je najveća moguća koja će prouzrokovati blagu, ali ne prekomernu iritaciju kože. Koncentracija koja se koristi za provokaciju je najveća koncentracija koja ne izaziva iritaciju kože. Odgovarajuća koncentracija se određuje iz probnog ispitivanja na dvije ili tri životinje.

U slučaju ispitivanih supstanci koje su rastvorljive u vodi, koristi se voda ili razblaženi nenadražujući surfaktant kao vehikulum. U slučaju drugih ispitivanih supstanci za indukciju preporučuje se korišćenje smješe 80% etanol/voda, a za provokaciju aceton.

1.5.2.3. Postupak

1.5.2.3.1. Indukcija

Dan 0 - tretirana grupa:

Sa jednog boka životinje šišanjem se uklanja dlaka. Sistem "patch" testa je pripremljen sa ispitivanom supstancom rastvorenom u odgovarajućem vehikulumu (obrazložiti izbor vehikuluma; ispitivane supstance u tečnom stanju se primjenjuju i nerazblažene). "Patch" sistem sa ispitivanom supstancom primjenjuje se na površinu kože uz pomoć okluzivnog zavoja i drži u kontaktu s kožom narednih 6 sati. U ovoj vrsti ispitivanja koristi se okluzivni zavoj, a kao obloga služi okrugao ili kvadratni komadić pamučne gaze, površine 4 cm^2 - 6 cm^2. Kako bi se spriječilo da životinja skine oblogu, na mjesto primjene staviti odgovarajuću prepreku ili dodatni zavoj. U slučaju korišćenja dodatnog zavoja, potrebno je ponoviti tretman.

Dan 0 - kontrolna grupa:

Sa jednog boka životinje brije se koža. Na oblogu se nanosi samo vehikulum koje se potom pomoću zavoja drži u kontaktu sa kožom narednih 6 sati, kao i u slučaju životinja iz ispitivane grupe.

Dani 6-8 i 13-15 - tretirane i kontrolne grupe:

Na dane 6-8 i 13-15 primjena ispitivane supstance obavlja se na istom mjestu na boku životinje kao i na dan 0 (dlaka se ponovno uklanja).

1.5.2.3.2. Provokacija

Dani 27-29 - tretirane i kontrolne grupe:

Sa netretiranog boka životinja iz ispitivane i kontrolne grupe brijanjem se uklanja dlaka. Na tako pripremljen dio kože stavlja se okluzivni zavoj sa oblogom na koji je prethodno naneta odgovarajuća količina ispitivane supstance u najvećoj mogućoj koncentraciji koja neće izazvati iritaciju kože. Okluzivni zavoj koji sadrži samo vehikulum nanosi se na kožu netretiranog boka životinja iz ispitivane i kontrolne grupe. Obloge se drže u kontaktu s kožom narednih 6 sati.

1.5.2.3.3. Posmatranje i stepenovanje

Približno 21 sat nakon uklanjanja obloge sa mjesta provokacije uklanja se dlaka sa kože na tom mjestu. Približno 3 sata kasnije (tj. približno 30 sati nakon provokacije) posmatraju se reakcije na koži i ocjenjuju prema kriterijumima i ocjenama datim u drugom dijelu ove metode. Otprilike 24 sata nakon prve ocjene (približno 54 sata nakon provokacije) obavlja se i drugo posmatranje reakcija na koži, i bilježe ocjene. Preporučuje se nasumično ocjenjivanje životinja iz tretiranih i kontrolnih grupa.

Ako je potrebno dodatno pojasniti rezultate dobijene nakon prve provokacije, obavlja se i druga provokacija, i to nakon približno nedelju dana, sa odgovarajućom novom kontrolnom grupom. Druga provokacija se obavlja i na životinjama iz originalne kontrolne grupe. Sve reakcije na koži kao i neuobičajeni nalazi, uključujući sistemske reakcije koje su poslijedica indukcije ili provokacije ispitivanom supstancom bilježe se i ocjenjuju prema Magnusson/Kligman skali (Dio II ove metode). Drugi postupci, kao što su histopatološka ispitivanja, mjerenja debljine kože i sl., se obavljaju kako bi se objasnile nedovoljno jasne reakcije.

2. Podaci (GPMT i Buehler test)

Podaci se prikazuju tabelarno. Za svaku životinju navode se uočene reakcije na koži pri svakom posmatranju.

3. Izvještaj o ispitivanju (GPMT i Buehler test)

Ako se skrining ispitivanje obavlja prije ispitivanja na zamorcima, daje se opis obavljenog ispitivanja ili se poziva na preporuku (Mouse Ear Swelling Test, MEST) i iznose se detalji postupka zajedno sa rezultatima dobijenim u sklopu ispitivanja obavljenih sa ispitivanom i referentnom supstancom.

Pisanje Izvještaja (GPMT i Buehler test) Izvještaj o ispitivanju sadrži: 1. Podatke o

eksperimentalnim životinjama: - soj zamoraca;

- broj, starost i pol životinja;
- porjeklo, uslove smještaja, ishrane, itd.;
- tjelesnu masu pojedinačnih životinja na početku ispitivanja.

2. Podatke o uslovima ispitivanja:

- način pripreme kože;
- detaljan opis pripreme flastera i obloga;

- rezultate probnog ispitivanja sa zaključkom o koncentracijama koje će se koristiti za indukciju i provokaciju;
- detalje pripreme ispitivane supstance, njene primjene na kožu i uklanjanja;

- obrazloženje za izbor vehikuluma;
- koncentracije ispitivane supstance i vehikuluma za indukciju i provokaciju, kao i ukupnu količinu primjenjene ispitivane supstance u indukciji i provokaciji.

3. Rezultate:

- kratak pregled rezultata posljednjeg ispitivanja senzibilizacije i pouzdanosti (tačka 1.3. ove metode) uključujući podatke o ispitivanoj supstanci, koncentraciji i vehikulumu;
- pojedinačno prikazane za svaku životinju uključujući i sistem ocjenjivanja; - opis vrste i stepena ozbiljnosti uočenih efekata na koži; - sve histopatološke nalaze.

4. Tumačenje rezultata. 5. Zaključke.

MAGNUSSON/KLIGMAN SKALA ZA OCJENU REAKCIJA USLED PROVOKACIJE ISPITIVANOM SUPSTANCOM "PATCH" TESTOM DIO II

0 nema vidljivih promjena

1 diskretan ili mjestimičan (nehomogen) eritem

2 srednje izražen i raširen eritem

3 izražen eritem i otok

B.7. AKUTNA (ORALNA) TOKSIČNOST (28 DANA) - PONOVLJENE DOZE

1. **Metoda ispitivanja**

1.1. Uvod

Uvod je dat u Opšti uvod.

1.2. Princip metode ispitivanja

Ispitivana supstanca primjenjuje se peroralno u rastućim dozama na nekoliko različitih grupa eksperimentalnih životinja. Na jednu grupu životinja primjenjuje se jedna doza tokom 28 dana. Tokom primjene ispitivane supstance životinje se posmatraju svakodnevno kako bi se zabilježili znaci toksičnosti. Životinje koje uginu tokom ispitivanja podvrgavaju se postmortalnom pregledu, a na kraju eksperimenta i preživjele životinje se žrtvuju i podvrgavaju postmortalnom pregledu.

Ova metoda ispitivanja stavlja veći naglasak na neurološke efekte i potrebu za pažljivim kliničkim posmatranjem životinja kako bi se prikupilo što više podataka. Metoda ispitivanja je razvijena kako bi omogućila identifikaciju hemikalija s neurotoksičnim potencijalom, koje zahtijevaju dodatna ispitivanja ovog aspekta. Pored toga, metoda ispitivanja ukazuje i na imunološke efekte ispitivane supstance kao i na toksičnost po reprodukciju.

1.3. Opis metode ispitivanja

1.3.1. Priprema

Zdrave mlade odrasle jedinke nasumično se grupišu u ispitivane i kontrolnu grupu. Kavezi su takvi da se mogući efekti smještaja svedu na minimum. Životinje se obilježavaju i drže u kavezima najmanje pet dana prije početka ispitivanja kako bi se prilagodile na laboratorijaske uslove. Ispitivana supstanca dozira se ili putem hrane ili putem vode za piće ili direktno, sondom u želudac. Metoda oralne primjene zavisi od cilja studije i od fizičko-hemijskih svojstava supstance. Ispitivana supstanca se rastvara ili suspenduje u odgovarajućem vehikulumu. Primjenjuje se vodeni rastvor/suspenzija, a tek zatim rastvor ili emulzija u ulju (npr. kukuruznom ulju) ili nekom drugom sredstvu. Ako se koristi vehikulum koje nije voda, kod tumačenja rezultata uzimaju se u obzir i potencijalni toksični efekti tog vehikuluma. Određuje se i stabilnost ispitivane supstance u vehikulumu.

1.3.2. Uslovi ispitivanja

1.3.2.1. Eksperimentalne životinje

Koriste se mladi, zdravi pacovi i to sojevi koji se najčešće koriste u laboratorijaskim eksperimentima. Ispitivanje se vrši na ženkama koje nisu ranije rađale i koje nisu gravidne.
Doziranje započeti odmah nakon prestanka sisanja, a u svakom slučaju prije nego što životinje navrše devet nedjelja. Na početku ispitivanja raspon tjelesnih masa pojedinačnih životinja ne prelazi ± 20% od srednje vrijednosti za svaki pol. Kada se ispitivanje sa ponovljenim oralnim dozama obavlja kao prethodno za dugoročne studije, životinje istog soja i iz istog izvora koriste se u oba ispitivanja.

1.3.2.2. Broj i pol

Najmanje 10 životinja (pet ženki i pet mužjaka) koristi se za svaki dozni nivo. Ako se u toku eksperimenta planiraju privremena žrtvovanja, broj životinja u eksperimentu povećava se za broj koji se planira da se žrtvuje u toku ispitivanja. Prateća grupa od 10 životinja (po pet svakog pola) izlaže se visokim dozama ispitivane supstance u periodu od 28 dana, kako bi se 14 dana nakon tretmana zabilježila reverzibilnost, postojanost ili odložena pojava toksičnih efekata. Uključiti i grupu od 10 kontrolnih životinja (ponovo po pet životinja svakog pola).

1.3.2.3. Dozni nivoi

Koristite se najmanje tri tretirane grupe, zajedno sa istovremenom kontrolnom grupom. Osim što se životinjama u kontrolnim grupama ne daje ispitivana supstanca, postepene sa životinjama je identično kao sa životinjama iz tretiranih grupa. Ako je korišćen vehikulum, kontrolna grupa dobija vehikulum u najvećoj korišćenoj zapremini. Ako se procjenom postojećih podataka, za ispitivanu supstancu u koncentraciji od 1.000 mg/kg TM/dan, ne očekuju nikakvi efekti, obavlja se ispitivanje granične doze. Ako ne postoje odgovarajući podaci za takvu procjenu, sprovodi se ispitivanje sa ciljem određivanja doza koje će se primjeniti. Doze ispitivane supstance biraju se uzimajući u obzir toksikološke ili toksikokinetičke podatke koji već postoje za ispitivanu supstancu ili strukturno slične supstance. Najveća doza bira se tako da izazove toksični efekat, ali ne i smrt ili tešku patnju životinja. Potom se redom biraju opadajuće koncentracije sa ciljem demonstriranja efekata vezanih za primjenjenu dozu sve dok se ne dođe do doze bez štetnog efekta, tj. "no-observed-adverse-effects-level" (NOAEL). Doze se smanjuju progresivno za faktor dva do četiri puta, a dodatak četvrte ispitivane doze preporučuje se umjesto korišćenja veoma velikih intervala (npr. većih od faktora 10) između doza. Za

supstance koje se doziraju putem hrane ili vode za piće, važno je prethodno provjeriti da količina ispitivane supstance dodata u obrok ne utiče štetno na ishranu ili ravnotežu vode. Kada se ispitivana supstanca dodaje hrani, ona se primjenjuje ili u konstantnoj koncentraciji (ppm) ili u konstantnoj dozi izraženoj u jedinicama po tjelesnoj masi životinje. Ako se supstanca primjenjuje putem sonde u želudac, doziranje se obavlja približno u isto vrijeme svaki dan, i podešava se po potrebi kako bi se održao konstantan dozni nivo u odnosu na tjelesnu masu životinje. Kada se ispitivanje sa ponovljenom dozom obavlja kao prethodno za dugotrajne studije, potrebno je u oba ispitivanja koristiti sličnu ishranu.

1.3.2.4. Ispitivanje granične doze

Ako ispitivanje doze od 1.000 mg/kg TM/dan, ili ekvivalentne doze u slučaju primjene putem vode za piće ili hrane (preračunato iz vrijednosti za tjelesnu masu) ne dovodi ni do kakvih toksičnih efekata, i ako se toksični efekti ne očekuju iz podataka za strukturno slične supstance, nije potrebno obaviti kompletno ispitivanje sa sve tri doze. Ispitivanja granične doze primjenjuje se u svim slučajevima, osim u onim gde predviĐena izloženost ispitivanoj supstanci kod ljudi ne zahtijeva primjenu veće doze.

1.3.2.5. Vrijeme posmatranja

Vrijeme posmatranja je 28 dana. Životinje iz prateće grupe koje su predviĐene za naknadna posmatranja zadržavaju se još najmanje dodatnih 14 dana bez tretmana kako bi se uočila postojanost toksičnih efekata, odložena pojava efekata ili oporavak od istih.

1.3.3. Postupak

Životinje se doziraju sa ispitivanom supstancom svaki dan, sedam dana u nedelji, tokom perioda od 28 dana, a primjena petodnevnog režima doziranja se dodatno obrazlaže. U slučaju doziranja putem sonde, ispitivana supstanca se primjenjuje u jednoj dozi direktno u želudac, nakon intubiranja. Maksimalna zapremina tečnosti koji se u jednom doziranju primjenjuje zavisi od veličine eksperimentalne životinje. Zapremina ne prelazi 1 mL/100 g TM životinje, izuzev u slučajevima kad se koriste vodeni rastvori i kada je dozvoljeno primjeniti 2 mL/100 g TM životinje. Variranje zapremine ispitivane supstance minimizirati prilagoĐavanjem koncentracije za svaku dozu, kako bi se obezbijedila primjena istih zapremina pri svim doznim nivoima.

1.3.3.1. Opšta posmatranja

Klinička posmatranja životinja obavljaju se najmanje jednom dnevno, ako je moguće u isto vrijeme svakog dana uzimajući u obzir očekivano vrijeme maksimalnog efekta nakon doziranja. Bilježi se i zdravstveno stanje životinja. Najmanje dva puta dnevno vodi se bilješka o smrtnosti ili životinjama na samrti. Životinje na samrti ili životinje koje trpe izrazitu patnju i bol uklanjaju se iz daljeg ispitivanja žrtvovanjem, i podvrgavaju se postmortalnom pregledu. Jedanput prije inicijalnog izlaganja ispitivanoj supstanci (kako bi se omogućilo poređenje unutar grupe životinja), i najmanje jednom nedeljno nakon toga, obavljaju se detaljna klinička posmatranja svih životinja. Ova posmatranja obaviti izvan kaveza u kome se životinja nalazi, i, ako je moguće, svaki put u isto vrijeme. Nalazi se pažljivo bilježe i pomoću sistema ocjenjivanja koji je definisala laboratorijaa koja vrši ispitivanja. Promjene u uslovima ispitivanja su minimalne, a nalaze bilježe objektivni posmatrači koji nisu upućeni u detalje ispitivanja na životinjama. Bilježe

se promjene na koži, krznu, očima, sluznici, kao i pojava sekreta/izlučevina i obeležja autonomne aktivnosti (npr. suzenje, piloerekcija, veličina zenice, neuobičajen način disanja). Potrebno je posmatrati i promjene u hodu, držanju ili promjene uzrokovane rukovanjem životinjama, kao i prisutnost toničko-kloničnih pokreta i stereotipnog ponašanja (npr. preterano čišćenje, hodanje u krug) ili bizarnog ponašanja (npr. samopovrjeĐivanje, hodanje unazad).

U četvrtoj nedelji izlaganja ispitivanoj supstanci utvrđuje se reagovanje životinja na poljne nadražaje različite prirode (npr. auditorne, vizuelne, proprioceptivne), procjenu jačine stiska, i motornu aktivnost. Funkcionalna posmatranja obavljena u četvrtoj nedelji izlaganja se izbjegavaju kad se ispitivanje obavlja kao prethodna studija subhroničnom (90-dnevnom) ispitivanju. U tom slučaju, funkcionalna posmatranja su dio ovog dugotrajnijeg ispitivanja. S druge strane, dostupnost podataka o funkcionalnim posmatranjima izvedenih iz ispitivanja sa ponavljanim dozama omogućava lakši izbor doza za naknadno subhronično ispitivanje. Izuzetno, funkcionalna posmatranja se izbjegavaju kod onih grupa životinja koje pokazuju znake toksičnosti u mjeri koja značajno ometa obavljanje funkcionalnog ispitivanja.

1.4.3.2. Tjelesna masa i potrošnja hrane/vode

Tjelesna masa svih životinja mjeri se najmanje jednom nedeljno. Potrošnja hrane i vode bilježi se najmanje jednom nedeljno. Ako se ispitivana supstanca daje putem vode za piće, vodi se evidencija o potrošnji vode i to najmanje jedanput nedeljno.

1.4.3.3. Hematološka ispitivanja

Na kraju ispitivanja rade se sljedeća hematološka ispitivanja: odrediti hematokrit, koncentraciju hemoglobina, broj eritrocita, broj ukupnih i diferenciranih leukocita, broj trombocita, kao i koagulabilnost. Uzorci krvi uzimaju se sa određenog mjesta neposredno prije ili za vrijeme žrtvovanja životinja, i čuvaju pod odgovarajućim uslovima.

1.4.3.4. Kliničko-biohemijska ispitivanja

Kliničko-biohemijska ispitivanja krvi obavljaju se sa ciljem ispitivanja toksičnih efekata u tkivima, posebno u jetri i bubrezima, i to na uzorcima krvi svih eksperimentalnih životinja neposredno prije ili za vrijeme njihovog žrtvovanja (osim onih koje su već pronaĐene mrtve ili koje su žrtvovane u meĐuvremenu). Prije uzimanja uzoraka krvi uskraćuje se hrana životinjama preko noći. Ispitivanja u plazmi ili serumu uključuju i određivanje natrijuma, kalijuma, glukoze, ukupnog holesterola, uree, kreatinina, ukupnih proteina i albumina, i aktivnosti najmanje dva enzima kao indikatora hepatocelularnih efekata (kao što su: alanin aminotransferaza, aspartat aminotransferaza, alkalna fosfataza, gama glutamil transpeptidaza i sorbitol dehidrogenaza). Obavljajus se i mjerenja aktivnosti drugih enzima (enzimi jetre ili nekog drugog porijekla) kao i žučnih kiselina što može pod određenim okolnostima obezbijediti korisne informacije. Neobavezno, tokom posljednje nedelje ispitivanja, mogu se obaviti i sljedeći pregledi urina sakupljenog u određenom vremenu: odrediti izgled, zapreminu, osmolalnost ili specifičnu gustinu, pH, proteine, glukozu i prisutnost krvi/krvnih ćelija u urinu. Ako se sumnja da ispitivana supstanca Dijeluje na metaboličke procese, obavljaju se i druga određivanja, kao što su određivanje koncentracije kalcijuma, fosfora, triglicerida, nivoa specifičnih hormona, methemoglobina, i aktivnost holinesteraze. Svi ovi parametri određuju se pri ispitivanju hemikalija iz određenih klasa, tj. u određenim slučajevima. Ako ne postoje adekvatni podaci o

kontrolnim vrijednostima parametara iz prethodnih ispitivanja, razmatra se potreba za određivanjem hematoloških i kliničko-biohemijskih parametara i prije nego što se započne sa doziranjem ispitivane supstance.

1.4.3.5. Postmortalni pregled

Sve životinje koje se koriste u ispitivanju podvrgavaju se detaljnom postmortalnom pregledu, koja uključuje pažljiv pregled poljašnje površina tijela, uključujući sve otvore, lobanju, grudnu i trbušnu duplju. Jetru, bubrege, nadbubrežne žlijezde, testise, semenike, timus, slezenu, mozak i srce svih životinja odvojiti od okolnog tkiva, i što je prije moguće, vlažne izmjeriti odmah nakon sekcije kako bi se izbjeglo sušenje.

Sljedeće vrste tkiva čuvaju se u medijumumu za fiksiranje radi naknadnog izvoĐenja histopatoloških pregleda: sva vidljivo oštećena tkiva, mozak (reprezentativne regije, uključujući veliki mozak, mali mozak i produženu moždinu), kičmena moždina, želudac, tanko i debelo crijevo (uključujući Pajerove ploče), jetra, bubrezi, nadbubrežne žlijezde, slezina, srce, timus, štitna žlijezda, dušnik, pluća (ubrizgavanjem fiksatora pa potom uranjanjem u isti medijumum), polne žlijezde, pomoćni polni organi (npr. materica, prostata), mokraćna bešika, limfni čvorovi (po mogućnosti, jedan uzet sa puta unosa ispitivane supstance u organizam, i drugi, udaljen od njega kako bi se proučili sistemski efekti), periferni nerv (n. ischiadicus ili n. tibialis), po mogućstvu smješten uz sam mišić, i isječak koštane srži (ili svjež aspirat koštane srži). Klinički i drugi nalazi upućuju na potrebu za ispitivanjem i drugih tkiva. Čuvaju se i svi organi koji se na osnovu saznanja o svojstvima ispitivane supstance smatraju ciljnim.

1.4.3.6. Histopatološka ispitivanja

Kompletna histopatološka ispitivanja obavljaju se na sačuvanim organima i tkivima svih životinja iz kontrolne grupe, i grupe izložene visokoj dozi ispitivane supstance. Ako se primjete promjene kod životinja na koje je primjenjena visoka doza ispitivane supstance, histopatološka ispitivanja se obavljaju i na životinjama iz svih ostalih grupa. Ispituju se sve veće (makroskopski vidljive) lezije. Ako je korišćena pomoćna grupa, histopatološkoj obradi se podvrgavaju tkiva i organi na kojima su se kod tretiranih životinja primjetile neke promjene.

2. Podaci

Za svaku životinju vode se posebni podaci. Podaci se prikazuju tabelarno gdje se za svaku ispitivanu grupu životinja navodi broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje su uginule ili su žrtvovane iz humanih razloga za vrijeme ispitivanja (zajedno sa vremenom žrtvovanja), kao i broj životinja kod kojih su pronaĐeni znaci toksičnosti. Daje se i detaljan opis uočenih znakova toksičnosti, vrijeme kada su primjećeni, njihovo vrijeme trajanja i stepen izraženosti, kao i broj životinja kod kojih su primjećene lezije zajedno sa opisom tipa lezija i procentom životinja kod kojih su pronaĐene. Svi rezultati se analiziraju pomoću odgovarajuće statističke metode, koju je najbolje odabrati još u vrijeme planiranja ispitivanja.

3. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži:
1. Podatke o eksperimentalnim životinjama:

- vrstu/soj;
- broj, starost i pol životinja;
- porijeklo životinja, uslove smještaja, ishrane itd.;
-individualne tjelesne mase životinja na početku ispitivanja, kasnije u nedeljnim intervalima i na kraju ispitivanja.

2. Podatke o uslovima ispitivanja:
- obrazloženje za izbor pomoćnog sredstva, ako se ne radi o vodi;
- razloge za izbor doze/koncentracije ispitivane supstance;
- detalje o formulaciji ispitivane supstance, ishrani, postignutoj koncentraciji ispitivane supstance, stabilnosti i homogenosti pripremljene formulacije;
- detalje o načinu primjene ispitivane supstance;
- ukoliko je primjenjivo, preračunavanja koncentracije ispitivane supstance primjenjene hranom ili putem vode (ppm) na dozu (mg/kg TM/dan); - detalje o kvalitetu hrane i vode.

3. Rezultate:
- tjelesnu masu/promjene u tjelesnoj masi;
- konzumiranje hrane i vode;
- podatke o zabilježenim toksičnim efektima prikazane po polu i primjenjenoj dozi ispitivane supstance;
- podatke o prirodi, težini i trajanju kliničkih promjena (da li su reverzibilne ili nisu);
- procjenu senzorne aktivnosti, jačina stiska i motorne aktivnosti;
- rezultate hematoloških ispitivanja, sa relevantnim kontrolnim vrijednostima;
- rezultate kliničko-biohemijskih ispitivanja sa relevantnim kontrolnim vrijednostima;
- tjelesnu masu pre žrtvovanja i masu pojedinačnih organa;

- nalaze postmortalnog pregleda;
- detaljan opis svih histopatoloških nalaza; - podatke o apsorpciji;
- statističku obradu rezultata.

4. Tumačenje rezultata. 5. Zaključke.

B.8. AKUTNA (INHALACIONA) TOKSIČNOST (28 DANA) - PONOVLJENE DOZE

1. Metoda ispitivanja

Ekvivalentna međunarodna ispitna metoda navedena je u tabeli 2 dijela 0.

1.1. Uvod

Treba obezbijediti podatke o svojstvima ispitivane supstance: raspodjela veličine čestica, pritisak pare, tačka topljenja, tačka ključanja, tačka paljenja i eksplozivnost (ako se radi o eksplozivnoj supstanci).

Uvod je dat u Opšti uvod, Dio A.

1.2. Referentne supstance

Referentne supstancee nijesu propisane.

1.3. Princip metode ispitivanja

Grupe eksperimentalnih životinja dnevno se izlažu rastućim koncentracijama ispitivane supstance tokom vremenskog perioda od 28 dana. Svaka grupa životinja izlaže se jednoj koncentraciji. Koristi se i vehikulum koji omogućava postizanje odgovarajuće koncentracije ispitivane supstance u atmosferi. Za vehikulum se određuje i dodatna kontrolna grupa. Životinje se posmatraju svaki dan tokom vremena izlaganja ispitivanoj supstanci kako bi se uočili znaci toksičnosti. Životinje koje uginu za vrijeme eksperimenta podvrgavaju se postmortalnom pregledu, a po završetku eksperimenta i preživjele životinje se žrtvuju i postmortalno pregledaju.

1.4. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta nijesu propisani.

1.5. Opis metode ispitivanja

1.5.1. Priprema

Životinje se drže u eksperimentalnim uslovima i hrane po definisanom eksperimentalnom režimu najmanje pet dana prije početka ispitivanja. Prije ispitivanja zdrave mlade jedinke nasumice se grupišu u prethodno definisan broj eksperimentalnih grupa. Kada je neophodno, dodaje se vehikulum koji omogućava postizanje odgovarajuće koncentracije ispitivane supstance u atmosferi. Odabrani vehikulum nije toksičan.

1.5.2. Uslovi ispitivanja

1.5.2.1. Eksperimentalne životinje

Ako ne postoje kontraindikacije, koriste se pacovi i to sojevi koji se najčešće koriste u laboratorijaskim ispitivanjima. Na početku ispitivanja, raspon tjelesnih masa pojedinačnih životinja ne prelazi ± 20% od srednje vrijednosti.

1.5.2.2. Broj i pol

Najmanje 10 glodara (pet ženki i pet mužjaka) koristi se za svaku ispitivanu koncentraciju. Ženke nisu ranije rađale i nisu gravidne. Ako se u toku ispitivanja planiraju prevremena žrtvovanja, broj životinja u ispitivanju povećava se za broj koji je planiran za žrtvovanje u toku ispitivanja. Prateća grupa od deset životinja (po pet životinja svakog pola) se izlaže i visokim koncentracijama ispitivane supstance u periodu od 28 dana, kako bi se 14 dana nakon tretmana zabilježile reverzibilnost, postojanost ili vremenski odložena pojava toksičnih efekata. Ukoliko se obavlja ovo posmatranje, uključuje se pomoćna grupa od 10 kontrolnih životinja (po pet svakog pola).

1.5.2.3. Koncentracije

Koriste se najmanje tri koncentracije ispitivane supstance, zajedno sa odgovarajućim kontrolama (ako se koristi vehikulum, druga kontrola sadrži vehikulum u najvećoj datoj koncentraciji). Osim primjene ispitivane supstance, sa životinjama u kontrolnim grupama postupa se na isti način kao sa životinjama iz ispitivanih grupa. Najveća koncentracija ispitivane supstance izaziva toksične efekte, ali bez ili sa minimalnim brojem uginulih životinja. Najniža koncentracija ne izazova toksične efekte. Kada je moguće predvidjeti izloženost ispitivanoj supstanci kod ljudi, najniža koncentracija primjenjena na životinje je malo viša od ove vrijednosti. Idealno, srednja koncentracija ispitivane supstance izaziva minimalne toksične efekte. Ako se koristi nekoliko srednjih koncentracija, tada su njihove vrijednosti pravilno razmaknute kako bi se postigla gradacija toksičnih efekata. U grupama kod kojih su primjenjene niske ili srednje koncentracije ispitivane supstance, kao i u kontrolnim grupama, učestalost smrtnih slučajeva kod životinja je niska kako bi interpretacija rezultata imala smisla.

1.5.2.4. Dužina izlaganja

Trajanje izlaganja tokom jednog dana je šest sati.

1.5.2.5. Oprema

Životinje se podvrgavaju ispitivanju pomoću opreme kojom se održava konstantni protok vazduha sa najmanje 12 potpunih izmjena u jednom satu, kako bi se obezbijedila odgovarajuća koncentracija kiseonika i ravnodnosno raspoređena atmosfera. Kada se koristi komora, njen dizajn je dovoljno prostran da minimizira skučenost životinja i omogući maksimalnu izloženost ispitivanoj supstanci udisanjem. Kao opšte pravilo koje obezbjeđuje stabilnost atmosfere u komori koristi se mjera prema kojoj "zapremina" životinja nije veća od 5% ukupne zapremine komore. Koriste se različiti tipovi komora koji omogućavaju izloženost čitavog tijela, samo glave ili samo oro-nazalnih otvora životinje, a ove posljednje dvije komore minimiziraju izloženost ispitivanoj supstanci nekim drugim putem unosa.

1.5.2.6. Vrijeme posmatranja

Eksperimentalne životinje posmatraju se svaki dan kako bi se uočili znaci toksičnosti i to tokom trajanja čitavog eksperimenta kao i za vrijeme oporavka. Važno je zabillježiti vrijeme pojave ili nestanka prvih znakova trovanja, kao i vrijeme uginuća.

1.5.3. Postupak

Životinje se svakodnevno izlažu ispitivanoj supstanci, ili pet do sedam dana u nedelji, u vremenskom periodu od 28 dana. Životinje iz pratećih grupa koje su predviĐene za naknadna praćenja zadržavaju se dodatnih 14 dana bez tretmana kako bi se zabilježila postojanost toksičnih efekata ili oporavak. Temperatura na kojoj se obavlja ispitivanje održava se na 22 °C ± 3 °C. Relativna vlažnost je između 30% i 70%, ali u nekim slučajevima (npr. kod ispitivanja aerosola) ovo nije izvodljivo. Održavanjem negativnog pritiska unutar komore (± 5 mm vode) sprječava se izlazak ispitivane supstance u okolinu. Za vrijeme izlaganja ispitivanoj supstanci životinjama se ne daje hrana i voda. U toku ispitivanja koristi se odgovarajući dinamični sistem sa mogućnošću kontrole koncentracije ispitivane supstance. Za uspostavljanje odgovarajuće koncentracije ispitivane supstance, preporučuje se obavljanje probnog ispitivanja. Komora je dizajnirana na takav način da omogućava homogenu distribuciju vazduha za vrijeme trajanja

eksperimenta. Sistem omogućava stabilne uslove i njihovo uspostavljanje u što kraćem vremenskom periodu. Sprovode se mjerenja i prate sljedeći parametri:

a) brzina protoka vazduha (kontinuirano);

b) koncentracije ispitivane supstance u zoni udisanja;

Tokom dnevnih izlaganja, koncentracija ispitivane supstance ne varira više od ± 15% od srednje vrijednosti. Kod aerosola se teško postiže ovakva kontrola doziranja, pa se u tom slučaju tolerišu veće razlike u vrijednostima. Za vrijeme trajanja kompletnog ispitivanja, dnevne koncentracije su što je moguće stabilnije. Za aerosole se obavlja i analiza veličine čestica (najmanje jedanput nedeljno u svakoj grupi životinja);

v) temperatura i vlažnost (kontinuirano, ako je moguće);

Opažanja se bilježe sistematično za vrijeme i nakon izlaganja. Svaka životinja ima poseban karton. Životinje se prate svaki dan, a znaci trovanja bilježe se redovno, uključujući vrijeme pojave, ozbiljnost i trajanje. Bilježe se promjene na koži i krznu, očima, sluznici, respiratornom, kardiovaskularnom, autonomnom i centralnom nervnom sistemu, kao i somatomotorna aktivnost i način ponašanja. Jednom nedeljno određuje se tjelesna masa životinja i prati potrošnja hrane. Životinje se redovno prate kako bi se izbjegao gubitak zbog kanibalizma ili autolize tkiva. Na kraju ispitivanja obavlja se postmortalni pregled svih preživjelih životinja iz osnovnih (ne pratećih) ispitivanih grupa. Životinje koje su izrazito slabe ili na samrti izdvajaju se iz grupe i žrtvuju na humani način, a potom se postmortalno pregledaju. Sljedeća ispitivanja sprovode se na kraju eksperimenta na svim životinjama, uključujući i one iz kontrolne grupe:

1) hematološka ispitivanja, uključujući hematokrit, koncentraciju hemoglobina, broj eritrocita, broj ukupnih i pojedinih loza leukocita, kao i koagulabilnost krvi; i

2) kliničko-biohemijska ispitivanja krvi uključujući najmanje jedan parametar koji ukazuje na funkciju jetre i bubrega: alanin aminotransferaza (poznata i pod nazivom: glutamat piruvat transaminaza), aspartat aminotransferaza (poznata i pod nazivom: glutamat oksaloacetat transaminaza), azot uree, albumin, kreatinin, ukupni bilirubin i proteini u serumu.

Druga ispitivanja za adekvatnu evaluaciju toksičnosti uključuju određivanje kalcijuma, fosfora, hlorida, natrijuma, kalijuma, glukoze (u uslovima gladovanja), lipida, hormona, acido-baznu ravnotežu methemoglobin i aktivnost holinesteraze.

Dodatne biohemijske analize obavljaju se po potrebi, kako bi se detaljnije proučili toksični efekti.

1.6.3.1. Postmortalni pregled

Sve eksperimentalne životinje detaljno se postmortalno pregledaju. Odmah nakon sekcije mjere se, još vlažni, sljedeći organi: jetra, bubrezi, nadbubrežne žlijezde, pluća i testisi. Organi i tkiva (respiratorni trakt, jetra, bubrezi, slezina, testisi, nadbubrežne žlijezde i srce, kao i drugi organi na kojima se primjete promjene u veličini) čuvaju se u odgovarajućem medijumumu za dalja histopatološka ispitivanja. Pluća se vade netaknuta, mjere i stavljaju u odgovarajući fiksator kako bi sačuvala sve strukture.

1.6.3.2. Histopatološka ispitivanja

U kontrolnim grupama i grupama izloženim visokim koncentracijama ispitivane supstance obavljaju se histološka ispitivanja izolovanih organa i tkiva. Organi i tkiva koji pokažu oštećenja

koja se mogu pripisati visokim koncentracijama ispitivane supstance detaljno se ispituju i kod životinja koje su bile izložene nižim koncentracijama. Životinje iz pratećih grupa takođe je potrebno histološki obraditi sa posebnom pažnjom na organima i tkivima koja su pokazala promjene i kod životinja iz drugih ispitivanih grupa.

2. Podaci

Podaci se prikazuju tabelarno gdje se za svaku ispitivanu grupu životinja navodi broj životinja na početku eksperimenta, kao i broj životinja kod kojih su pronađene promjene. Svi dobijeni rezultati analiziraju se pomoću odgovarajuće statističke metode. Koristi se bilo koja prihvaćena statistička metoda.

3. Izvještaj o rezultatima

3.1. Pisanje izvještaja

Izvještaj o ispitivanju sadrži: 1. Podatke o eksperimentalnim životinjama:

- vrstu, soj, porijeklo, uslove čuvanja, ishrane, itd.

2. Podatke o uslovima ispitivanja: - opis komore ili aparature uključujući dizajn, tip, dimenzije, izvor vazduha, sistem za raspršivanje aerosola, metode za kondicioniranje vazduha i način čuvanja životinja u komori.
   - opis aparature za mjerenje temperature, vlažnosti, koncentracije aerosola i određivanje raspodjele veličine čestica.
3. Podatke o izlaganju ispitivanoj supstanci:
   - ovi podaci prikazuju se tabelarno u vidu srednjih vrijednosti sa odstepenima (standardna devijacija), a ako je moguće sadrže i podatke o: a) brzini protoka vazduha kroz otvore u aparaturi;
   b) temperaturi i vlažnosti vazduha;
   c) nominalnoj koncentraciji (ukupnom sadržaju ispitivane supstance koja se uvodi kroz otvore u aparaturi, podijeljenom sa zapreminom vazduha); d) prirodi vehikuluma, ako je korišćen;
   e) tačnoj koncentraciji supstance u zoni udisanja;
   f) srednjem masenom aerodinamičkom dijametru (MMAD) i geometrijskoj standardnoj devijaciji (GSD).
4. Podatke o nalazima o toksičnim efektima predstavljenim u odnosu na pol životinja i koncentraciju ispitivane supstance;
5. Vrijeme uginuća u toku eksperimenta, tj. da li su životinje preživjele eksperiment;
6. Opis toksičnih i ostalih efekata; koncentraciju bez efekta;
7. Vrijeme pojave abnormalnosti i njihov kasniji tok;
8. Podatke o ishrani i tjelesnoj masi;
9. Podatke o hematološkim ispitivanjima i nalazima;
10. Rezultate kliničko-biohemijskih ispitivanja;
11. Nalaze postmortalnog pregleda;
12. Detaljan opis svih histopatoloških nalaza;
13. Statističku obradu rezultata;
14. Raspravu o rezultatima;
15. Tumačenje rezultata.

3.2. Procjena i tumačenje

Procjena i tumačenje su dati u opšti uvod (Dio G).

B.9. AKUTNA (DERMALNA) TOKSIČNOST (28 DANA) - PONOVLJENE DOZE

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

Uvod je dat u opšti uvod (Dio A).

1.2. Referentne supstance

Referentne supstance nijesu propisane.

1.3. Princip metode ispitivanja

Ispitivana supstanca primjenjuje se svakodnevno na kožu životinja podijeljenih u grupe u rastućim dozama. Na jednu grupu životinja primjenjuje se jedna doza tokom perioda od 28 dana. Tokom primjene ispitivane supstance životinje se svakodnevno posmatraju kako bi se bilježili znaci toksičnosti. Životinje koje uginu tokom ispitivanja postmortalno pregledaju se, a na kraju eksperimenta i preživjele životinje se žrtvuju i postmortalno pregledaju.

1.4. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta nijesu propisani.

1.5. Opis metode ispitivanja

1.5.1. Priprema

Životinje se drže u eksperimentalnim uslovima i hrane po definisanom eksperimentalnom režimu najmanje pet dana prije početka ispitivanja. Prije ispitivanja, zdrave mlade životinje nasumice se dijle u ispitivane i kontrolne grupe. Neposredno prije početka ispitivanja, životinjama se uklanja krzno sa dorzalnog dela tijela. Krzno se može ukloniti i brijanjem, ali je u tom slučaju brijanje potrebno uraditi 24 sata pre ispitivanja. Šišanje i brijanje se ponavljaju jednom nedeljno. Kod uklanjanja krzna, pazi se da ne dođe do oštećenja kože. Za primjenu ispitivane supstance čisti se najmanje 10% ukupne površine kože životinje. Kod procjene površine i dimenzija kože koja se čisti uzima se u obzir i tjelesna masa životinje. Ako se ispituje čvrsta supstanca, koja se po potrebi može usitniti do praha, dobijeni prašak se dobro ovlaži vodom ili nekim drugim vehikulumom kako bi se omogućio dobar kontakt sa kožom. Ako se koristi neki vehikulum, uzima se u obzir i njegov uticaj na prodiranje ispitivane supstance kroz kožu. Ispitivane supstance koje se već nalaze u tečnom obliku, najčešće se koriste nerazblažene. Ispitivana supstanca se primjenjuje na kožu između pet do sedam dana nedeljno.

1.5.2. Uslovi ispitivanja

1.5.2.1. Eksperimentalne životinje

Za ovakav tip ispitivanja najčešće se koriste odrasli pacovi, zečevi ili zamorci. Ako se koriste druge vrste laboratorijaskih životinja, daje se obrazloženje za ovo korišćenje. Na početku eksperimenta raspon tjelesnih masa životinja ne prelazi ± 20% od odgovarajuće srednje vrijednosti.

1.5.2.2. Broj i pol

Najmanje 10 životinja (5 mužjaka i 5 ženki) sa zdravom kožom koriste se za svaku ispitivanu dozu. Ispitivanje se vrši na ženkama koje nisu ranije rađale i koje nisu gravidne. Ako se u toku eksperimenta planiraju prevremena žrtvovanja, broj životinja u eksperimentu povećava se za broj koji se planira žrtvovati u toku ispitivanja. Prateća grupa od 10 životinja (po pet svakog pola) se izlaže visokim koncentracijama ispitivane supstance u periodu od 28 dana, kako bi se 14 dana nakon tretmana zabilježile reverzibilnost, postojanost ili odložena pojava toksičnih efekata. Ukoliko se obavlja ovo posmatranje, uključuje se pomoćna grupa od 10 kontrolnih životinja (po pet svakog pola).

1.5.2.3. Dozni nivoi

Koriste se najmanje tri doze ispitivane supstance, zajedno sa odgovarajućim kontrolama (ako se koristi vehikulum, druga kontrola se izlaže vehikulumu). Vrijeme izlaganja je najmanje šest sati dnevno. Ispitivana supstanca nanosi se na kožu u približno isto vrijeme svakog dana, a naneta doza se prilagođava (jedanput ili dva puta nedeljno) promjenama tjelesne mase životinje. Osim primjene ispitivane supstance, sa životinjama u kontrolnim grupama postupa se identično kao sa životinjama iz ispitivanih grupa. Ako se koristi vehikulum, kontrolna grupa životinja dozira se vehikulumom na isti način kao i ispitivana grupa kojoj je primjenjena najveća doza. Najveća doza ispitivane supstance izaziva toksične efekte kod životinja, ali bez ili sa minimalnim brojem uginulih životinja. Najniža koncentracija ne treba da izazove toksične efekte.

Kada je moguće predvidjeti izloženost ispitivanoj supstanci kod ljudi, najniža koncentracija primjenjena na životinje je malo viša od ove vrijednosti. Idealno, srednja koncentracija ispitivane supstance izaziva minimalne toksične efekte. Ako se koristi nekoliko srednjih koncentracija, njihove vrijednosti su pravilno raspoređene kako bi se postigla gradacija toksičnih efekata. U grupama kod kojih su primjenjene niske ili srednje koncentracije ispitivane supstance, kao i u kontrolnim grupama, učestalost smrtnih slučajeva kod životinja je niska kako bi tumačenje rezultata imalo smisla.

Ako primjena ispitivane supstance izaziva tešku iritaciju kože, doze smanjiti, što može uticati na smanjenje ili potpuni nestanak drugih toksičnih efekata kod visokih doza. Ako dođe do izrazitih oštećenja kože, preporučuje se okončavanje ispitivanja i početak novog ispitivanja sa nižim koncentracijama ispitivane supstance.

1.5.2.4. Ispitivanje granične doze

Ako prethodno ispitivanje sa dozom od 1.000 mg/kg ili većom dozom u slučajevima kada se predviĐa izloženost ljudi većoj dozi ne rezultira toksičnim efektima, nastav ispitivanja smatra se nepotrebnim.

1.5.2.5. Vrijeme posmatranja

Eksperimentalne životinje posmatraju se svakog dana kako bi se uočili znaci toksičnosti.
Bilježi se vrijeme pojave ili nestanka prvih znakova toksičnosti, kao i vrijeme uginuća.

1.5.3. Postupak

Životinje se drže u posebnim kavezima. U idealnim uslovima, životinje se tretiraju sedam dana u nedelji, tokom perioda od 28 dana. Životinje iz pratećih grupa koje su predviĐene za naknadna praćenja zadržavaju se dodatnih 14 dana bez tretmana kako bi se zabilježila postojanost toksičnih efekata ili oporavak. Vrijeme izlaganja je najmanje šest sati dnevno. Ispitivana supstanca primjenjuje se ravnodnosno preko čitave površine koja iznosi otprilike 10% od ukupne površine kože. U slučaju veoma toksičnih supstanci, izložena površina može biti i manja, ali se primjenjeni sloj ravnodnosno rasporedi u što je moguće tanjem sloju. Tokom ispitivanja ispitivana supstanca se drži u kontaktu sa kožom pomoću porozne gaze i flastera koji ne izaziva iritaciju kože. Mjesto primjene dodatno se može prekriti kako bi se onemogućila ingestija ispitivane supstance. Ako je neophodno, životinji se stavljaju i dodatni štitnici kojima se sprečava direktan kontakt sa tretiranom kožom, ali se ne preporučuje kompletna imobilizacija životinje. Kao alternativa koristi se zaštitni okovratnik. Višak ispitivane supstance uklanja se ispiranjem vodom ili pomoću nekog drugog sredstva za čišćenje kože. Posmatranja se svakodnevno sistematično bilježe. Bilježe se znaci toksičnosti, vrijeme njihove pojave, stepen i trajanje; promjene na koži i krznu, očima, sluzokoži, respiratornom, kardiovaskularnom, autonomnom i centralnom nervnom sistemu, kao i somatomotorna aktivnost i način ponašanja. Jednom nedeljno određuje se tjelesna masa životinja i bilježe opažanja vezana za potrošnju hrane. Redovno se prate životinje kako bi se izbjegao njihov gubitak zbog kanibalizma ili autolize tkiva. Na kraju eksperimenta, postmortalno pregledaju se sve preživjele životinje iz osnovnih (ne pratećih) ispitivanih grupa. Životinje koje su izrazito slabe ili na samrti izdvajaju se iz grupe i žrtvuju iz humanih razloga, a potom se postmortalno pregledaju. Sprovode se sljedeća ispitivanja na kraju eksperimenta na svim životinjama uključujući one iz kontrolne grupe:

1. hematološka ispitivanja, uključujući hematokrit, koncentraciju hemoglobina, broj eritrocita, broj ukupnih i pojedinih loza leukocita, kao i brzinu zgrušavanja krvi;
2. kliničko-biohemijska ispitivanja krvi, uključujući najmanje jedan parametar koji ukazuje na funkciju jetre i bubrega: alanin aminotransferaza (poznata i pod nazivom: glutamat piruvat transaminaza), aspartat aminotransferaza (poznata i pod nazivom: glutamat oksaloacetat transaminaza), azot uree, albumin, kreatinin, ukupni bilirubin i proteini u serumu;
3. druga ispitivanja koja mogu biti potrebna za adekvatnu evaluaciju toksičnosti uključujući određivanje kalcijuma, fosfora, hlorida, natrijuma, kalijuma, glukoze (u uslovima gladovanja), lipida, hormona, acido-baznu ravnotežu, methemoglobin i aktivnost holinesteraze;
4. dodatne biohemijske analize obavljaju se po potrebi, kako bi se detaljnije proučili toksični efekti.

1.6.4. Postmortalni pregled

Sve eksperimentalne životinje detaljno se postmortalno pregledaju. Sljedeći organi mjere se odmah nakon sekcije, još vlažni: jetra, bubrezi, nadbubrežne žlijezde, pluća i testisi. Organi i tkiva (respiratorni trakt, jetra, bubrezi, slezina, testisi, nadbubrežne žlijezde i srce, kao i drugi organi na kojima se primete promjene u veličini) čuvaju se u odgovarajućem medijumumu za dalja histopatološka ispitivanja. Pluća se vade netaknuta, mjere i stavljaju u odgovarajući fiksator kako bi se sačuvale sve strukture.

1.6.5. Histopatološka ispitivanja

U kontrolnim grupama i grupama izloženim visokim koncentracijama ispitivane supstance prave se histološka ispitivanja izolovanih organa i tkiva. Organi i tkiva koji pokažu oštećenja koja se pripisuju visokim koncentracijama ispitivane supstance detaljno se ispituju i kod životinja koje su bile izložene nižim koncentracijama. Životinje iz pratećih grupa takođe se histološki obrađuju sa posebniom pažnjom na organe i tkiva koja su pokazala promjene i kod životinja iz drugih ispitivanih grupa.

2. Podaci

Podaci se prikazuju tabelarno gdje se za svaku ispitivanu grupu životinja navodi broj životinja na početku eksperimenta, kao i broj životinja kod kojih su pronađene promjene. Svi dobijeni rezultati analiziraju se odgovarajućom statističkom metodom. Koristi se bilo koja prihvaćena statistička metoda.

3. Izvještaj o ispitivanju

3.1. Pisanje izvještaja Izvještaj o ispitivanju sadrži:

1. Podatke o eksperimentalnim životinjama:

- vrstu, soj, porijeklo, uslovi smještaja, ishrana itd.

2. Podatke o uslovima ispitivanja (uključujući način primjene, okluzivni ili ne-okluzivni). 3. Koncentracije ispitivane supstance u dozama (koncentracija vehikuluma, ako je korišćen).
4. Podatke o dozi bez štetnog efekta.
5. Podatke o toksičnim efektima, sortirane prema polu životinja i primjenjenoj dozi ispitivane supstance.
6. Vrijeme smrti u toku eksperimenta, tj. da li su životinje preživjele celi eksperiment. 7. Opis toksičnih ili drugih efekata.
8. Vrijeme opažanja bilo kakvih abnormalnosti, i njihov kasniji tok.
9. Podatke o ishrani i tjelesnoj masi.
10. Podatke o hematološkim ispitivanjima i nalazima.
11. Rezultate kliničko-biohemijskih ispitivanja.
12. Nalaze postmortalnog pregleda.
13. Detaljan opis svih histopatoloških nalaza. 14. Statističku obradu rezultata kada je moguće.
15. Raspravu o rezultatima. 16. Tumačenje rezultata.

1. Metoda ispitivanja

Metoda ispitivanja mutagenosti –in vitro ispitivanje hromozomskih aberacija kod sisara zasniva se na metodi OECD: TG 473, *In vitro* ispitivanje hromozomskih aberacija (1997).

1.1. Uvod

Svrha *in vitro* ispitivanja hromozomskih aberacija je utvrĐivanje agenasa koji uzrokuju strukturnu hromozomsku aberaciju u kulturi ćelija sisara. Postoje dvije vrste strukturnih aberacija: hromozomska i hromatidna. Sa većinom hemijskih mutagena izazvane aberacije su na hromatidama, ali može doći i do aberacija na hromozomima. Povećanje polipoidnosti može da ukaže na to da hemikalija ima potencijal za izazivanje Numeričkih aberacija. Ova metoda nije namijenjena za mjerenje Numeričkih aberacija i ne koristi se rutinski u te svrhe. Hromozomske mutacije i s njima povezani efekti uzrok su mnogih genetskih oboljenja kod ljudi. Postoje dokazi da hromozomske mutacije i s njima povezani efekti koji izazivaju promjene u onkogenima i tumor-supresorskim genima somatskih ćelija imaju ulogu u izazivanju kancera kod ljudi i eksperimentalnih životinja. *In vitro* ispitivanje hromozomskih aberacija koristi: kulture utvrĐenih ćelijskih linija, ćelijskih vrsta ili u prvom redu ćelijskih kultura. Ćelije se biraju na osnovu sposobnosti rasta u kulturi, stabilnosti kariotipa, hromozomskog broja, hromozomske h raznolikosti i spontane frekvencije hromozomskih aberacija. Ispitivanja koja se obavljaju *in vitro* zahtijevaju upotrebu egzogenog izvora metaboličke aktivacije. Ovaj sistem metaboličke aktivacije ne može u cijelini da imitira *in vivo* uslove sisara. Izbjegavaju se uslovi koji dovode do pozitivnih rezultata, a koji ne odražavaju suštinsku mutagenost i koji mogu da nastanu usled promjena u pH, osmolalnosti ili usled visokog nivoa citotoksičnosti. Ovo ispitivanje koristi se za traženje mogućih mutagena i karcinogena za sisare. Mnoge supstance koje su pozitivne u ovom ispitivanju, karcinogene su za sisare. Uzajamna zavisnost između ovog ispitivanja i karcinogenosti nije besprekorna. Uzajamna zavisnost zavisi od hemijske klase. Sve je više dokaza da postoje karcinogeni koji se ne otkrivaju ovim ispitivanjem, jer Dijeluju mehanizmima koji su drugačiji od neposrednog oštećenja DNK.

1.2. Definicije

Aberacija tipa hromatida je strukturno oštećenje hromozoma izraženo kao prekidanje pojedinih hromatida ili prekidanje i ponovno spajanje između hromatida.

Aberacija tipa hromozoma je strukturno oštećenje hromozoma izraženo kao prekidanje pojedinih hromatida ili prekidanje i ponovno spajanje hromatida na identičnom mjestu.

Endoreduplikacija je proces kod kojeg nakon S faze DNK replikacije jezgro ne ulazi u mitozu, već započinje druga S faza. Rezultat procesa su hromozomi sa 4, 8, 16 i više hromatida.

"Gap" (prekid) je ahromatska lezija manja od širine jedne hromatide i sa minimalnom iskrivljenošću hromatida.

Mitotski indeks je odnos broja ćelija u metafazi i ukupnog broja ćelija koje su posmatrane u populaciji ćelija; odnosno mitotski indeks jeste mera stepena proliferacije te ćelijske populacije.

Numjerička aberacija je promjena u broju hromozoma u odnosu na normalan broj karakterističan za korišćene ćelije.

Poliploidija je pojava kada ćelija sadrži više od haploidnog broja hromozoma (n), osim kada sadrži diploidni broj hromozoma (tj. 3n, 4n, itd.).

Strukturna aberacija je promjena u strukturi hromozoma koja se može otkriti mikroskopskim pregledom u metafazi ćelijske deobe, a koja se zapaža u vidu delecija i fragmentacija, translokacija ili inverzija.

1.3. Princip metode

Ćelijske kulture izlažu se ispitivanoj supstanci uz metaboličku aktivaciju i bez nje. Nakon izlaganja ćelijskih kultura ispitivanoj supstanci, u prethodno određenim intervalima, ćelijske kulture se tretiraju supstancama koje prekidaju metafazu (npr. Colcemid® ili kolhicin); zatim se uzimaju, boje i mikroskopski se analiziraju ćelije u metafazi, odnosno ispituju se na prisutnost hromozomskih aberacija.

1.4. Opis metode

1.4.1. Preparati

1.4.1.1. Ćelije

Koriste serazličite ćelijske linije, sojevi ili primarne ćelijske kulture, uključujući humane ćelije (npr.
fibroblasti kineskog hrčka, humani ili drugi limfociti periferne krvi sisara).

1.4.1.2. Medijumum (hranljive podloge) i uslovi kultivisanja

Za održavanje kultura koriste se odgovarajuće hranljive podloge i uslovi inkubacije (posude, CO_2 koncentracija, temperatura i vlažnost). Postojećim ćelijskim linijama i sojevima rutinski se provjerava stabilnost u modalnom broju hromozoma i odsustvo kontaminacije mikoplazmom pri čemu se ćelijske linije i sojevi ne koriste ako su kontaminirani. Poznato je uobičajeno vrijeme ćelijskog ciklusa ćelije i uslovi kultivisanja koji se koriste.

1.4.1.3. Priprema kultura

Utvrđene ćelijske linije i sojevi: ćelije se umnožavaju od "stock" kultura, zasijavaju se u podlozi pri gustini koja je takva da se u kulturama ne dostigne konfluentnost prije vremena sakupljanja i inkubiraju se na temperaturi od 37°C. Limfociti: puna krv tretirana sa antikoagulansom (npr. heparinom) ili izdvojeni limfociti dobijeni od zdrave životinje dodaju se podlozi koji sadrži mitogen (npr. fitohemaglutinin) i inkubiraju se na temperaturi od 37°C.

1.4.1.4. Metabolička aktivacija

Ćelije se izlažu ispitivanoj supstanci u prisustvu i u odsustvu odgovarajućeg sistema metaboličke aktivacije. Najčešće korišćeni sistem je post-mitohodrijalna frakcija sa kofaktorom (S9) pripremljena od jetre glodara tretiranih agensima koji indukuju enzime kao što su: Aroclor 1254 ili smješa fenobarbitona i ß-naftoflavona. Post-mitohondrijalne frakcije koriste se u koncentracijama u opsegu od 1% v/v do 10% v/v u konačnoj podlozi. Uslovi metaboličke aktivacije zavise od klase hemikalije koja se ispituje. U nekim slučajevima koristi se više od jedne koncentracije post-mitohondrijalne frakcije.

Pojedina dostignuća, uključujući ćelijske linije dobijene genetskim inženjeringom kod kojih se javlja ekspresija specifičnih aktivirajućih enzima, omogućavaju potencijal za endogenu aktivaciju. Izbor korišćenih ćelijskih linija je naučno opravdan (npr. relevantnost izoenzima citohroma P450 za metabolizam ispitivane supstance).

1.4.1.5. Ispitivana hemikalija

Ispitivane supstance u čvrstom stanju, prije tretmana ćelija, rastvore se ili suspenduju u odgovarajućem rastvaraču ili vehikulumu i, ako je potrebno, razblaže se. Ispitivane supstance u tečnom stanju dodaju se neposredno u ispitivani sistem, odnosno razblažuju se prije tretmana. Koriste se svježi preparati ispitivane supstance, osim ako podaci o stabilnosti pokazuju da se preparati čuvaju.

1.4.2. Uslovi ispitivanja

1.4.2.1. Vehikulum

Vehikulum je takav da hemijski ne reaguje sa ispitivanom supstancom i da bude kompatibilan sa preživljavanjem ćelija i S9 aktivnošću. Ako se koristi vehikulum koji nije opšte poznat, njegova primjena je obrazložena podacima koji potvrđuju njegovu kompatibilnost. Preporučuje se, kad god je moguće, da se u prvom redu koriste vodeni vehikulumi. Ako su ispitivane supstance nestabilne u vodi, organski rastvarači koja se koriste ne sadrže vodu. Voda može da se ukloni dodavanjem molekularnog sita.

1.4.2.2. Koncentracije izlaganja

Kriterijumi koji se razmotraju kod određivanja najviših koncentracija su: citotoksičnost, rastvorljivost u ispitivanom sistemu i promjene pH ili osmolalnost. Citotoksičnost se određuje sa i bez metaboličke aktivacije u glavnom eksperimentu uz korišćenje odgovarajuće indikacije za ćelijski integritet i rast, kao što je stepen združivanja, broj živih ćelija ili mitotski indeksU prethodnom eksperimentu određuje se citotoksičnost i rastvorljivost.

Analizira se najmanje tri koncentracije. Koncentracije koje izazivaju citotoksičnost pokrivaju opseg od maksimalne do male toksičnosti ili bez toksičnosti; što obično znači da se koncentracije međusobno razlikuju najviše za faktor između $\sqrt{2}$ i $\sqrt{10}$. U vrijeme zrelosti najviša koncentracija pokazuje znatno smanjenje stepena združivanja, broja ćelija ili mitotskog indeksa (sve veće od 50%). Mitotski indeks je posredna mjera citotoksičnih/citostatskih efekata i zavisi od vremena nakon tretmana. Mitotski indeks prihvatljiv je za suspenzije kultura kod kojih bi druge mjere toksičnosti mogle da budu komplikovane i nepraktične. Podatak o kinetici ciklusa ćelije kao što je prosječno vrijeme generisanja (u daljem tekstu: AGT) koristi se kao dodatni

podatak. AGT je srednja vrijednost koja ne otkriva uvjek postojanje subpopulacija, i čak i mali porasti prosječnog vremena generacije su povezani sa vrlo bitnim kašnjenjem u vremenu optimalne produkcije aberacija. Za supstance koje su relativno necitotoksične, najviša ispitivana koncentracija treba da bude 5 µL/mL, 5 mg/mL ili 0,01 M, zavisno od toga koja koncentracija je niža. Za relativno nerastvorne supstance koje nisu toksične pri proizvodu koncentracija njenih jona nižem od proizvoda rastvorljivosti, najviša doza koja se koristi je iznad granice rastvorljivosti u konačnoj podlozi na kraju tretmana. U nekim slučajevima (npr. kad se toksičnost supstance pojavljuje samo pri proizvodu koncentracija jona višim od proizvoda rastvorljivosti), ispitivanje se obavlja sa više od jedne doze sa talogom. Procjena rastvorljivosti na početku i na kraju tretmana je od koristi, jer se rastvorljivost mijenja tokom izlaganja u sistemu ispitivanja uslijed prisutnosti ćelija, S9, seruma, itd. Talog se vidi golim okom. Talog ne utiče na ocjenjivanje.

1.4.2.3. Pozitivne i negativne kontrole

Istovremene pozitivne i negativne (vehikulum) kontrole, sa i bez metaboličke aktivacije su uključene u svaki eksperiment. Ako se koristi metabolička aktivacija, pozitivne kontrolne hemikalije su one koje zahtijevaju aktivaciju, kako bi dale mutageni odgovor. Kod pozitivnih kontrola koristi se poznati klastogen i nivoi izloženosti kod kojih se očekuje dobijanje reproduktivnog povećanja u odnosu na kontrolu, što ukazuje na osjetljivost ispitivanog sistema. Koncentracije pozitivne kontrole pokazuju jasne efekte, ali da licu koje obavlja tumačenje rezultata ne bude odmah poznat identitet kodiranih slajdova.

Tabela 1. Primjeri supstanci za pozitivnu kontrolu

Uslovi metaboličke aktivacije	Supstanca	CAS br.	EINEC br.
Odsustvo egzogene metaboličke aktivacije	Metil metansulfonat	66-27-3	200-625-0
	Etil metansulfonat	62-50-0	200-536-7
	Etil nitrozourea	759-73-9	212-072-2
	Mitomicin S	50-07-7	200-008-6
	4-Nitrohinolin-N-oksid	56-57-5	200-281-1
Prisustvo egzogene metaboličke aktivacije	Benzo[a]piren	50-32-8	200-028-5
	Ciklofosfamid Ciklofosfamid monohidrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

Za pozitivnu kontrolu koriste se i druge supstance. Kada je moguće, razmotriti upotrebu pozitivne kontrole koja je srodne klase ispitivanoj hemikaliji. Negativne kontrole koje se sastoje samo od vehikuluma u podlozi za tretiranje i sa kojima se postupa na isti način kao i sa tretiranim kulturama, su uključene za svako vrijeme sakupljanja. Koriste se i netretirane kontrole, osim ako postoje podaci kontrole iz ranijih studija koji pokazuju da odabrani rastvarač ne izaziva nikakve štetne niti mutagene efekte.

1.4.3. Postupak

1.4.3.1. Tretman ispitivanom supstancom

Ćelije se tokom proliferacije tretiraju ispitivanom supstancom u prisustvu ili odsustvu sistema metaboličke aktivacije. Obrada limfocita mora da počne oko 48 sati nakon stimulacije mitoze.

1.4.3.2. Kulture

Za svaku koncentraciju obično se koriste kulture u duplikatu, a obavezne su za negativne kontrolne kulture odnosno kontrolne kulture vehikuluma. Kada se na osnovu postojećih pokazuju minimalne promjene između kultura u duplikatu prihvatljivo je korišćenje jedne kulture za svaku koncentraciju. Gasovite ili isparljive supstance se ispituju odgovarajućim metodama, npr. korišćenjem hermetički zatvorenih posuda za kultivisanje.

1.4.3.3. Vrijeme sakupljanja kulture

U prvom eksperimentu ćelije se izlažu ispitivanoj supstanci 3 do 6 sati sa i bez metaboličke aktivacije, a uzorci se uzimaju nakon približno 1,5 dužine normalnog ćelijskog ciklusa nakon početka tretmana. Ako ovaj protokol da negativne rezultate i sa i bez aktivacije, obavlja se dodatni eksperiment bez aktivacije, sa neprekidnim tretmanom do uzorkovanja nakon približno 1,5 dužine normalnog ćelijskog ciklusa. Određene hemikalije se lakše otkrivaju kod vremena tretmana/uzorkovanja koje je duže od 1,5 dužine ciklusa. Negativni rezultati sa metaboličkom aktivacijom potvrđuju se u zavisnosti od slučaja. U slučajevima kada se potvrda negativnih rezultata ne smatra potrebnom, daje se obrazloženje.

1.4.3.4. Priprema hromozoma

Ćelijske kulture tretiraju se Colcemid®-om ili kolhicinom obično jedan do tri sata prije sakupljanja. Svaka ćelijska kultura sakuplja se i obrađuje posebno za pripremu hromozoma. Priprema hromozoma obuhvata: tretiranje ćelija hipotoničnim rastvorom, fiksaciju i bojenje.

1.4.3.5. Analiza

Svi slajdovi, uključujući one pozitivnih i negativnih kontrola, se nezavisno kodiraju prije mikroskopske analize. Postupci fiksacije dovode do prekida proporcije metafaznih ćelija sa gubitkom hromozoma, pa procjenjivane ćelije sadrže broj centromera koji je jednak modalnom broju ± 2 za sve vrste ćelija. Najmanje 200 dobro raspoređenih metafaza, podjednako podijeljenih između duplikata, se uočava po koncentraciji i kontroli. Taj broj je i manji ako se uoči veliki broj aberacija. Iako je svrha ispitivanja otkrivanje hromozomskih aberacija, važno je zabilježiti i poliploidiju i endoreduplikaciju, ukoliko se uoče.

2. Podaci

2.1. Obrada rezultata

Eksperimentalna jedinica je ćelija. Zbog ovoga se procjenjuje procenat ćelija sa strukturnim hromozomskim aberacijama. Strukturno različite vrste hromozomskih aberacija se upisuju sa svojim brojevima i učestalostima za eksperimentalne i kontrolne kulture. Oštećenja se upisuju odvojeno i navode u izvještaju, ali generalno nisu uključena u ukupnu učestalost aberacija. Istovremene mjere citotoksičnosti za sve tretirane i negativne kontrolne kulture u glavnim ispitivanjima aberacija, takođe se zabilježe. Navode se podaci o svakoj pojedinačnoj kulturi. Svi

podaci se navode sažeto u tabeli. Ne postoje zahtjevi za potvrdu jasnog pozitivnog odgovora. Dvosmisleni rezultati se razjašnjavaju daljim ispitivanjem, ako je moguće modifikacijama eksperimentalnih uslova. Potreba za potvrĐivanjem negativnih rezultata razmotrena je u tački

1.4.3.3. ove metode. Za izvoĐenje daljih eksperimenata razmatra se i modifikacija parametara ispitivanja za proširenje opsega procenjenih uslova. Parametri ispitivanja se modifikuju i obuhvataju opseg koncentracije i uslove metaboličke aktivacije.

2.2. Procjena i tumačenje rezultata

Postoji nekoliko kriterijuma za određivanje pozitivnog rezultata, kao što je povećanje zavisno od koncentracije ili reproducibilno povećanje broja ćelija sa hromozomskim aberacijama. Prvo se razmatra biološka relevantnost rezultata. Statističke metode se koriste kao pomoć u procjeni rezultata ispitivanja. Statistički značaj nije jedini faktor koji određuje pozitivni odgovor.

Povećanje broja poliploidnih ćelija ukazuje na to da ispitivana supstanca ima potencijal da inhibira procese mitoze i izazove numeričke hromozomske aberacije. Povećanje broja ćelija sa endoreduplikovanim hromozomima ukazuje na to da ispitivana supstanca ima potencijal da inhibira progresiju ćelijskog ciklusa. Ispitivana supstanca za koju rezultati ispitivanja ne zadovoljavaju gore navedene kriterijume smatra se nemutagenom u ovom sistemu. Većina eksperimenata daje jasne pozitivne ili negativne rezultate, u rijetkim slučajevima dobijeni podaci ne omogućavaju donošenje konačne procjene aktivnosti ispitivane supstance. Rezultati ostaju dvosmisleni ili nejasni bez obzira na to koliko puta je eksperiment ponovljen. Pozitivni rezultati iz in vitro ispitivanja aberacije hromozoma ukazuju da ispitivana supstanca izaziva strukturne aberacije hromozoma u kulturi somatskih ćelija sisara. Negativni rezultati ukazuju da, pod ispitivanim uslovima, ispitivana supstanca ne izaziva aberaciju hromozoma u kulturi somatskih ćelija sisara.

3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o: 1) Vehikulumu:

- obrazloženje za izbor vehikuluma; i
- rastvorljivost i stabilnost ispitivane supstance u vehikulumu, ako su poznati.

2) Ćelijama:

- vrsta i porijeklo ćelija;
- kariotipne karakteristike i podesnost korišćene vrste ćelija;
- odsustvo mikoplazme, ako je primjenjivo;
- podatak o dužini ćelijskog ciklusa;
- pol davaoca krvi, puna krv ili korišćeni odvojeni limfociti, mitogen;
- broj prolaza, ako je primjenjivo;
- metode za održavanje kulture ćelije, ako je primjenjivo;
- modalni broj hromozoma.

3) Uslovima ispitivanja:

- identitet supstance koja je korišćena za zaustavljanje metafaze, njena koncentracija i trajanje izloženosti ćelije;
- argumentacija za izbor koncentracija i broj kultura, uključujući npr. podatke o citotoksičnosti, ograničenju rastvorljivosti, ako su dostupni;

- sastav podloge, koncentracija CO_2, ako je primjenjivo;
- koncentracija ispitivane supstance;
- zapremina vehikuluma i dodate ispitivane supstance;
- temperatura inkubacije;
- vrijeme inkubacije;
- trajanje tretmana;
- gustina ćelija kod zasijavanja, ako je primjenjivo;
- vrsta i sastav sistema metaboličke aktivacije, uključujući kriterijume prihvatljivosti;
- pozitivne i negativne kontrole;
- metode pripreme slajdova;
- kriterijumi za procjenu aberacije;
- broj analiziranih metafaza;

- metode za mjerenje toksičnosti;
- kriterijumi za smatranje studija pozitivnim, negativnim ili dvosmislenim.

4) Rezultatima:

- znaci toksičnosti, tj. stepen konfluencije, podaci o ćelijskom ciklusu, broj izbrojanih ćelija, mitotski indeks;
- znaci taloženja;
- podaci o pH i osmolalnosti podloge za tretiranje, ako je određeno;
- definicija za aberacije, uključujući oštećenja;
- broj ćelija sa hromozomskim aberacijama i vrsta aberacija hromozoma, za svaku tretiranu i kontrolnu kulturu posebno;
- promjene u ploidiji, ako se vide;
- odnos doza-odgovor, kada je moguće;
- eventualne statističke analize;
- podaci o istovrijemenoj negativnoj (vehikulum) i pozitivnoj kontroli;
- podaci iz literature o negativnoj (vehikulum) i pozitivnoj kontroli sa opsezima, srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama.

5) Obrazloženju rezultata. 6) Zaključcima.

B.11. MUTAGENOST - IN VIVO ISPITIVANJE HROMOZOMSKIH ABERACIJA NA KOSTNOJ SRŽI SISARA

1. Metoda ispitivanja

Metoda ispitivanja: mutagenost - in vivo ispitivanje hromozomskih aberacija na kostnoj srži sisara zasniva se na metodi OECD: TG 475, Ispitivanje hromozomskih aberacija u kostnoj srži sisara (1997).

1.1. Uvod

Ispitivanje hromozomskih aberacija in vivo kod sisara koristi se za otkrivanje strukturnih hromozomskih aberacija koje je ispitivana supstanca izazvala u ćelijama koštane srži životinja, obično glodara. Strukturne hromozomske aberacije mogu biti dvojake: hromozomske i hromatidne. Povećanje poliploidnosti može da ukaže na to da hemikalija ima potencijal da izazove numeričke aberacije. Većina hemijskih mutagena izaziva aberacije hromatidnog tipa, ali dolazi i do aberacija hromozomskog tipa. Hromozomske mutacije i sa njima povezane pojave

uzrok su mnogih genetskih bolesti kod ljudi i postoje značajni dokazi da su hromozomske mutacije i sa njima povezane pojave, koje izazivaju promjene onkogena i tumor-supresorskih gena, povezane sa rakom kod ljudi i u eksperimentalnim sistemima. U ovoj metodi ispitivanja koriste se glodari. Koštana srž predstavlja ciljno tkivo ovog ispitivanja, s obzirom da je riječ o visoko prokrvljenom tkivu koje sadrži populaciju ćelija koje brzo prolaze kroz cikluse, a koje je moguće lako izolovati i obraditi. Druge životinjske vrste i ciljna tkiva nisu predmet ove metode ispitivanja.

Navedeno ispitivanje hromozomskih aberacija relevantno je za procjenu opasnosti od mutagenog dejstva, jer omogućava da se uzme u obzir metabolizam in vivo, farmakokinetičke i procese reparacije DNK, iako se isti mogu razlikovati kod različitih vrsta i tkiva. In vivo ispitivanje korisno je i za dalje istraživanje mutagenih efekata otkrivenih prilikom in vitro ispitivanja. Ovaj oblik ispitivanja ne odgovara ukoliko se pojave dokazi da ispitivana supstanca ili reaktivni metabolit neće dospijeti do ciljnog tkiva.

1.3. Princip metode

Životinje se odgovarajućim putem izlažu ispitivanoj supstanci i žrtvuju u određeno vrijeme nakon tretiranja. Prije žrtvovanja, životinje se tretiraju agensom za zaustavljanje metafaze (npr. kolhicinom ili Colcemid®-om). Nakon toga, pripreme se preparati hromozoma ćelija koštane srži i analiziraju se ćelije u metafazi sa ciljem utvrĐivanja hromozomskih aberacija.

1.4. Opis metode

1.4.1. Pripreme

1.4.1.1. Izbor životinjske vrste

Koriste se pacovi, miševi i kineski hrčci i druge odgovarajuće vrste sisara. Koriste se mlade, zdrave, odrasle životinje sojeva koji se uobičajeno upotrebljavaju. Prilikom započinjanja istraživanja odstepene u tjelesnoj masi životinja je minimalno i da ne prelazi ± 20% prosječne tjelesne mase za svaki pol.

1.4.1.2. Uslovi smještaja i ishrane

Primjenjuju se opšti uslovi koji su navedeni u Opštem uvodu, iako se nastoji da se vlažnost održi na nivou od 50% do 60%.

1.4.1.3. Priprema životinja

Zdrave odrasle životinje nasumično se grupišu u kontrolnu i tretirane grupe. Kavezi su takvi da mogući efekti na ispitivanje budu minimalni. Životinje se pojedinačno označavaju. Životinje se aklimatizuju na laboratorijaske uslove najmanje pet dana prije početka ispitivanja.

1.4.1.4. Priprema doza

Prije tretiranja životinja ispitivanom supstancom čvrste ispitivane supstance se rastvoraju ili suspenduju u odgovarajućim vehikulumima i, ukoliko je potrebno, razblaže se. Tečne ispitivane supstance direktno se primjenjuju ili se razblaže prije primjene. Svježe preparate ispitivane supstance odmah upotrijebiti, osim ukoliko podaci o stabilnosti ne pokazuju da je čuvanje prihvatljivo.

1.4.2. Uslovi ispitivanja

1.4.2.1. Vehikulum

Vehikulum ne izaziva toksične efekte pri doznim nivoima koji se primjenjuju i ne postoji sumnja da će hemijski da reaguje sa ispitivanom supstancom. Ukoliko se primjenjuju manje poznati vehikulumi, njihovo uključivanje u ispitivanje obrazložiti podacima koji ukazuju na njihovu kompatibilnost. Preporučuje se primjena vodenog rastvora.

1.4.2.2. Kontrole

Istovremene pozitivne i negativne (vehikulum) kontrole su uključene u svako ispitivanje i za svaki pol. Osim primjene ispitivane supstance, sa životinjama u kontrolnim grupama postupati na isti način kao i sa životinjama u tretiranim grupama.

Pozitivne kontrole proizvode strukturne aberacije in vivo pri nivoima izloženosti za koje se očekuje da će dati povećanje u odnosu na pozadinu koja može da se detektuje. Pozitivne kontrolne doze biraju se tako da efekti budu jasni, ali da licu koje očitava rezultate odmah ne otkriju identitet šifriranih mikroskopskih preparata (slajdova). Supstanca koja je pozitivna kontrola se primjenjuje putem koji je različit od puta primjene ispitivane supstance, i da se uzorkuje samo jednom. Uzeti u obzir primjenu pozitivnih kontrola koje pripadaju istoj hemijskoj klasi kao i ispitivana hemikalija. Primjeri supstanci koje se koriste kao pozitivne kontrole.

Tabela 1. Supstance koje se koriste kao pozitivne kontrole

Supstanca	CAS br.	EINECS br.
etil metansulfonat	62-50-0	200-536-7
etil nitrozourea	759-73-9	212-072-2
mitomicin S	50-07-7	200-008-6
ciklofosfamid ciklofosfamid monohidrat	50-18-0 6055-19-2	 200-015-4
trietilenmelamin	51-18-3	200-083-5

Negativne kontrole, tretirane samo vehikulumom, sa kojima se postupa na isti način kao sa grupama obuhvaćenim tretmanom, obuhvaćene su svakim uzorkovanjem, osim ukoliko su dostupni podaci o varijabilnosti u okviru vrste i u frekvenciji ćelija sa hromozomskim aberacijama. Ukoliko se na negativne kontrole primjenjuje jedno uzorkovanje, najprimjerenije je vrijeme prvog uzorkovanja. Istovremeno se koriste i netretirane kontrole (kontrolni uzroci), osim ukoliko postoje podaci o kontrolama iz ranijih studija ili objavljeni kontrolni podaci koji dokazuju da odabran vehikulum ne izaziva štetne ili mutagene efekte.

1.5. Postupak

1.5.1. Broj i pol životinja

Svaka tretirana i kontrolna grupa obuhvata najmanje pet životinja istog pola na kojima je moguće obaviti analizu. Ukoliko postoje podaci istraživanja obavljenog na istoj vrsti i istim putem izlaganja koji dokazuju da ne postoje značajnije razlike u toksičnosti među polovima, dovoljno je obaviti ispitivanje kod samo jednog pola. U slučajevima u kojima je izlaganje ljudi hemikalijama specifično za određeni pol, kao na primjer kod nekih farmaceutskih agensa, ispitivanje sprovoditi na životinjama odgovarajućeg pola.

1.5.2. Plan tretmana

Primjenjuju se ispitivane supstance u okviru jednog tretmana. Ispitivane supstance je moguće davati u obliku podjeljene doze, tj. dva tretmana tokom istog dana u razmaku od najviše nekoliko sati, kako bi se olakšalo davanje velike zapremine ispitivane supstance. Ostali režimi tretiranja su naučno opravdani. Uzorci se uzimaju u dva navrata nakon tretmana tokom jednog dana. Kod glodara prvo vrijeme uzorkovanja je 1,5 dužina redovnog ćelijskog ciklusa (koji iznosi 12 do 18 sati) nakon tretmana. S obzirom da vrijeme koje je potrebno za unos i metabolizam ispitivane supstance, kao i za njen efekat na dinamiku ćelijskog ciklusa, utiče na optimalno vrijeme potrebno za otkrivanje hromozomske aberacije, preporučuje se i kasnije uzimanje uzorka: 24 sata nakon prvog uzorkovanja. Ukoliko se primjenjuju režimi tretiranja ispitivanom supstancom duži od jednog dana, nakon posljednjeg tretmana obaviti jedno uzorkovanje od oko 1,5 dužine normalnog ćelijskog ciklusa.

Prije žrtvovanja životinjama se intraperitonealno ubrizgava odgovarajuća doza agensa za zaustavljanje metafaze (npr. Colcemid® ili kolhicin). Životinjama se nakon toga uzimaju uzorci u odgovarajućim intervalima. Za miševe navedeni interval iznosi otprilike 3-5 sati, a za kineske hrčke interval je približno 4 do 5 sati. Ćelije se izoluju iz koštane srži i analiziraju radi otkrivanja hromozomskih aberacija.

1.5.3. Dozni nivoi

Ukoliko se ispitivanje obavlja sa ciljem utvrĐivanja opsega doza zbog toga što nema dostupnih podataka, navedeno ispitivanje obaviti u istoj laboratorijai, uz korišćenje iste vrste, soja, pola i režima tretiranja kao i u glavnom ispitivanju. Ukoliko postoji toksičnost, za prvo uzorkovanje koriste se tri dozna nivoa. Navedene doze obuhvataju opseg od maksimalne do niske toksičnosti ili nivo bez toksičnosti. Prilikom narednog uzorkovanja koristiti samo najvišu dozu. Najviša doza se definiše kao doza usled koje nastaju takvi znaci toksičnosti da bi viša doza prouzrokovala uginjavanje životinja. Supstance specifične biološke aktivnosti u malim netoksičnim dozama (poput hormona i mitogena) su izuzetak za primjenu kriterijuma za izbor doza i tada doze procjeniti u zavisnosti od slučaja. Najviša doza se definiše i kao doza koja dovodi do nekih indikacija toksičnosti u kostnoj srži (npr. smanjenje mitotskog indeksa veće od 50%).

1.5.4. Ispitivanje granične doze

Ukoliko u ispitivanju sa jednom dozom od najmanje 2.000 mg/kg TM u jednokratnom tretmanu ili u dva tretmana tokom istog dana ne nastanu nikakvi primjetni toksični efekti i ukoliko se na osnovu podataka o strukturno srodnim supstancama ne očekuje genotoksičnost, ne primjenjuje se kompletno ispitivanje primjenom tri dozna nivoa. Za ispitivanja u trajanju do 14 dana granična doza iznosi 2.000 mg/kg TM/dan, a za tretmane koji traju duže od 14 dana 1.000 mg/kg TM/dan. Očekivana izloženost ljudi ukazuje na potrebu za primjenom više doze u ispitivanju granične doze.

1.5.5. Primjena doza

Ispitivana supstanca primjenjuje se intubacijom i to korišćenjem želudačne sonde ili odgovarajuće intubacione kanile ili intraperitonealnom injekcijom. Primjenjuju se i drugi putevi izlaganja uz navoĐenje obrazloženja za tu primjenu. Maksimalna zapremina tečnosti koju je moguće dati putem sonde ili injekcijom u jednom navratu zavisi od veličine eksperimentalne životinje. Zapremina ne prelazi 2 mL/100 g TM. Upotrebu većih zapremina obrazložiti. Izuzev u slučaju iritativnih i korozivnih supstanci kod kojih će se normalno ipoljiti pogoršani efekti pri višim koncentracijama, odstepena u zapremini su minimalna podešavanjem koncentracije, kako bi se obezbijedila konstantna zapremina pri svim nivoima doza.

1.5.6. Hromozomski preparat

Odmah nakon žrtvovanja životinje, uzima se koštana srž koja se izlaže hipotoničnom rastvoru i fiksira. Ćelije se nanesu na mikroskopske pločice i oboje.

1.5.7. Analiza

Kao mjera citotoksičnosti određuje se mitotski indeks u najmanje 1.000 ćelija po životinji za sve tretirane životinje (uključujući pozitivne kontrole) i netretirane životinje negativne kontrolne grupe.

Analizi podvrgnuti najmanje 100 ćelija svake životinje. Navedeni broj se smanjuje ukoliko se uoči veliki broj aberacija. Sve preparate (slajdove), uključujući one pozitivne i negativne kontrole, šifrovati prije mikroskopske analize. S obzirom da postupci izrade preparata često imaju za poslijedicu promjenu proporcije metafaza uz gubitak hromozoma, ćelije koje se broje sadrže broj centromera jednak broju 2n ± 2.

2. Podaci

2.1. Obrada rezultata

Podaci koji se odnose na pojedine životinje navode se tabelarno. Životinja predstavlja eksperimentalnu jedinicu. Za svaku životinju odrediti broj ćelija koje se procjenjuju, broj aberacija po ćeliji i procenat ćelija sa strukturnim hromozomskim aberacijama. Navode se različite vrste strukturnih hromozomskih aberacija zajedno sa svojim brojevima i frekvencijama, a u odnosu na tretirane i kontrolne grupe. Hromozomski prekidi navode se odvojeno, ali se generalno ne uključuju u ukupnu učestalost aberacija. Ukoliko ne postoje dokazi o razlikama meĐu polovima, podatke dobijene ispitivanjem oba pola sjediniti radi statističke analize.

2.2. Procjena i tumačenje rezultata

Postoji nekoliko kriterijuma za utvrĐivanje pozitivnog rezultata, kao što je dozno zavisno povećanje relativnog broja ćelija sa hromozomskim aberacijama ili jasno povećanje broja ćelija sa aberacijama u grupi koja je primila jednu dozu, prilikom jedinog vremena uzorkovanja. Prvenstveno se uzima u obzir biološki značaj rezultata. Statističke metode se primjenjuju kao pomoćno sredstvo prilikom vrednovanja rezultata ispitivanja[6]. Statistički značaj nije jedini faktor za utvrĐivanje pozitivne reakcije. Dvosmislene rezultate pojasniti daljim ispitivanjem, najbolje modifikovanjem eksperimentalnih uslova. Povećanje poliploidnosti ukazuje na to da ispitivana supstanca ima potencijal da izazove numeričke hromozomske aberacije. Povećanje endoreduplikacije (endomitoze) ukazuje na to da ispitivana supstanca ima potencijal da inhibira progresiju ćelijskog ciklusa[7, 8]. Ispitivana supstanca za koju dobijeni rezultati ne zadovoljavaju gore navedene kriterijume, je nemutagena u ovom ispitivanju. Iako većina eksperimenata daje jasno pozitivne ili negativne rezultate, u rijetkim slučajevima utvrĐeni podaci ne omogućavaju donošenje konačne odluke o djelovanju ispitivane supstance. Rezultati ostaju dvosmisleni ili pod znakom pitanja, bez obzira na broj obavljenih eksperimenata.

Pozitivni rezultati ispitivanja hromozomskih aberacija in vivo ukazuju na to da supstanca uzrokuje hromozomske aberacije u kostnoj srži ispitivane životinjske vrste. Negativni rezultati ukazuju na to da, pod navedenim eksperimentalnim uslovima, ispitivana supstanca ne izaziva aberacije u kostnoj srži ispitivane vrste.

Razmotriti vjerovatnoću da ispitivana supstanca ili njeni metaboliti dospijeju u krvotok ili, konkretno, do ciljnog tkiva (npr. sistemska toksičnost).

3.Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o: 1) Vehikulumu:

- opravdanost izbora vehikuluma;
- rastvorljivost i stabilnost ispitivane supstance u vehikulumu, ukoliko su poznati. 2) Eksperimentalnim životinjama:
- vrsta/soj;
- broj, starost i pol životinja;
- izvor/porijeklo, smještaj, ishrana, itd.;
- pojedinačna tjelesna masa životinja na početku ispitivanja, uključujući raspon tjelesne mase, srednju vrijednost i standardnu devijaciju za svaku grupu.

3) Uslovima ispitivanja:

- pozitivna i negativna (vehikulum) kontrola;
- rezultati ispitivanja za utvrĐivanje raspona doza, ukoliko je obavljeno;
- obrazloženje za izbor doznih nivoa;
- detalji pripreme ispitivane supstance;
- detalji primjene ispitivane supstance;
- obrazloženje puta primjene;
- metode za potvrdu činjenice da je ispitivana supstanca dospjela u sistemski krvotok ili do ciljnog tkiva, ukoliko je primjenjivo;
- način preračunavanja koncentracije ispitivane supstance u hrani/vodi za piće (ppm) u dozu (mg/kg TM/dan), ukoliko je primjenjivo;
- detalji o kvalitetu hrane i vode;

- detaljan opis rasporeda tretmana i uzorkovanja;
- metode za mjerenje toksičnosti;
- identitet supstance koja zaustavlja metafazu, njena koncentracija i trajanje tretmana;
- metode pripremanja mikroskopskih preparata;
- kriterijumi za prebrojavanje aberacija;
- broj analiziranih ćelija po životinji;
- kriterijumi za proglašavanje ispitivanja pozitivnim, negativnim ili dvosmislenim. 4) Rezultatima:
- znaci toksičnosti;
- mitotski indeks;
- vrsta i broj aberacija, pojedinačno navedenih za svaku životinju;
- ukupan broj aberacija po grupi, srednja vrijednost i standardna devijacija;
- broj ćelija sa aberacijama po grupi, srednja vrijednost i standardna devijacija;
- promjene u ploidiji, ukoliko su uočene;
- odnos doza-odgovor, gde je moguće;
- statističke analize, ukoliko postoje;
- podaci istovremene negativne kontrole;
- negativni kontrolni podaci iz literature sa opsezima, srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama;
- istovrijemeni pozitivni kontrolni podaci.

5) Obrazloženju rezultata. 6) Zaključcima.

B.12. MUTAGENOST - MIKRONUKLEUS TEST in vivo NA ERITROCITIMA SISARA

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

Mikronukleus test in vivo kod sisara koristi se za otkrivanje oštećenja izazvanih ispitivanom supstancom na hromozomima ili mitotskom sistemu eritroblasta, na osnovu analize eritrocita iz koštane srži i/ili ćelija periferne krvi životinja, obično glodara. Svrha mikronukleus testa je identifikacija supstanci koje izazivaju citogenetska oštećenja koja za poslijedicu imaju formiranje mikronukleusa koji sadrži zaostale fragmente hromozoma ili čitave hromozome. Kada se eritroblast koštane srži razvije u polihromatski eritrocit, glavni nukleus biva istisnut; svaki nastali mikronukleus može da zaostane u citoplazmi koja inače nema jezgro. Vidljivost mikronukleusa u ovim ćelijama olakšana je s obzirom da im nedostaje glavno jezgro. Povećanje učestalosti polihromatskih eritrocita sa mikronukleusima kod tretiranih životinja pokazatelj je izazvanih hromozomskih oštećenja.

Za navedeno ispitivanje obično se koristi koštana srž glodara, jer se proizvodnja polihromatskih eritrocita odvija u tom tkivu. Mjera mikronukleusnih nezrelih (polihromatskih) eritrocita u perifernoj krvi jednako je prihvatljiva kod bilo koje vrste kod koje je dokazana nesposobnost slezine da ukloni mikronukleusne eritrocite ili koja je pokazala odgovarajuću osjetljivost na otkrivanje agensa koji izazivaju strukturne ili numeričke hromozomske aberacije. Mikronukleuse razlikujemo na osnovu većeg broja kriterijuma. Navedeni kriterijumi obuhvataju identifikaciju prisustva ili odsustva kinetohore ili centrodnose DNK u mikronukleusima. Učestalost mikronukleusnih nezrelih (polihromatskih) eritrocita predstavlja ciljni pokazatelj ispitivanja. U

slučajevima kada se životinje neprekidno tretiraju tokom četiri nedelje ili duže, kao krajnja tačka ispitivanja koristi se broj zrelih (normohromatskih) eritrocita u perifernoj krvi koji sadrže mikronukleuse u datom broju zrelih eritrocita.

In vivo mikronukleus test kod sisara važan je za procjenu mutagenosti jer uzima u obzir faktore metabolizma in vivo, farmakokinetku i procese reparacije DNK, iako isti mogu da se razlikuju između različitih vrsta i tkiva, kao i između različitih genetskih pokazatelja ispitivanja. in vivo ispitivanje korisno je i za dalje istraživanje mutagenih efekata otkrivenih u in vitro sistemu. Ovo ispitivanje ne odgovara ukoliko se pojave dokazi da ispitivana supstanca ili reaktivni metabolit neće stići do ciljnog tkiva.

1.2. Definicije

Centromera (Kinetohora) je područje(a) hromozoma sa kojima su tokom ćelijske deobe povezane niti diobnog vretena, a čime je omogućeno uredno kretanje kćerki hromozoma prema polovima kćerki ćelija.

Mikronukleusi su zasebni mali nukleusi, odvojeni od glavnog jedra ćelije, nastali tokom tijelofaze mitoze (mejoze) zaostajanjem fragmenata hromozoma ili čitavih hromozoma.

Normohromatski eritrociti su zreli eritrociti kojima nedostaju ribozomi. Mogu se razlikovati od nezrelih polihromatskih eritrocita na osnovu crta karakterističnih za prisustvo ribozoma. Polihromatski eritrociti su nezreli eritrociti u prelaznoj fazi razvoja koji još uvjek sadrže ribozome. Mogu se razlikovati od zrelih, normohromatskih eritrocita na osnovu crta karakterističnih za prisustvo ribozoma.

1.3. Princip metode

Životinje se odgovarajućim putem izlažu ispitivanoj supstanci. Ukoliko se koristi koštana srž, životinje se žrtvuju u odgovarajuće vrijeme nakon tretmana, nakon čega se uzima koštana srž i izrađuju i boje preparati. Prilikom korišćenja periferne krvi, krv se uzima u odgovarajuće vrijeme nakon tretmana i izrađuju se preparati razmaza krvi koji se boje. Kod istraživanja sa perifernom krvlju vrijeme proteklo od posljednjeg izlaganja i ubiranja ćelija je što kraće. Preparati se analiziraju kako bi se utvrdilo postojanje mikronukleusa.

1.4. Opis metode

1.4.1. Pripreme

1.4.1.1. Izbor životinjske vrste

U slučaju korišćenja koštane srži preporučuje se primjena miševa i pacova, iako se mogu koristiti i druge odgovarajuće vrste sisara. U slučaju korišćenja periferne krvi preporučuju se miševi. Mogu se koristiti i druge odgovarajuće vrste sisara pod uslovom da slezina te vrste ne uklanja eritrocite sa mikronukleusima ili da je vrsta pokazala odgovarajuću osjetljivost za otkrivanje agensa koji izazivaju strukturne ili numeričke hromozomske aberacije. Koriste se mlade, zdrave životinje laboratorijaskih sojeva koji se generalno upotrebljavaju. Prilikom

započinjanja istraživanja odstepene u tjelesnoj masi životinja je minimalno i ne veće od ± 20% prosječne tjelesne mase svakog pola.

1.4.1.2. Uslovi čuvanja i ishrane

Primjenjuju se opšti uslovi dati u Opštem uvodu, iako se nastoji da se vlažnost održava na nivou od 50% do 60%.

1.4.1.3. Priprema životinja

Zdrave, odrasle životinje nasumično se grupišu u kontrolnu i tretirane grupe. Životinje se pojedinačno označavaju. Životinje se aklimatizuju na laboratorijaske uslove najmanje pet dana. Kavezi su takvi da se mogući uticaji svedu na minimum.

1.4.1.4. Priprema doza

Prije primjene, čvrste ispitivane supstance se rastvaraju ili suspenduju u odgovarajućim vehikulumima i, ukoliko je potrebno, razblažuju. Tečne ispitivane supstance se direktno primjenjuju ili se prije primjene razblaže. Svježe preparate ispitivane supstance odmah upotrijebiti, osim ukoliko podaci o stabilnosti pokazuju da je čuvanje prihvatljivo.

1.4.2. Uslovi ispitivanja

1.4.2.1. Vehikulum

Vehikulum ne izaziva toksične efekte pri doznim nivoima u kojima se primjenjuje i ne postoji sumnja da će hemijski da reaguje sa ispitivanom supstancom. Ukoliko se primjenjuju manje poznati vehikulumi, njihovo uključivanje u ispitivanje obrazložiti podacima koji ukazuju na njihovu kompatibilnost. Kad god je moguće, preporučuje se primjena vodenog vehikuluma.

1.4.2.2. Kontrole

Istovremene pozitivne i negativne (vehikulum) kontrole su uključene u svako ispitivanje i za svaki pol. Osim tretiranja ispitivanom supstancom, sa životinjama u kontrolnim grupama postupa se na isti način kao i sa životinjama u tretiranim grupama. Pozitivne kontrole izazovaju stvaranje mikronukleusa in vivo pri doznim nivoima za koje se očekuje da će dovesti do uočljivog povećanja u odnosu na negativnu kontrolu. Doze pozitivne kontrole biraju se tako da efekti budu jasni, ali da licu koja očitava rezultate odmah ne otkriju identitet šifriranih mikroskopskih preparata (slajdova). Dozvoljeno je da se pozitivna kontrola primjeni putem koji je različit od puta primjene ispitivane supstance, i uzorak se uzima samo jednom. Može se uzeti u obzir primjena pozitivnih kontrola koje pripadaju istoj hemijskoj klasi kao i ispitivana hemikalija.

Tabela 1. Primjeri supstanci koje se koriste kao pozitivne kontrole

Supstanca	CAS br.	EINECS br.
Etil metansulfonat	62-50-0	200-536-7
N-etil-N-nitrozourea	759-73-9	212-072-2

Mitomicin C	50-07-7	200-008-6
Ciklofosfamid Ciklofosfamid monohidrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Trietilenmelamin	51-18-3	200-083-5

Negativne kontrole, tretirane samo vehikulumom, sa kojima se postupa na isti način kao sa grupama obuhvaćenim tretmanom, su obuhvaćene svakim uzorkovanjem, osim ukoliko su dostupni podaci kontrole iz ranijih studija o varijabilnosti u okviru vrste i frekvenciji ćelija sa mikronukleusima. Ukoliko se na negativne kontrole primjenjuje jedno uzorkovanje, najprimjerenije je vrijeme prvog uzorkovanja. Istovremeno se koriste i netretirane kontrole (kontrolni uzroci), osim ukoliko postoje kontrolni podaci iz prethodnih ispitivanja ili objavljeni kontrolni podaci koji dokazuju da odabran vehikulum ne izaziva štetne ili mutagene efekte. Kada se koristi periferna krv može biti prihvatljiv i uzorak uzet prije tretmana u svojstvu negativne kontrole (negativnog kontrolnog uzorka), ali samo kod kratkotrajnih istraživanja periferne krvi (npr. 1 do 3 tretmana), a kada se dobijeni podaci nalaze unutar očekivanog opsega s obzirom na raniju kontrolu.

1.5. Postupak

1.5.1. Broj i pol životinja

Svaka tretirana i kontrolna grupa obuhvata najmanje pet životinja istog pola na kojima je moguće obaviti analizu. Ukoliko postoje podaci istraživanja obavljenog na istoj vrsti i istim putem izlaganja koji dokazuju da ne postoje značajnije razlike među polovima u toksičnosti, dovoljno je da se ispitivanje obavi kod samo jednog pola. U slučajevima u kojima izlaganje ljudi hemikalijama je specifično za pol, kao na primjer kod nekih farmaceutskih agenasa, ispitivanje obaviti sa životinjama odgovarajućeg pola.

1.5.2. Plan tretmana Ne postoji standardni plan tretmana (tj. jedan, dva ili više tretmana u intervalima od 24 sata). Uzorci dobijeni iz produženih režima tretmana prihvatljivi su pod uslovom da je dokazan pozitivan efekat ili, kada je u pitanju negativno ispitivanje, pod uslovom da je dokazana toksičnost ili upotrijebljena granična doza i da je tretiranje nastavljeno sve do vremena uzorkovanja. Ispitivane supstance se daju u obliku podijeljenih doza, tj. u obliku dva tretmana tokom istog dana u razmaku od najviše nekoliko sati, kako bi se olakšalo davanje velike zapremine materijala. Ispitivanje se obavlja na dva načina:

a) Životinje se jednom tretiraju ispitivanom supstancom. Uzorci koštane srži uzimaju se najmanje dva puta, počevši najranije 24 sata nakon tretmana, ali najkasnije 48 sati nakon tretmana, uz primjenu odgovarajućih intervala između uzimanja uzoraka. Uzorkovanje prije isteka perioda od 24 sata nakon tretmana se obrazlaže. Uzorci periferne krvi uzimaju se najmanje dva puta, počevši najranije 36 sati nakon tretmana, uz primjenu odgovarajućih intervala nakon uzimanja prvog uzorka, ali ne duže od 72 sata nakon tretmana. Ukoliko se potvrdi pozitivna reakcija prilikom jednog intervala uzorkovanja, nije potrebno dalje uzorkovanje.

b) Ukoliko se primjenjuje dva ili više tretmana dnevno (npr. dva ili više tretmana u intervalima od 24 sata), uzorke uzimati jednom, između 18 sati i 24 sata nakon konačnog tretmana kada je u pitanju koštana srž, i jednom između 36 sati i 48 sati nakon konačnog tretmana u slučaju periferne krvi[12].

1.5.3. Dozni nivoi

Ukoliko se zbog nedostatka dostupnih podataka obavlja istraživanje sa ciljem utvrĐivanja opsega doza, navedeno istraživanje se obavlja u istoj laboratorijai, uz korišćenje iste vrste, soja, pola i režima ispitivanja kao i u glavnom istraživanju[13]. Ukoliko postoji toksičnost, prilikom prvog uzorkovanja koriste se tri dozna nivoa. Navedene doze obuhvataju raspon od maksimalne do niske toksičnosti ili nivo bez toksičnosti. Prilikom drugog uzorkovanja upotrijebiti samo najvišu dozu. Najviša doza toksičnosti definiše se kao doza usled koje nastaju takvi znaci toksičnosti da bi viša doza prouzrokovala uginjavanje životinja. Supstance specifične biološke aktivnosti u malim netoksičnim dozama (poput hormona i mitogena) su izuzetak od kriterijuma za izbor doza i tada se doze procjenjuje u zavisnosti od slučaja. Najviša doza se definiše i kao dozu koja dovodi do nekih indikacija toksičnosti u kostnoj srži (npr. smanjenje udjela nezrelih eritrocita u ukupnom broju eritrocita u koštanoj srži ili perifernoj krvi).

1.5.4. Ispitivanje granične doze

Ukoliko u ispitivanju sa jednom dozom od najmanje 2.000 mg/kg TM u jednokratnom tretmanu ili u obliku dva tretmana tokom istog dana ne nastanu nikakvi primetni toksični efekti i ukoliko se na osnovu podataka o strukturno sličnim supstancama ne očekuje genotoksičnost, ne primjenjuje se kompletno ispitivanje primjenom tri dozna nivoa. Za ispitivanja koja traju do 14 dana granična doza iznosi 2.000 mg/kg TM/dan, a za ispitivanja koja traju duže od 14 dana iznosi 1.000 mg/kg TM/dan. Očekivana izloženost ljudi ukazuje na potrebu za primjenom više doze u ispitivanju granične doze.

1.5.5. Primjena doza

Ispitivana supstanca obično se primjenjuje intubacijom, i to korišćenjem želučane sonde ili odgovarajuće intubacione kanile ili intraperitonealnom injekcijom. Primjenjuju se i ostali putevi izlaganja uz obrazloženje. Maksimalna zapremina tečnosti koja se daje putem sonde ili injekcijom u jednom navratu zavisi od veličine eksperimentalne životinje. Zapremina ne prelazi 2 mL/100 g TM. Upotrebu većih zapremina obrazložiti. Izuzev u slučaju iritanasa i koroziva kod kojih se efekti ipoljavaju pri višim koncentracijama, odstepena u zapremini su minimalna podešavanjem koncentracije, a kako bi se obezbjedila konstantna zapremina pri svim doznim nivoima.

1.5.6. Pripremanje uzoraka koštane srži/krvi

Ćelije koštane srži dobijaju se iz butne ili golenjičnih kostiju odmah nakon žrtvovanja. Ćelije se izoluju iz butne kosti i golenjice, pripremljene i obojene primjenom potvrĐenih metoda ispitivanja. Periferna krv se uzima iz repne vene ili drugog odgovarajućeg krvnog suda. Krvne ćelije se odmah supravitalno oboje ili se izrade preparati u obliku razmaza koji se zatim oboje. Primjenom boje koja je specifična za DNK (npr. akridin oranž 14 ili Hoechst 33258 plus pironin-Y) otklanjaju se neki od nedostataka vezanih za primjenu DNK-nespecifičnih boja. Navedena prednost ne isključuje primjenu uobičajenih boja (npr. Giemsa). Primjenjuju se i dodatni sistemi (npr. celulozne ploče za otklanjanje nukleusnih ćelija[16]), pod uslovom da je dokazano kako navedeni sistemi na odgovarajući način funkcionišu prilikom izrade mikronukleusnih preparata u laboratorijai.

1.5.7. Analiza

Udio nezrelih eritrocita u ukupnom broju eritrocita (nezreli plus zreli) utvrđuje se za svaku životinju prebrojavanjem ukupnog broja od najmanje 200 eritrocita za kostnu srž i 1.000 eritrocita za perifernu krv. Sve preparate, uključujući one pozitivne i negativne kontrole, šifrirati prije mikroskopske analize. Za svaku životinju najmanje 2.000 nezrelih eritrocita podvrgava se analizi radi utvrĐivanja pojave mikronukleusnih nezrelih eritrocita. Dodatni podaci dobijaju se prebrojavanjem zrelih eritrocita sa mikronukleusima. Prilikom analiziranja mikroskopskih preparata, udio nezrelih eritrocita prema ukupnom broju eritrocita nije manji od 20% kontrolne vrijednosti. Kada se životinje neprekidno tretiraju tokom četiri nedelje ili duže, na pojavu mikronukleusa ispitati najmanje 2.000 zrelih eritrocita po životinji. Sistemi za automatizovanu analizu (analiza krvne slike i protočna citometrija suspenzije ćelija) predstavljaju prihvatljive alternative manuelnom ocjenjivanju ukoliko su opravdani i validovani.

2. Podaci

2.1. Obrada rezultata

Podaci koji se odnose na pojedinačne životinje navode se tabelarno. Životinja predstavlja eksperimentalnu jedinicu. Za svaku analiziranu životinju posebno se navodi: broj nezrelih vrednovanih eritrocita, broj mikronukleusnih nezrelih eritrocita i ukupan broj nezrelih eritrocita.
Kada se životinje neprekidno tretiraju tokom četiri nedelje ili duže, navesti i podatke o zrelim eritrocitima ukoliko se isti prikupljaju. Za svaku životinju se navodi odnos između broja nezrelih i ukupnog broja eritrocita i, ukoliko je potrebno, procenat mikronukleusnih eritrocita. Ukoliko ne postoje dokazi o razlikama meĐu polovima, podaci dobijeni ispitivanjem oba pola se sjedinjuju radi statističke analize.

2.2. Procjena i tumačenje rezultata

Postoji nekoliko kriterijuma za utvrĐivanje pozitivnog rezultata, kao što je dozno zavisno povećanje broja mikronukleusnih ćelija ili jasno povećanje broja mikronukleusnih ćelija u grupi koja je primala jednu dozu, prilikom jednog intervala uzorkovanja. Prvenstveno se uzima u obzir biološka relevantnost rezultata. Primjeniti statističke metode kao pomoćno sredstvo prilikom procjene rezultata ispitivanja[18,19]. Statistički značaj nije jedini faktor za utvrĐivanje pozitivne reakcije. Dvosmisleni rezultati su pojašnjeni daljim ispitivanjem, najbolje modifikovanjem eksperimentalnih uslova. Ispitivana supstanca za koju rezultati ne zadovoljavaju gore navedene kriterijume, u ovom ispitivanju smatra se nemutagenom. Iako većina eksperimenata daje jasno pozitivne ili negativne rezultate, u rijetkim slučajevima utvrĐeni podaci ne omogućavaju donošenje konačne odluke o djelovanju ispitivane supstance. Pozitivni rezultati mikronukleus testa ukazuju na to da supstanca izaziva nastajanje mikronukleusa koji su poslijedica hromozomskih oštećenja ili oštećenja mitotskog sistema u eritroblastima eksperimentalne vrste životinja. Negativni rezultati ukazuju na to da, pod eksperimentalnim uslovima, ispitivana supstanca ne izaziva nastanak mikronukleusa u nezrelim eritrocitima eksperimentalne vrste životinja. Razmotriti vjerovatnoću da ispitivana supstanca ili njeni metaboliti dospiju u krvotok ili, konkretno, do ciljnog tkiva (npr. sistemska toksičnost).

3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o: 1) Vehikulumu:

- opravdanost izbora vehikuluma;
- rastvorljivost i stabilnost ispitivane supstance u vehikulumu, ukoliko su poznati. 2) Eksperimentalnim životinjama:
- vrsta/soj;
- broj, starost i pol životinja;
- izvor, smještaj, ishrana, itd.;
- pojedinačna tjelesna masa životinja na početku ispitivanja, uključujući raspon tjelesne mase, srednju vrijednost i standardnu devijaciju za svaku grupu.

3) Uslovima ispitivanja:
- pozitivna i negativna (vehikulum) kontrola;
- podaci ispitivanja za utvrĐivanje raspona doza, ukoliko je obavljeno;
- obrazloženje za izbor doznih nivoa;
- detalji pripreme ispitivane supstance
- detalji primjene ispitivane supstance;

- obrazloženje puta primjene;
- metode za potvrdu činjenice da je ispitivana supstanca dospjela u sistemski krvotok ili do ciljnog tkiva, ukoliko je primjenjivo;
- način preračunavanja koncentracije ispitivane supstance u hrani/vodi za piće (ppm) u dozu (mg/kg TM/dan), ukoliko je primjenjivo;
- detalji o kvalitetu hrane i vode;
- detaljan opis rasporeda tretmana i uzorkovanja; - metode pripreme mikroskopskih pločica (slajdova);
- metode mjerenja toksičnosti;
- kriterijum za vrednovanje mikronukleusnih nezrelih eritrocita;
- broj analiziranih ćelija po životinji;
- kriterijum za smatranje ispitivanja kao pozitivnog, negativnog ili dvosmislenog. 4) Rezultatima:
- znaci toksičnosti;
- udio nezrelih eritrocita prema ukupnom broju eritrocita;
- broj mikronukleusnih nezrelih eritrocita, posebno dat za svaku životinju;
- srednja vrijednost ± standardna devijacija broja mikronukleusnih nezrelih eritrocita po grupama.
- odnos doza-odgovor, gde je moguće;
- primjenjene statističke analize i metode;
- podaci negativne kontrole iz konkurentne studije i ranije studije; - podaci pozitivne kontrolne iz konkurentne studije.

4) Obrazloženju rezultata. 5) Zaključcima.

B. 13/14. MUTAGENOST: ISPITIVANJE REVERZNIH MUTACIJA NA BAKTERIJAMA

1. Metoda ispitivanja

Ekvivalentna međunarodna ispitna metoda navedena je u tabeli 2 dijela 0.

1.1. Uvod

Za ispitivanje bakterijskih reverznih mutacija koriste se sojevi Salmonella-e typhimurium i Escherichia-e coli kojima su neophodne aminokiseline, sa ciljem otkrivanja tačkastih mutacija koje obuhvataju supstituciju, adiciju i deleciju jednog ili nekoliko parova baza DNK. Princip ispitivanja bakterijskih reverznih mutacija je da detektuje mutacije koje dovode do reverzije mutacija prisutnih u ispitivanim sojevima i tako obnavljaju funkcionalnu sposobnost bakterija da sintetišu esencijalne aminokiseline. Reverzno mutirane bakterije otkrivaju se na osnovu njihove sposobnosti rasta u odsustvu aminokiseline koja je potrebna roditeljskom ispitivanom soju.
Tačkaste mutacije su uzrok mnogih genetskih oboljenja kod ljudi i postoje znatni dokazi da tačkaste mutacije u onkogenima i tumor-supresorskim genima somatskih ćelija učestvuju u nastanku tumora kod ljudi i eksperimentalnih životinja. Ispitivanje bakterijskih reverznih mutacija je brzo, jeftino i relativno jednostavno za izvođenje. Mnogi eksperimentalni sojevi imaju nekoliko osobina koje ih čine osjetljivim na otkrivanje mutacija, uključujući osjetljive sekvence DNK na mestima reverzije, povećanu propustljivost ćelija za veće molekule i eliminaciju sistema reparacije DNK ili pojačavanja procesa reparacije DNK molekula sklonih greškama. Specifičnost eksperimentalnih sojeva pruža korisne podatke o tipu mutacija koje izazivaju genotoksični agensi. Dostupna je velika baza rezultata ispitivanja bakterijskih reverznih mutacija za veliki broj različitih struktura i razvijene su dobro ubazirajune metodologije za ispitivanje hemikalija sa različitim fizičkim i hemijskim svojstvima, uključujući isparljiva jedinjenja.

Polazna razmatranja

Za ispitivanje bakterijskih reverznih mutacija koriste se prokariotske ćelije koje se od ćelija sisara razlikuju u karakteristikama kao što su: unošenje, metabolizam, hromozomska struktura i procesi reparacije DNK. Ispitivanja koja se obavljaju in vitro zahtijevaju upotrebu egzogenog izvora metaboličke aktivacije. Sistemi za in vitro metaboličku aktivaciju ne imitiraju in vivo uslove kod sisara. Ispitivanje ne pruža direktne podatke o mutagenom i karcinogenom potencijalu supstance kod sisara. Ispitivanje bakterijskih reverznih mutacija se primjenjuje kao inicijalni skrining za genotoksičnu aktivnost i kao aktivnost koja izaziva pojavu tačkastih mutacija. Opsežna baza podataka pokazala je da mnoge hemikalije koje su u ovom ispitivanju dale pozitivan rezultat pokazuju mutageno djelovanje i u drugim ispitivanjima. Postoje primjeri mutagenih agensa koji se ne otkrivaju ovim ispitivanjem. Razlozi za ove nedostatke se pripisuju specifičnoj prirodi efekta koji se detektuje razlikama u metaboličkoj aktivaciji ili u biorapoloživosti. Faktori koji povećavaju osjetljivost ispitivanja bakterijskih reverznih mutacija dovode do precjenjivanja mutagene aktivnosti.

Ispitivanje bakterijskih reverznih mutacija nije prikladno za procjenu određenih klasa hemikalija, npr. visoko baktericidnih jedinjenja (npr. određeni antibiotici), kao i onih za koje se smatra (ili je poznato) da specifično interferiraju sa sistemom replikacije ćelija sisara (npr. neki inhibitori topoizomeraze i neki analozi nukleotida). U tim slučajevima primjerenija su ispitivanja mutacija na ćelijama sisara. Iako je mnoštvo jedinjenja, koja daju pozitivan rezultat u ovom ispitivanju, karcinogeno za sisare, povezanost nije apsolutna. Ona zavisi od klase hemikalije, a postoje i karcinogeni koji se ne otkrivaju ovim ispitivanjem zbog toga što Dijeluju posredstvom drugih mehanizama koji nisu genotoksični ili putem mehanizama koji ne postoje u ćelijama bakterija.

1.2. Princip metode

Suspenzije bakterijskih ćelija izlažu se ispitivanoj supstanci u prisustvu i odsustvu egzogenog sistema metaboličke aktivacije. U okviru metode inkorporacije u podlogu, navedene suspenzije miješaju se sa nadslojem agara i odmah se nanose na minimalnu količinu podloge. U metodi preinkubacije smješa za tretman se inkubira, a zatim miješa sa nadslojem agara prije nanošenja na minimalnu količinu podloge. Kod obije tehnike, nakon dva ili tri dana inkubacije, broje se revertantne kolonije i upoređuju sa brojem spontanih revertantnih kolonija na kontrolnim podlogama sa vehikulumom. Opisano je nekoliko postupaka za izvođenje ispitivanja bakterijskih reverznih mutacija. Među navedenim koristi se metoda inkorporacije u podlogu, metoda preinkubacije, metoda fluktuacije i metoda suspenzije. Opisane su i modifikacije namjenjene ispitivanju gasova ili para. Postupci opisani u metodi ispitivanja prvenstveno se odnose na metodu inkorporacije u podlogu i metodu preinkubacije. Obije metode prikladne su za izvođenje eksperimenta sa i bez metaboličke aktivacije. Neke supstance se efikasnije otkrivaju primjenom metode preinkubacije. Navedene supstance pripadaju hemijskim klasama koje uključuju alifatične nitrozamine kratkog lanca, dvovalentne metale, aldehide, azo-boje i diazo jedinjenja, pirolizidinske alkaloide, alil jedinjenja i nitro jedinjenja[3]. Određene klase mutagena ne detektuju se korišćenjem standardnih postupaka, poput metode inkorporacije u podlogu ili metode preinkubacije. Navedene klase mutagena smatraju se "posebnim slučajevima" i za njihovo otkrivanje preporučuje se korišćenje alternativnih postupaka. Identifikuju se sljedeći "posebni slučajevi" (zajedno s primjerima postupaka koji se mogu upotrijebiti za njihovo otkrivanje): azoboje i diazo jedinjenja, gasovi i isparljive hemikalije i glikozidi. Odstepene od standardnog postupka se naučno opravdava.

1.3. Opis metode

1.3.1. Pripreme

1.5.1.1. Bakterije

Svježe kulture bakterija su uzgojene do kasne eksponencijalne ili rane stacionarne faze rasta (približno 10^9 ćelija po mL). Kulture u kasnoj stacionarnoj fazi ne upotrebljavati. Kulture koje se koriste tokom eksperimenta sadrže visok titar vijabilnih bakterija. Titar se prikazuje ili iz krivih rasta na osnovu podataka kontrole iz ranijih studija ili u svakom ispitivanju utvrđivanjem broja vijabilnih ćelija eksperimentom na podlozi. Preporučena temperatura inkubacije iznosi 37°C. Potrebno je upotrijebiti najmanje pet sojeva bakterija. Sojevi obuhvataju četiri soja S. typhimurium (TA1535; TA1537 ili TA97a ili TA97; TA98; i TA100) koji su se pokazali kao pouzdani i reproducibilni između laboratorijaa. Navedena četiri soja S. typhimurium imaju GC parove baza na primarnom mjestu reverzne mutacije i poznato je da oni neće otkriti određene oksidujuće mutagene, agense koji dovode do unakrsnog povezivanja i hidnivoa. Ovakve supstance se otkrivaju pomoću sojeva E. coli WP2 ili S. typhimurium TA102[19] koji imaju AT bazni par na primarnom mjestu reverzne mutacije. Preporučena kombinacija sojeva je:

- S. typhimurium TA1535 i

- S. typhimurium TA1537 ili TA97 ili TA97a i

- S. typhimurium TA98 i

- S. typhimurium TA100 i

- E. coli WP2 uvrA ili E. coli WP2 uvrA (pKM101) ili S. typhimurium TA102.

Kako bi se otkrili mutageni koji dovode do unakrsnog povezivanja, uključuje se TA102 ili dodaje soj E. coli koji je vičan u popravci DNK (npr. E. coli WP2 ili E. coli WP2 (PKM101)).

Primjeniti prihvaćene postupke za pripremanje "stock" kulture, verifikaciju markera i čuvanje. Potreba za aminokiselinama za rast se demonstrira za svaki preparat zamrznute "stock" kulture (za histidinom za sojeve S. typhimurium i triptofanom za sojeve E. coli). Na sličan način provjeriti ostale fenotipske karakteristike, odnosno prisustvo ili odsustvo plazmida R-faktora (tj. rezistencija na ampicilin kod sojeva TA98, TA100 i TA97a ili TA97, WP2 uvrA i WP2 uvrA (pKM101) i rezistencija na ampicilin + tetraciklin kod soja TA102); postojanje svojstvenih mutacija (tj. rfa mutacija kod S. typhimurium putem osjetljivosti na kristal-violet i uvrA mutacija kod E. Coli ili uvrB mutacija kod S. typhimurium, putem osjetljivosti na ultraljubičastu svijetlost)[2, 3]. Sojevi daju takav broj spontanih revertantnih kolonija na podlogama koji se nalazi u okviru raspona učestalosti koji se očekuje na osnovu podataka iz ranije kontrole laboratorijae i koji se nalazi unutar raspona koji se navodi u literaturi.

1.5.1.2. Podloga

Primjenjuje se odgovarajući minimalni agar (npr. koji sadrži Vogel-Bonner-ovu minimalnu podlogu "E" i glukozu) i nadsloj agara koji sadrži histidin i biotin ili triptofan koji omogućava nekoliko dioba ćelija.

1.5.1.3. Metabolička aktivacija

Bakterije su izložene ispitivanoj supstanci i u prisustvu i u odsustvu sistema metaboličke aktivacije. Najčešće korišćen sistem je postmitohondrijalna frakcija sa kofaktorom (S9) pripremljena od jetre glodara tretiranih agensima enzimske indukcije poput Aroclor-a 1254 ili kombinacije fenobarbitona i ß-naftoflavona. Postmitohondrijalna frakcija koristi se u koncentracijama u rasponu od 5% v/v do 30% v/v u obliku S9-miješavine. Izbor i uslovi sistema metaboličke aktivacije zavise od klase hemikalije koja se ispituje. U nekim slučajevima je prikladno da se iskoristi više od jedne koncentracije postmitohondrijalne frakcije. Za azo-boje i diazo-jedinjenja pokazuje se primjerenijom primjena sistema reduktivne metaboličke aktivacije.

1.5.1.4. Ispitivana supstanca/Preparat

Prije tretiranja bakterija, čvrste ispitivane supstance se rastvoraju ili suspenduju u odgovarajućim vehikulumima i da se razblaže. Tečne ispitivane supstance se direktno dodaju ispitivanim sistemima i/ili se razblažiti prije tretiranja. Svježe preparate ispitivane supstance upotrijebiti odmah, osim ukoliko podaci o stabilnosti pokazuju da je čuvanje prihvatljivo.

Vehikulum hemijski ne reaguje sa ispitivanom supstancom. Vehikulum je kompatibilan sa preživljenjem bakterija i S9 aktivnošću. Ukoliko se primjenjuju manje poznati vehikulumi, njihovo uključivanje u ispitivanje je potkrijepljenjo podacima koji ukazuju na njihovu kompatibilnost. Kad god je moguće, preporučuje se vodeni vehikulum. Prilikom ispitivanja supstanci koje su nestabilne u vodi, organski rastvarači koji se koriste ne ssadrže vodu.

1.5.2. Uslovi ispitivanja

1.5.2.1. Eksperimentalni sojevi

Eksperimentalni sujevi su dati u tački 1.5.1.1. ove metode.

1.5.2.2. Koncentracija kojoj se izlažu bakterije

MeĐu kriterijumima koji se uzimaju u obzir prilikom utvrĐivanja najveće količine ispitivane supstance koja će se primjeniti je citotoksičnost i rastvorljivost u konačnoj smješi namijenjenoj za primjenu.

Utvrditi toksičnost i rastvorljivost u preliminarnom eksperimentu. Citotoksičnost se otkriva preko redukcije broja revertantnih kolonija, bistrenjem ili smanjivanjem pozadine ili stepena preživljavanja tretiranih kultura. Citotoksičnost neke supstance se mijenja uslijed prisustva sistema metaboličke aktivacije. Nerastvorljivost ocjeniti kao precipitaciju (taloženje) u konačnoj miješavini pod stvarnim eksperimentalnim uslovima, a koja je vidljiva golim okom. Preporučena maksimalna ispitivana koncentracija za rastvorne supstance koje nisu citotoksične iznosi 5 mg/podloga ili 5 µL/podloga. Za supstance koje nisu citotoksične i koje se ne rastvaraju pri 5 mg/podloga ili 5 µL/podloga, jedna ili više ispitivanih koncentracija je nerastvorna u konačnoj smješi namijenjenoj za tretman. Ispitivane supstance koje su ciotoksične već pri nivoima nižim od 5 mg/podloga ili 5 µL/podloga ispitivati sve do citotoksične koncentracije. Precipitat ne utiče na ocjenjivanje (prebrojavanje).

Upotrijebiti najmanje pet različitih koncentracija ispitivane supstance (koje je moguće analizirati) u intervalima od otprilike polovine log (tj. $\sqrt{10}$) između tačaka ispitivanja u inicijalnom eksperimentu. Manji intervali se pokazuju prikladnim prilikom ispitivanja veze između koncentracije i odgovora. Ispitivanje koncentracija iznad 5 mg/podloga ili 5 µL/podloga uzeti u obzir prilikom vrednovanja supstance koje sadrže značajne količine potencijalno mutagenih nečistoća.

1.5.2.3. Pozitivne i negativne kontrole

Svako ispitivanje uključuje istovremene pozitivne i negativne kontrole (vehikulum) specifične za soj, sa i bez metaboličke aktivacije. Odabrati koncentracije pozitivne kontrole koje će pokazati efikasno obavljanje svakog eseja. Za eseje sa sistemom metaboličke aktivacije, referentnu supstancu pozitivne kontrole odabrati na osnovu vrste bakterijskih sojeva koji se koriste.

Tabela 1: Primjeri supstanci odgovarajućih pozitivnih kontrola za eseje sa metaboličkom aktivacijom

CAS br.	EINECS br.	Nazivi
781-43-1	212-308-4	9,10-dimetilantracen
57-97-6	200-359-5	7,12-dimetilbenzo[a]antracen
50-32-8	200-028-5	benzo[a]piren
613-13-8	210-330-9	2-aminoantracen
50-18-0		ciklofosfamid
6055-19-2	200-015-4	ciklofosfamid monohidrat

Tabela 2. Primjeri supstanci odgovarajućih pozitivnih kontrola za eseje sa metaboličkom aktivacijom

CAS br.	EINECS br.	Nazivi
573-58-0	209-358-4	Kongo crveno

2-aminoantracen ne upotrebljavati kao jedini indikator efikasnosti S9-smješe. Ukoliko se koristi 2-aminoantracen, svaki lot S9 takoĐe nosi obilježje mutagena koji zahtijeva metaboličku aktivaciju mikrozomalnim enzimima, npr. benz[a]piren, dimetilbenzantracen. Supstance date u Tabeli 3. primjeri su pozitivnih kontrola specifičnih za soj za eseje koji se sprovode bez egzogenog sistema metaboličke aktivacije.

CAS br.	EINECS br.	Nazivi	Soj
26628-22-8	247-852-1	Natrijum-azid	TA 1535 i TA 100
607-57-8	210-138-5	2-nitrofluoren	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-aminoakridin	TA 1537, TA 97 i TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 i TA 97a
80-15-9	201-254-7	Kumen hidroperoksid	TA 102
50-07-7	200-008-6	mitomicin C	WP2 uvrA i TA102
70-25-7	200-730-1	N-etil-N-nitro-N-nitrozogvanidin	WP2, WP2uvrA i WP2uvrA(pKM101)
56-57-5	200-281-1	4-nitrohinolin-1-oksid	WP2, WP2uvrA i WP2uvrA (pKM101)
3688-53-7		Furilfuramid (AF2)	sojevi koji sadrže plazmid

Tabela 3. Primjeri pozitivnih kontrola specifičnih za soj za eseje

Koriste se i druge referentne supstance kao pozitivne kontrole. Uzima se u obzir upotreba hemikalije srodne klase kao pozitivna kontrola, kada je dostupna. Uključiti negativne kontrole koje se sastoje samo od vehikuluma, bez ispitivane supstance i sa kojima se postupa na isti način kao i sa tretiranim grupama. Koristiti netretirane kontrole, osim ukoliko postoje kontrolni podaci iz ranijih studija koji pokazuju da izabrani vehikulum ne dovodi do štetnih ili mutagenih efekata.

1.5.3. Postupak

Kod metode inkorporacije u podlogu bez metaboličke aktivacije, obično se 0,05 mL ili 0,1 mL ispitivanih rastvora, 0,1 mL svježe bakterijske kulture (koja sadrži otprilike 10^8 vijabilnih ćelija) i 0,5 mL sterilnog pufera pomiješa sa 2,0 mL nadsloja agara. Za esej sa metaboličkom aktivacijom, obično se 0,5 mL smješe za metaboličku aktivaciju, koja sadrži odgovarajuću količinu postmitohondrijalne frakcije (u rasponu od 5% v/v do 30% v/v u smješi za metaboličku aktivaciju) miješa s nadslojem agara (2,0 mL) zajedno s bakterijama i ispitivanom supstancom/ispitivanim rastvorom. Sadržaj svake epruvete izmiješa se i prelije preko površine minimalne agar hranjive podloge. Nadsloj agara ostavlja se kako bi se stvrdnuo pre inkubacije.

Kod metode preinkubacije ispitivana supstanca/ispitivan rastvor se preinkubira zajedno s ispitivanim sojem (koji sadrži otprilike 10^8 vijabilnih ćelija) i sterilnim puferom ili sistemom metaboličke aktivacije (0,5 mL), obično u trajanju od 20 minuta ili duže, pri temperaturi od 30°C do 37°C, a pre miješanja s nadslojem agara i prelivanja preko površine minimalne agar

podloge. Obično se 0,05 mL ili 0,1 mL ispitivane supstance/ispitivanog rastvora, 0,1 mL bakterija i 0,5 mL S9-smješe ili sterilnog pufera pomiješa sa 2,0 mL nadsloja agara. Epruvete tokom preinkubacionog perioda treba snabdeti vazduhom, primjenom uređaja za mućkanje.

Potrebno je da se primjene po tri podloge za svaki dozni nivo u cilju odgovarajuće procjene varijabilnosti. Prihvatljivo je da se primjene po dve podloge u slučajevima kada je to naučno opravdano. Povrijemeni gubitak podloge ne čini nužno esej nevažećim.

Gasovite i isparljive supstance potrebno je ispitivati pomoću odgovarajućih metoda, npr. u zapečaćenim sudovima .

1.5.4. Inkubacija

Sve podloge u određenom ispitivanju treba inkubirati na temperaturi od 37°C tokom 48 do 72 sata. Nakon perioda inkubacije prebrojava se broj revertantnih kolonija po podlozi.

2. Podaci

2.1. Obrada rezultata

Podaci se navode u obliku broja revertantnih kolonija po podlozi. Navodi se broj revertantnih kolonija na podlogama negativne (kontrola sa vehikulumom i netretirana kontrola, ukoliko su primjenjene) i pozitivne kontrole. Navesti broj i srednju vrijednost revetrantnih kolonija po podlozi i standardnu devijaciju za ispitivanu supstancu i pozitivne i negativne (netretirane i/ili vehikulum) kontrole.

Ako se dobiju dvosmisleni rezultati, razjasniti ih u daljim ispitivanjima, najbolje modifikovanjem eksperimentalnih uslova. Negativne rezultate potvrditi u zavisnosti od slučaja. U slučajevima u kojima se potvrda negativnih rezultata ne smatra neophodnom, daje se obrazloženje. U narednim eksperimentima razmotriti modifikaciju parametara ispitivanja s ciljem proširenja opsega ocjenjivanih uslova. Parametri ispitivanja koje je moguće modifikovati obuhvataju razmak između koncentracija, metodu tretmana (inkorporacija u podlogu ili tečna preinkubacija) i uslove metaboličke aktivacije.

2.2. Procjena i tumačenje rezultata

Postoji nekoliko kriterijuma za utvrĐivanje pozitivnog rezultata, kao što je povećanje u zavisnosti od koncentracije u okviru ispitivanog opsega i/ili reproducibilnog povećanja broja revertantnih kolonija po podlozi pri jednoj ili više koncentracija, kod najmanje jednog soja, sa ili bez sistema metaboličke aktivacije[23]. Prvenstveno se uzima u obzir biološki značaj rezultata. Primjenjuju se i statističke metode kao pomoć prilikom ocjenjivanja rezultata ispitivanja[24]. Statistički značaj nije jedini činilac pomoću koga se utvrđuje pozitivni odgovor. Ispitivana supstanca za koju rezultati ne zadovoljavaju gore navedene kriterijume je nemutagena u ovom ispitivanju.

Iako većina eksperimenata daje jasne pozitivne ili negativne rezultate, u rijetkim slučajevima utvrĐeni podaci ne omogućavaju donošenje konačnog suda o djelovanju ispitivane supstance. Pozitivni rezultati ispitivanja bakterijskih reverznih mutacija ukazuju na to da supstanca uzrokuje

tačkaste mutacije supstitucijom baze ili podnosanjem okvira čitanja u genomu kod Salmonella typhimurium odnosno Escherichia coli. Negativni rezultati ukazuju na to da, pod eksperimentalnim uslovima, ispitivana supstanca ne izaziva mutagene promjene kod eksperimentne vrste.

3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o: 1) Vehikulumu:

- obrazloženje izbora vehikuluma;
- rastvorljivost i stabilnost ispitivane supstanca u vehikulumu, ukoliko su poznati. 2) Sojevima:
- upotrijebljeni sojevi; - broj ćelija po kulturi; - karakteristike soja. 3) Uslovima ispitivanja:
- količina ispitivane supstance po podlozi (mg/podloga ili µL/podloga) s obrazloženjem za izbor doze i broj podloga po koncentraciji; - upotrijebljena podloga;
- tip i sastav sistema metaboličke aktivacije, uključujući kriterijume prihvatljivosti; - postupci tretmana. 4) Rezultatima:
- znaci toksičnosti;
- znaci precipitacije;
- broj za pojedinačne podloge;
- prosječan broj revertantnih kolonija po podlozi i standardna devijacija;
- odnos doza-odgovor, ako je moguće;
- statističke analize, ukoliko postoje;
- podaci negativne (vehikulum) i pozitivne kontrole iz konkurentne studije, sa opsezima, srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama;
- podaci negativne (vehikulum) i pozitivne kontrole iz ranije studije, sa opsezima srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama;

5) Obrazloženju rezultata.

6) Zaključcima.

B.15. ISPITIVANJE MUTAGENOSTI I SKRINING ZA GENSKE MUTACIJE KARCINOGENOSTI-SACCAHAROMYCES CEREVISIAE

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

Uvod je dat u Opšti uvod.

1.2. Referentne supstance

Referentne supstance nijesu propisane.

1.3. Princip metode

Mjerenje produkcije genskih mutacija izazvanih hemijskim agensima sa i bez metaboličke aktivacije se izvodi na više haploidnih i diploidnih sojeva kvasca Saccharomyces cerevisiae.

Koriste se raniji sistemi mutacije kod haploidnih sojeva, poput mjerenja mutacije od crvenih mutanata zavisnih od adenina (ade-1, ade-2) do bijelih mutanata dvostruko zavisnih od adenina i selektivni sistemi poput indukcije rezistencije na kanavnain i cikloheksimid. Najobimnije validiran sistem reverznih mutacija uključuje primjenu haploidnog soja HV 185-14C koji nosi oker nonsense mutacije ade 2-1, arg 4-17, lys 1-1 i trp 5-48, koje su reverzibilne mutageninima supstitucije baza koji izazivaju mutacije specifičnih lokacija ili mutacije oker supresora. HV 18514C takoĐe nosi marker his 1-7, missense mutaciju koja se reverzno mutira uglavnom kroz mutacije na drugoj lokaciji, kao i marker hom 3-10 koga reverzno mutiraju mutageni pomaka okvira čitanja. U diploidnim sojevima S. cerevisiae jedini soj koji ima široku primjenu je D7 koji je homozigotan za ilv 1-92.

1.4. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi nijesu propisani.

1.5. Opis metode

1.5.1. Pripreme

Rastvore ispitivanih hemikalija i kontrole pripremiti neposredno prije ispitivanja, uz primjenu odgovarajućeg vehikuluma. Kada su u pitanju organska jedinjenja koja nisu rastvorna u vodi, ne upotrebljavati rastvor jači od 2% v/v za organske rastvarače kao što su etanol, aceton ili dimetilsulfoksid (DMSO). Konačna koncentracija vehikuluma ne utiče na ćelijsku vijabilnost i osobine rasta.

1.5.1.1. Metabolička aktivacija

Ćelije su izložene ispitivanim hemikalijama i u prisustvu i u odsustvu odgovarajućeg egzogenog sistema metaboličke aktivacije. Najčešće korišćen sistem je postmitohondrijalna frakcija sa kofaktorom pripremljena od jetre glodara prethodno tretiranih agensima enzimske indukcije. Za metaboličku aktivaciju prihvatljiva je primjena i drugih vrsta, tkiva, postmitohondrijalnih frakcija ili postupaka.

1.5.2. Uslovi ispitivanja

1.5.2.1. Eksperimentalni sojevi

Haploidni soj HV 185-14C i diploidni soj D7 su sojevi koji se najčešće primjenjuju u ispitivanjima genskih mutacija. Odgovaraju i drugi sojevi.

1.5.2.2. Podloge

Radi utvrĐivanja preživljavanja i broja mutanata koriste se odgovarajuće podloge za kultivisanje.

1.5.2.3. Primjena pozitivnih i negativnih kontrola

Istovrijemeno izvesti pozitivne, netretirane i kontrole vehikuluma. Za svaki posmatrani specifični efekat mutacije primjenjuju se odgovarajuće hemikalije pozitivne kontrole.

1.5.2.4. Koncentracija izlaganja

Upotrijebiti najmanje pet odgovarajuće raspoređenih koncentracija ispitivane supstance. Najviša ispitivana koncentracija toksičnih supstanci ne smanjuje preživljenje ispod 5% do 10%. Supstance koje su relativno nerastvorne u vodi ispitati do granice rastvorljivosti, uz primjenu odgovarajućih postupaka. Za netoksične supstance koje se lako rastvaraju u vodi gornju granicu koncentracije odrediti u zavisnosti od slučaja.

1.5.2.5. Uslovi inkubacije

Podloge se inkubiraju od četiri do sedam dana na temperaturi od 28°C do 30 °C na tamnom mjestu.

1.5.2.6. Frekvencija spontanih mutacija

Koristiti subkulture kod kojih je frekvenca spontanih mutacija u okviru prihvaćenog normalnog opsega.

1.5.2.7. Broj replikata

Primjeniti najmanje tri podloge po koncentraciji za esej prototrofa nastalih usled genske mutacije i za vijabilnost ćelija. U slučaju eksperimenta koji koriste markere kao što je hom 3-10 sa niskim stopom mutacija, broj hranljivih podloga se povećava kako bi se dobili statistički relevantni podaci.

1.5.3. Postupak

Tretiranje sojeva S. cerevisiae obavlja se u postupku ispitivanja u tečnoj podlozi koji obuhvata ćelije u fazi mirovanja ili ćelije u rastu. Inicijalne eksperimente izvoditi na ćelijama u rastu: 1-5 x 10^7 ćelija/mL izlaže se ispitivanoj hemikaliji do 18 sati na temperaturi od 28°C do 37°C uz miješanje. Tokom tretmana dodaje se odgovarajuća količina sistema metaboličke aktivacije kada je prikladno. Na kraju tretmana ćelije se centrifugiraju, ispiraju i zasijavaju na odgovarajuću podlogu. Nakon inkubacije, podloge se ocjenjuju na preživljavanje i indukciju genskih mutacija. Ukoliko je prvi eksperiment negativan, drugi eksperiment se izvodi uz primjenu ćelija u fazi mirovanja. Ukoliko je prvi eksperiment pozitivan, potvrđuje se obavljanjem odgovarajućeg nezavisnog eksperimenta.

2. Podaci

Podaci se navode tabelarno. Navodi se: broj izbrojanih kolonija, broj mutanata, preživljavanje i učestalost mutacija. Sve rezultate potvrditi u nezavisnom eksperimentu. Podaci se procjenjuju primjenom odgovarajućih statističkih metoda.

3. Izvještaj

3.1. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:
- upotrijebljenom soju;

- uslovima ispitivanja: faza mirovanja ili ćelije u rastu, sastav podloge, temperatura inkubacije i trajanje, sistem metaboličke aktivacije;
- uslovima tretiranja: nivoi izlaganja, postupak i trajanje tretmana, temperatura na kojoj se izvodi, pozitivne i negativne kontrole;
- broju izbrojanih kolonija, broj mutanata, preživljavanje i učestalost mutanata, odnos dozaodgovor, ukoliko je moguće, statističku procjenu podataka;
- obrazloženju rezultata, - tumačenju rezultata.

3.2. Procjena i tumačenje rezultata

Procjena i tumačenje rezultata su dati u Opšti uvod.

B.16. MITOTSKA REKOMBINACIJA - SACCAROMYCES CEREVISIAE

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

1.2. Referentne supstance

Referentne supstance nijesu propisane.

1.3. Princip metode

Mitotska rekombinacija kod Saccaromyces cerevisiae otkriva se između gena (ili obično između gena i njegove centrodnose), kao i unutar gena. Prvi navedeni događaj naziva se mitotskim krosingoverom (crossing-over) i stvara recipročne proizvode, dok drugi događaj najčešće nije recipročan i naziva se konverzijom gena. Krosingover se obično ispituje na osnovu stvaranja recesivnih homozigotnih kolonija ili sektora stvorenih u heterozigotnom soju, dok se konverzija gena ispituje na osnovu stvaranja prototrofnih revertanata koji nastaju u auksotrofnom heteroalelnom soju koji nosi dva različita defektna alela istog gena. Najčešće korišćeni sojevi namijenjeni otkrivanju mitotske konverzije gena su: D_4 (heteroalel na ade 2 i trp 5), D_7 (heteroalel na trp 5), BZ_{34} (heteroalel na arg 4) i JDl (heteroalel na his 4 i trp 5). Mitotski krosingover koji stvara crvene i ružičaste homozigotne sektore analizira se kod D_5 ili D_7 (čime se ujedno mjeri mitotska konverzija gena i reverzna mutacija na ilv 1-92), pri čemu su oba soja heteroalelna za komplementarne alele ade 2.

1.4. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta nijesu propisani.

1.5. Opis metode

1.5.1. Priprema

Rastvori ispitivanih hemikalija i kontrolnih ili referentnih jedinjenja pripremaju se neposredno prije ispitivanja, uz primjenu odgovarajućeg vehikuluma. Kada su u pitanju organska jedinjenja koji nisu rastvorljiva u vodi, ne upotrebljavati rastvor jači od 2% v/v organskih rastvarača kao što su etanol, aceton ili dimetilsulfoksid (DMSO). Konačna koncentracija vehikuluma ne utiče na ćelijsku vijabilnost i osobine rasta ćelija.

1.5.1.1. Metabolička aktivacija

Ćelije su izložene ispitivanim hemikalijama i u prisustvu i u odsustvu odgovarajućeg egzogenog sistema metaboličke aktivacije. Najčešće korišćen sistem je postmitohondrijalna frakcija sa kofaktorom, pripremljena od jetre glodara prethodno tretiranih agensima koji indukuju enzime. Za metaboličku aktivaciju primjenjuju se i druge vrste, tkiva, postmitohondrijalne frakcije ili postupci.

1.5.2. Uslovi ispitivanja

1.5.2.1. Eksperimentalni sojevi

Najčešće se primjenjuju sojevi diploidi D_4, D_5, D_7 i JD_1. Mogu da se koriste i drugi sojevi.

1.5.2.2. Podloga

Za određivanje preživljavanja i učestalosti mitotske rekombinacije koriste se odgovarajuće podloge.

1.5.2.3. Upotreba pozitivnih i negativnih kontrola

Istovremeno izvoditi pozitivne, netretirane i kontrole vehikuluma. Primjenjuju se odgovarajuće hemikalije pozitivne kontrole za svaki specifični pokazatelj ispitivanja rekombinacije.

1.5.2.4. Koncentracije izlaganja

Upotrijebiti najmanje pet odgovarajućih raspoređenih koncentracija ispitivane supstance. MeĐu faktorima koji se uzimaju u obzir nalaze se citotoksičnost i rastvorljivost. Najniža koncentracija nema efekat na vijabilnost ćelija. Najviša ispitivana koncentracija toksičnih hemikalija ne smanjuje preživljenje ispod 5% do 10%. Hemikalije koje su relativno nerastvorne u vodi ispitivati do njihove granice rastvorljivosti uz primjenu odgovarajućih postupaka. Za netoksične supstance koje se lako rastvaraju u vodi gornja granica koncentracije određuje se u zavisnosti od slučaja. Ćelije se izlažu ispitivanim hemikalijama u fazi mirovanja ili tokom rasta u trajanju do 18 sati. Za dugotrajne tretmane kulture mikroskopski pregledati na formiranje spora, čije postojanje čini ispitivanje nevažećim.

1.5.2.5. Uslovi inkubacije

Podloge se inkubiraju na tamnom mjestu, od četiri do sedam dana, na temperaturi od 28°C do 30°C. Podloge koje se koriste za ispitivanje crvenih i ružičastih homozigotnih sektora koji su

nastali mitotskim krosingoverom držati u frižideru (na temperaturi oko 4°C) tokom jednog do dva dana prije ocjenjivanja, a kako bi se omogućio razvoj odgovarajućih pigmentovanih kolonija.

1.5.2.6. Učestalosti spontane mitotske rekombinacije

Koriste se subkulture sa učestalošću spontanih mutacija mitotske rekombinacije u okviru prihvaćenog normalnog opsega.

1.5.2.7. Broj replikata

Za ispitivanje prototrofa nastalih usled mitotske konverzije gena i za vijabilnost ćelija primjeniti najmanje tri podloge po koncentraciji. U slučaju ispitivanja recesivnih homozigota koje nastaju mitotskim krosingoverom, povećati broj podloga kako bi se obezbijedio odgovarajući broj kolonija.

1.5.3. Postupak

Tretiranje sojeva S. Cerevisiae obično se obavlja postupkom u tečnoj podlozi koji uključuje ćelije u fazi mirovanja ili ćelije u rastu. Prethodni eksperimenti se obavljaju na ćelijama u rastu: 1-5 x 10^7 ćelija/mL izlaže se ispitivanoj hemikaliji do 18 sati na temperaturi od 28°C do 37°C uz miješanje. Tokom tretmana dodaje se odgovarajuća količina sistema za metaboličku aktivaciju, kada je prikladno.

Na kraju tretmana ćelije se centrifugiraju, ispiraju i zasejavaju na odgovarajuće podloge za kultivisanje. Nakon inkubacije, hranljive podloge se ocjenjuju na preživljenje i indukciju mitotske rekombinacije.

Ukoliko je prvi eksperiment negativan, treba obaviti drugi eksperiment uz primjenu ćelija u fazi mirovanja. Ukoliko je prvi eksperiment pozitivan, ovaj rezultat se potvrđuje u nezavisnom eksperimentu.

2. Podaci

Podaci se navode tabelarno. Navodi se: broj izbrojanih kolonija, broj rekombinanata, preživljenje i frekvenca rekombinanata.

Potrebno je potvrditi rezultate u nezavisnom eksperimentu.

Podaci se procjenjuju primjenom statističkih metoda.

3. Izvještaj

3.1. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:
- upotrijebljenom soju;
- uslovima ispitivanja: stacionarna faza ili ćelije u rastu, sastav podloge, temperatura inkubacije i trajanje, sistem metaboličke aktivacije;

- uslovima tretiranja: koncentracija kojoj su ćelije izložene, postupak i trajanje tretmana, temperatura, pozitivne i negativne kontrole;
- broju izbrojanih kolonija, broj rekombinanata, preživljenje i učestalost rekombinacije, odnos doza-odgovor, ukoliko je moguće, statistička procjena podataka;
- obrazloženju rezultata; - tumačenju rezultata.

3.2. Procjena i tumačenje rezultata

Procjena i tumačenje rezultata dati su u Opšti uvod.

B.17. MUTAGENOST - IN VITRO ISPITIVANJE GENSKE MUTACIJE NA ĆELIJAMA SISARA UPOTREBOM GENA HPRT I XPRT

UVOD

Ekvivalentna međunarodna ispitna metoda navedena je u tabeli 2 dijela 0.

1. Ova ispitna metoda odgovara smjernici OECD-a za ispitivanje 476 (2016.). Ispitne metode periodično se preispituju uzimajući u obzir naučni napred, promjene regulatornih potreba i dobrobit životinja. U trenutno revidiranoj verziji ispitne metode B.17. uzima se u obzir gotovo 30 godina iskustva s ovim ispitivanjem te je ona rezultat razvoja posebne nove metode namijenjene in vitro ispitivanjima genskih mutacija ćelija sisara upotrebom gena za timidin kinazu. Ispitna metoda B.17. dio je niza ispitnih metoda u području genetske toksikologije. OECD je sastavio dokument u kojem se daju sažete informacije o ispitivanju u području genetske toksikologije te pregled novijih promjena smjernica OECD-a za ispitivanje genotoksičnosti.

2. Svrha je in vitro ispitivanja genskih mutacija ćelija sisara otkrivanje genskih mutacija indukovanih hemikalijama. Ćelijske linije koje se upotrebljavaju u tim ispitivanjima mjere napredne mutacije na reporterskim genima, tačnije na genu za endogenu hipoksantin-gvanin-fosforibozil-transferazu (Hprt kod ćelija glodara, HPRT kod ljudskih ćelija; u ovoj se ispitnoj metodi zajednički nazivaju gen Hprt i HPRT test) i transgenu za ksantin-gvanin-fosforibozil-transferazu (gpt) (dalje u tekstu „XPRT test”). Testovi mutacija HPRT i XPRT otkrivaju različite spektre genetskih pojava. Uz mutacije otkrivene HPRT testom (npr. supstitucije baznih parova, pomaci okvira očitavanja, manje delecije i insercije), autosomalna lokacija transgena gpt može omogućiti otkrivanje mutacija koje su rezultat velikih delecija i moguće mitotske rekombinacije koja nije otkrivena HPRT testom jer se gen Hprt nalazi na X-hromosomu (2., 3., 4., 5., 6. i 7.). XPRT se trenutno upotrebljava manje nego HPRT test u regulatorne svrhe.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

4. Ispitivanja koja se obavljaju in vitro obično zahtijevaju primjenu egzogenog izvora metaboličke aktivacije. Egzogenim sistemom metaboličke aktivacije ne imitiraju se u cijelosti in vivo uslovi.

5. Trebalo bi voditi računa o tome da se izbjegnu uslovi koji bi doveli do lažno pozitivnih rezultata (odnosno moguće interakcije s ispitnim sistemom) koji nisu uzrokovani direktnom interakcijom ispitivanih hemikalija i genetskog materijala ćelije; takvi uslovi uključuju promjene pH-vrijednosti ili osmolalnosti (8., 9. i 10.), interakciju s komponentama medija (11. i 12.) ili prekodnosnog nivoa citotoksičnosti (13.). Citotoksičnost koja prekoračuje preporučene najviše nivoe citotoksičnosti, kako su definisane u tački 19., smatra se prekodnosnom za HPRT test.

6. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smješi radi dobijanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smješe.

NAČELO ISPITIVANJA

7. Mutirane ćelije kod kojih nema aktivnosti enzima Hprt u HPRT testu ili aktivnosti enzima xprt u XPRT testu otporne su na citostatske efekte purin analognog 6-tiogvanina (TG). Ćelije koje sadrže dosta Hprta (u HPRT testu) ili gpta (u XPRT testu) osjetljive su na TG, što uzrokuje inhibiciju ćelijinog metabolizma i sprečava dalju diobu ćelija. Tako se mutirane ćelije uz prisutnost TG-a mogu razmnožavati, a normalne ćelije koje sadrže enzim Hprt (u HPRT testu) ili gpt (u XPRT testu) ne mogu.

8. Ćelije u suspenziji ili jednoslojnim kulturama izlažu se u odgovarajućem trajanju ispitivanoj hemikaliji (od tri sata do šest sati), s egzogenim izvorom metaboličke aktivacije i bez njega (vidjeti tačku 14.), te se zatim supkultiviraju da bi se utvrdila citotoksičnost i omogućila fenotipska ekspresija prije selekcije mutanata (14., 15., 16. i 17.). Citotoksičnost se utvrđuje relativnom stopom preživljavanja, tj. efikasnošću kloniranja koja se mjeri odmah nakon tretiranja i prilagođava za mogući gubitak ćelija tokom tretiranja u poređenju s negativnom kontrolom (tačka 8. i Dodatak 2.). Tretirane se kulture drže u medijumumu za rast tokom dovoljno dugog vremenskog perioda koje je karakteristično za svaki tip ćelije, kako bi se omogućila gotovo optimalna fenotipska ekspresija indukovanih mutacija (obično najmanje 7–9 dana). Nakon fenotipske ekspresije utvrđuje se učestalost pojave mutanata nasađivanjem poznatog broja ćelija u medijumumu koji sadrži selektivni agens za otkrivanje kolonija mutanata, a u medij bez selektivnog agensa za određivanje efikasnoti kloniranja (vijabilnost). Nakon odgovarajućeg perioda inkubacije kolonije se prebroje. Učestalost pojave mutanata računa se na osnovu broja kolonija mutanata koji se ispravlja efikasnošću u trenutku selekcije mutanata.

OPIS METODE

Pripreme

Ćelije

9. Vrste ćelija koje se koriste u testovima HPRT i XPRT trebale bi imati dokazanu osjetljivost na hemijske mutagene, visoku efikasnost kloniranja, stabilan kariotip i stabilnu učestalost pojave spontanih mutanata. Ćelije koje se najčešće upotrebljavaju za HPRT test uključuju linije ćelija kineskog hrčka CHO, CHL i V79, ćelije limfoma miša L5178Y te ćelije ljudskih limfoblastoidnih ćelija TK6 (18. i 19.). Za XPRT test upotrebljavaju se ćelije AS52 dobijene od ćelija CHO koje sadrže transgen gpt (i kod kojih je izbrisan gen Hprt) (20. i 21.); HPRT test ne može se

ssprovesti na ćelijama AS52 jer je izbrisan gen hprt. Upotreba drugih linija ćelija trebala bi se opravdati i validirati.

10. Rutinski bi trebalo provjeravati stabilnost modalnog broja hromosoma linija ćelija te odsustvo kontaminacije mikoplazmom (22. i 23.), a ćelije ne bi trebalo upotrebljavati ako su kontaminirane ili ako je promijenjen modalni broj hromosoma. Treba utvrditi uobičajeno trajanje ćelijinom ciklusa koje se upotrebljava u ispitnoj laboratorijai i ono treba biti u skladu s objavljenim karakteristikama ćelija. Trebalo bi provjeriti i učestalost pojave spontanih mutanata u glavnoj zalihi ćelija te zalihu ne bi trebalo upotrebljavati ako učestalost pojave mutanata nije prihvatljiva.

11.Prije upotrebe u ovom ispitivanju iz kultura će možda trebati odstraniti mutirane ćelije koje već postoje, npr. uzgojem u HAT medijumu za HPRT test i MPS medijumu za XPRT test (5. i 24.) (vidjeti Dodatak 1.). Te prečišćene ćelije mogu se krioprezervisati i zatim odmrznuti za upotrebu kao radni uzorci. Radni uzorak koji se odmrzne može se upotrebljavati za ispitivanje nakon što se dosegne normalno vrijeme duplikovanja. Pri sprovođenju XPRT testa za rutinsku kulturu ćelija AS52 trebali bi se primjenjivati uslovi kojima se osigurava održavanje transgena gpt (20.).

Uslovi koje moraju zadovoljavati podloge i kulture

12.Za održavanje kultura trebalo bi primjenjivati prikladne uslove za medije za uzgoj kulture i uslove inkubacije (posude za kulture, vlažne atmosferske uslove od 5 % CO2 i temperaturu inkubacije od 37 °C). ćelijske kulture uvijek bi se trebale održavati u uslovima kojima se osigurava da one rastu u logaritamskoj fazi. Posebno je važno odabrati uslove medija i kultura kojima se osiguravaju optimalni rast ćelija tokom perioda ekspresije i optimalna efikasnost kloniranja kako mutiranih tako i nemutiranih ćelija.

Priprema kultura

13.Ćelijske linije razmnožavaju se iz matičnih kultura te se nasađuju u medijumum za uzgoj kulture takvom gustinom da ćelije u suspenziji ili jednoslojnoj kulturi nastave eksponencijalno rasti tokom perioda tretiranja i ekspresije (npr. treba izbjegavati konfluenciju kod ćelija koje rastu kao jednoslojna kultura).

Metabolička aktivacija

14.Kod upotrebe ćelija s neodgovarajućom endogenom sposobnošću metabolizma trebalo bi upotrebljavati egzogene sisteme metaboličkog djelovanja. Sistem koji se najčešće upotrebljava i automatski preporučuje, osim ako je drukčije opravdano, jeste postmitohondrijska frakcija s dodatnim kofaktorom (S9), napravljena od jetre glodara (obično pacova), koja je bila tretirana sredstvima za enzimsku indukciju, kao što je Aroclor 1254 (25., 26., 27. i 28.), ili mješavinom fenobarbitala i β-naftoflavona (29., 30., 31. i 32.). Upotreba navedene smješe nije u suprotnosti sa Stockholmskom konvencijom o dugotrajnim organskim zagađujućim supstancama (33.) i dokazano je da je za indukciju oksidaza s miješanom funkcijom jednako efikasna kao Aroclor 1254 (29. i 31.). Frakcija S9 obično se upotrebljava u koncentracijama u rasponu od 1 do 2 % (v/v), ali može se povećati na 10 % (v/v) u konačnom ispitnom medijumumu. Na izbor vrste i koncentracije upotrijebljenog egzogenog sistema metaboličke aktivacije ili metaboličkog pokretača može uticati kategorija supstanci koje se ispituju (34., 35. i 36.).

Priprema ispitivane hemikalije

15. čvrste ispitivane hemikalije trebalo bi pripremiti u prikladnim rastvaračima i prema potrebi razrijediti prije tretiranja ćelija. Tečne ispitivane hemikalije mogu se dodati direktno u ispitni sistem i/ili razrijediti prije tretiranja ispitnog sistema. Gasovite ili isparljive ispitivane hemikalije trebalo bi ispitivati nakon što se prikladno izmijene standardni protokoli, kao što je tretiranje u hermetički zatvorenim posudama za kulture. Ispitivanu hemikaliju potrebno je pripremiti neposredno prije tretiranja, osim ako je prema podacima o stabilnosti prihvatljivo skladištenje.

ISPITNI USLOVI

Rastvarači

16. Rastvarač bi trebalo odabrati tako da se optimizuje rastvorljivost ispitivanih hemikalija bez negativnih efekata na sprovođenje ispitivanja, kao što su npr. promjena rasta ćelija, efekat na integritet ispitivane hemikalije, reagovanje s posudama za kulture ili oštećenje sistema metaboličke aktivacije. Preporučuje se da se, kad je god moguće, prvo uzme u obzir upotreba vodenog rastvarači (ili medija za uzgoj kulture). Uobičajeni su rastvarači, na primjer, voda i dimetil sulfoksid. Uopšteno, organski rastvarači ne bi trebali prelaziti 1 % (v/v), a vodeni rastvarači (fiziološki rastvor ili voda) ne bi trebali prelaziti 10 % (v/v) u medijumumu za završno tretiranje. Ako se upotrebljavaju neuobičajeni rastvarači (npr. etanol ili aceton), potrebno je opravdati njihovu upotrebu podacima iz kojih se vidi da su ti rastvarači kompatibilni s ispitivanim hemikalijama i ispitnim sistemom te da ne djeluju genotoksično pri upotrijebljenoj koncentraciji. Ako ne postoje ti popratni podaci, važno je dodati netretirane kontrole (vidjeti Dodatak 1.) kako bi se dokazalo da odabrani rastvarač ne indukuje štetne ili mutagene efekte.

Mjerenje citotoksičnosti i izbor koncentracija izlaganja

17. Pri utvrđivanju najviše koncentracije ispitivane hemikalije trebalo bi izbjegavati koncentracije koje imaju sposobnost izazivanja lažno pozitivnih odgovora, kao što su koncentracije koje izazivaju prekodnosnu citotoksičnost, taloženje u medijumu za uzgoj kulture ili znatne promjene pH-vrijednosti ili osmolalnosti. Ako ispitivana hemikalija u trenutku dodavanja uzrokuje znatnu promjenu pH-vrijednosti medija, pH-vrijednost može se prilagoditi puferisanjem medija za završno tretiranje kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati te održali primjereni uslovi za uzgoj kulture.

18. Izbor koncentracije zasniva se na citotoksičnosti i drugim razmatranjima. Iako ocjena citotoksičnosti u početnom ispitivanju može biti korisna za bolje određivanje koncentracija koje će se upotrebljavati u glavnom eksperimentu, početno ispitivanje nije potrebno. Čak i ako se sprovodi početna ocjena citotoksičnosti, i dalje je obavezno mjerenje citotoksičnosti za svaku kulturu u glavnom eksperimentu. Citotoksičnost bi se trebala ocjenjivati primjenom relativne stope preživljavanja, tj. efikasnošću kloniranja ćelija koje se nasade odmah nakon tretiranja, prilagođeno za mogući gubitak ćelija tokom tretiranja, na osnovu broja ćelija, u poređenju s prilagođenom efikasnošću kloniranja u negativnim kontrolama (kojima se dodjeljuje stopa preživljavanja od 100 %) (formulu vidjeti u Dodatku 2.).

19.Potrebno je ocijeniti najmanje četiri ispitne koncentracije (ne uključujući kontrolu s rastvaračem i pozitivnu kontrolu) koje ispunjavaju kriterijume prihvatljivosti (odgovarajuća citotoksičnost, broj ćelija itd.). Iako se preporučuje upotreba uporednih kultura, za svaku se

ispitivanu koncentraciju može upotrijebiti samo jedna tretirana kultura ili više njenih ponovljenih uzoraka. Rezultati dobijeni iz više nezavisnih ponovljenih kultura pri određenoj koncentraciji trebali bi se navoditi odvojeno, ali mogu se objediniti radi analize podataka (17.). Za ispitivane hemikalije koje pokazuju malu ili nikakvu citotoksičnost uglavnom će biti prikladne približno dvostruke ili trostruke koncentracije. Ako se pojavi citotoksičnost, odabranim bi ispitnim koncentracijama trebalo obuhvatiti raspon od koncentracije koja uzrokuje citotoksičnost do koncentracija pri kojima je citotoksičnost umjerena, niska ili nepostojeća. Mnoge ispitivane hemikalije imaju oštre krive odgovora na koncentraciju te će za obuhvatanje cijelog raspona citotoksičnosti ili detaljno istraživanje odnosa koncentracije i odgovora možda biti potrebno upotrijebiti bliže raspoređene koncentracije i više od četiri koncentracije, posebno u situacijama u kojima je potrebno ponavljanje eksperimenta (vidjeti tačku 43.). Upotreba više od četiri koncentracije može biti važna kad se upotrebljava jedna kultura.

20. Ako se maksimalna koncentracija zasniva na citotoksičnosti, najvećom koncentracijom trebala bi se nastojati ossupstanciti relativna stopa preživljavanja od 20 do 10 %. Trebalo bi s oprezom tumačiti pozitivne rezultate koji se nalaze samo pri relativnoj stopi preživljavanja od 10 % ili manjoj (tačka 43.).

21. Za slabo rastvorive ispitivane hemikalije koje nisu citotoksične pri koncentracijama nižima od najniže koncentracije pri kojoj hemikalija nije rastvoriva najviša bi analizirana koncentracija trebala dovesti do zamućenosti ili taloga vidljivog golim okom ili inverznim mikroskopom na kraju tretiranja ispitivanom hemikalijom. Čak i ako se citotoksičnost pojavi iznad najniže nerastvorive koncentracije, preporučuje se ispitivanje pri samo jednoj koncentraciji koja dovodi do zamućenja ili s vidljivim talogom jer lažni efekti mogu biti posljedica taloga. Pri koncentraciji zbog koje nastaje talog potrebno je osigurati da taj talog ne utiče na izvođenje ispitivanja. Može biti korisno odrediti rastvorivost u medijumu za uzgoj kulture prije izvođenja eksperimenta.

22. Ako nisu zapaženi talog ili ograničavajuća citotoksičnost, najviša ispitna koncentracija trebala bi odgovarati najnižoj od sljedećih vrijednosti: 10 mM, 2 mg/ml ili 2 µl/ml (39. i 40.). Ako sastav ispitivane hemikalije nije definisan, npr. ako je riječ o supstanci nepoznatog ili promjenjivog sastava, složenim reakcionim proizvodima ili biološkim materijalima (tj. hemijskim supstancama nepoznatog ili promjenjivog sastava ili UVCB supstancama) (41.), proizvodima ekstrahovanim iz životne sredine itd., možda će trebati povećati najvišu koncentraciju (npr. 5 mg/ml), u odsustvu dovoljne citotoksičnosti, kako bi se povećala koncentracija svakog sastojka. Međutim, trebalo bi napomenuti da ti zahtjevi mogu biti drugačiji za farmaceutske proizvode namijenjene ljudima (42.).

Kontrole

23. Kod svakog uslova eksperimenta potrebno je uključiti istovremene negativne kontrole (vidjeti tač 16.) koje se sastoje samo od rastvarača u medijumu za tretiranje i koje su tretirane na isti način kao kulture za tretiranje.

24. Istovremene pozitivne kontrole potrebne su za dokazivanje sposobnosti laboratorijaa za određivanje mutagena u uslovima upotrijebljenog protokola ispitivanja i efkasnosti egzogenog Sistema metaboličke aktivacije ako je primjenjivo. Primjeri pozitivnih kontrola navedeni su u tabeli 1. u nastavku. Ako je to opravdano, mogu se koristiti alternativne supstance za pozitivnu kontrolu. S obzirom na to da je in vitro ispitivanje genotoksičnosti na ćelijama sisara u dovoljnoj mjeri standardizovano, ispitivanja u kojima se upotrebljavaju tretiranja s egzogenom

metaboličkom aktivacijom i bez nje mogu se sprovoditi upotrebom samo pozitivnih kontrola koje zahtijevaju metaboličku aktivaciju. U tom će slučaju taj jedan odgovor pozitivne kontrole dokazati djelovanje Sistema metaboličke aktivacije i osjetljivost ispitnog sistema. Svaku pozitivnu kontrolu trebalo bi primijeniti pri jednoj ili više koncentracija za koje se očekuje da će dovesti do ponovljivih povećanja u odnosu na pozadinu kako bi se dokazala osjetljivost ispitnog sistema, a odgovor ne bi trebala dovesti u pitanje citotoksičnost koja prelazi granične vrijednosti utvrđene u ispitnoj metodi (vidjeti tač 20).

Tabela 1. Referentne supstance preporučene za ocjenu osposobljenosti laboratorijaa i za izbor pozitivnih kontrola

Stanje metaboličke aktivacije	Lokus	Supstanca i CAS br.
Odsutnost egzogene metaboličke aktivacije	Hprt	Etil metansulfonat [CAS br. 62-50-0] Etil nitrozoureja [CAS br. 759-73-9] 4-nitrokinolin-1-oksid [CAS br. 56-57-5]
	xprt	Streptonigrin [CAS br. 3930-19-6] Mitomicin C [CAS br. 50-07-7]
Prisutnost egzogene metaboličke aktivacije	Hprt	3-metilkolantren [CAS br. 56-49-5] 7,12-dimetilbenzantracen [CAS br. 57-97-6] Benzo[a]piren [CAS br. 50-32-8]
	xprt	Benzo[a]piren [CAS br. 50-32-8]

POSTUPAK

Tretiranje ispitivanom hemikalijom

25. Ćelije koje se razmnožavaju tretiraju se ispitivanom hemikalijom uz prisutnost i odsutnost Sistema metaboličke aktivacije. Izlaganje treba trajati odgovarajuće vrijeme (obično je primjereno od tri do šest sati).

26. Minimalni broj ćelija koje se koriste za svaku ispitnu kulturu (kontrolnu i tretiranu) u svakoj fazi ispitivanja trebao bi se zasnivati na učestalosti pojave spontanih mutanata. Opšta je smjernica tretirati i pasažirati dovoljno ćelija kako bi se održalo deset spontanih mutacija u svakoj kulturi u svim fazama ispitivanja (17.). Učestalost pojave spontanih mutanata iznosi od 5 do 20 × 10-6. Kako bi se postigla učestalost pojave spontanih mutanata od 5 × 10-6 i kako bi se održao dovoljan broj spontanih mutacija (10 ili više) čak i za kulture koje se tretiraju pri koncentracijama koje uzrokuju 90-postotnu citotoksičnost tokom tretiranja (relativna stopa preživljavanja od 10 %), bilo bi potrebno tretirati najmanje 20 × 106 ćelija. Osim toga, mora se kultivisati dovoljan broj ćelija (ali nikad manje od dva milijona) tokom perioda ekspresije i nasaditi radi selekcije mutanata (17.).

Vrijeme fenotipske ekspresije i mjerenje učestalosti pojave mutanata

27. Nakon perioda tretiranja ćelije se kultivišu kako bi se omogućila ekspresija fenotipa mutanata. Obično je dovoljno od sedam do devet dana da bi se omogućila gotovo optimalna fenotipska ekspresija novoindukovanih mutanata Hprta i xprta (43. i 44.). Tokom tog perioda ćelije se moraju redovno supkultivisati kako bi se održao eksponencijalni rast. Nakon fenotipske ekspresije ćelije se ponovno nasađuju u medijumum sa selektivnim agensom (6-tiogvanin) odnosno bez njega kako bi se utvrdili broj mutanata odnosno efikasnost kloniranja u trenutku selekcije. To nasađivanje može se ssprovesti upotrebom zdjelica za jednoslojne kulture ili ploče s mikro bunarima za ćelije u suspenziji. Za selekciju mutanata ćelije bi trebalo nasaditi pri gustini kojom se osigurava optimalna regeneracija mutanata (tj. izbjegava se metabolička saradnja) (17.). Ploče se inkubiraju tokom odgovarajućeg vremenskog perioda za optimalan rast kolonije (npr. od sedam do 12 dana) i kolonije se prebrojavaju. Učestalost pojave mutanata računa se na osnovu broja kolonija mutanata koji se ispravlja efikasnošću kloniranja u trenutku selekcije mutanata (formule vidjeti u Dodatku 2.).

Osposobljenost laboratorijaa

28. Kako bi steklo dovoljno iskustva u izvođenju ispitivanja prije njegove rutinske primjene, laboratorijaa treba da izvede niz eksperimenata s referentnim pozitivnim supstancama koje djeluju putem različitih mehanizama (najmanje jedna aktivna s metaboličkom aktivacijom i jedna aktivna bez metaboličke aktivacije, odabrana s listaa supstanci iz tabele 1.) te s različitim negativnim kontrolama (upotrebom različitih rastvarača/nosača). To se ne primjenjuje na laboratorijae koje imaju bazu podataka o prošlim ispitivanjima kako je utvrđeno u tač od 30. do 33.

29. Izbor supstanci za pozitivnu kontrolu (vidjeti tabelu 1. u tački 25.) trebao bi se ispitati u odsutnosti i prisutnosti metaboličke aktivacije kako bi se dokazala osposobljenost za otkrivanje mutagenih hemikalija, za utvrđivanje efikasnosti sistema metaboličke aktivacije i za dokazivanje primjerenosti uslova za rast ćelija tokom tretiranja, fenotipske ekspresije i selekcije mutanata te postupaka ocjenjivanja. Potrebno je izabrati raspon koncentracija odabranih supstanci pri kojima će doći do ponovljivih povećanja u odnosu na pozadinske vrijednosti, koja su povezana s koncentracijom, kako bi se dokazala osjetljivost i dinamički raspon ispitnog sistema.

Podaci o prošlim kontrolama

30. Laboratorija bi trebao utvrditi:

— raspon i distribuciju prošlih pozitivnih kontrola,

—raspon i distribuciju prošlih negativnih kontrola (netretirane kulture, kontrole s rastvaračem).

31. Pri prvom prikupljanju podataka za distribuciju prošlih negativnih kontrola istovremene negativne kontrole trebale bi biti u skladu s objavljenim podacima o kontrolama (22.). Kako se budu dodavali novi eksperimentalni podaci o distribuciji kontrola, istovremene negativne kontrole trebale bi u idealnom slučaju biti unutar kontrolnih granica od 95 % te distribucije (17., 45. i 46.).

32. Baza podataka o prošlim negativnim kontrolama laboratorija trebala bi u početku obuhvatati najmanje deset eksperimenata, ali bilo bi poželjno da se sastoji od najmanje 20 eksperimenata sprovedenih u uporednim eksperimentalnim uslovima. Laboratorija bi trebala primjenjivati metode za kontrolu kvaliteta, kao što su kontrolni dijagrami (npr. C-dijagrami ili X-stupčasti

dijagrami (47.)), kako bi utvrdili koliko su promjenjivi njihovi podaci o pozitivnim i negativnim kontrolama te dokazali da je u njihovoj laboratoriji metodologija „pod kontrolom" (46.). Dalje preporuke o tome kako uspostaviti i upotrebljavati prošle podatke (npr. kriterijumi za uključivanje podataka u prošle podatke i njihovo izuzimanje iz tih podataka te kriterijumi prihvatljivosti za određeni eksperiment) nalaze se u literaturi (45.).

33. Podaci o negativnim kontrolama trebali bi se sastojati od podataka o učestalosti pojave mutanata u jednoj kulturi ili, po mogućnosti, u ponovljenim kulturama kako je opisano u tač 23. Istovremene negativne kontrole u idealnom bi slučaju trebale biti unutar kontrolnih granica od 95 % distribucije prošlih podataka o negativnim kontrolama koji se nalaze u bazi podataka laboratorija (17., 45. i 46.). Ako se podaci o istovremenim negativnim kontrolama nalaze van kontrolnih granica od 95 %, mogu biti prihvatljivi za uključenje u distribuciju prošlih kontrola pod uslovom da ti podaci nisu ekstremne netipične vrijednosti te da postoje dokazi o tome da je ispitni sistem „pod kontrolom" (vidjeti prethodno navedeno) i da nema tehničke ili ljudske greške.

34. Svaku izmjenu eksperimentnog protokola trebalo bi razmotriti s obzirom na to je li u skladu s postojećim bazama podataka laboratorija o prošlim kontrolama. Svaka veća nesuklađenost trebala bi dovesti do uspostavljanja nove baze podataka o prošlim kontrolama.

PODACI I IZVJEŠTAVANJE

Predstavljanje rezultata

35. Predstavljanje rezultata trebalo bi uključivati sve podatke koji su potrebni za izračunavanje citotoksičnosti (izraženo kao relativna stopa preživljavanja). Podaci za tretirane i kontrolne kulture trebali bi uključivati broj ćelija na kraju tretiranja, broj ćelija nasađenih odmah nakon tretiranja i brojeve kolonija. Relativna stopa preživljavanja za svaku kulturu trebala bi se izraziti kao postotak u odnosu na istovremenu kontrolu s rastvaračem.

36.Predstavljanje rezultata trebalo bi uključivati i sve podatke koji su potrebni za izračunavanje učestalosti pojave mutanata. Podaci za tretirane i kontrolne kulture trebali bi uključivati: (1) broj ćelija nasađenih sa selektivnim agensom i bez njega (kad se ćelije nasađuju radi selekcije mutanata) i (2) broj izbrojanih kolonija na pločama sa selektivnim agensom i bez njega. Učestalost pojave mutanata računa se na osnovu broja kolonija mutanata (na pločama sa selektivnim agensom) koji se ispravlja efikasnošću kloniranja (s ploča bez selektivnog agensa). Učestalost pojave mutanata trebala bi se izraziti kao broj mutiranih ćelija po milijonu vijabilnih ćelija.

37. Potrebno je navesti podatke o pojedinačnim kulturama. Osim toga, sve je podatke potrebno sažeto prikazati u obliku tabele.

Kriterijumi prihvatljivosti

38. Prihvatljivost ispitivanja zasniva se na sljedećim kriterijumima:

- smatra se da je istovremenu negativnu kontrolu prihvatljivo dodati u bazu podataka o prošlim negativnim kontrolama laboratorija kako je opisano u tač 33.,

- istovremene pozitivne kontrole (vidjeti tač 24.) trebale bi indukovati odgovore koji su u skladu s odgovorima generisanima u bazi podataka o prošlim pozitivnim kontrolama i dovesti do statistički značajnog povećanja u odnosu na istovremenu negativnu kontrolu,
- ispitana su dva eksperimentna uslova (tj. s metaboličkom aktivacijom i bez nje) osim ako je jedan doveo do pozitivnog rezultata (vidjeti tač 25.),
- odgovarajući broj ćelija i koncentracija prikladan je za analizu (tač 25., 26. i 19.),
- kriterijumi za izbor najviše koncentracije u skladu su s kriterijumima opisanima u tač 20., 21. i 22.

Ocjenjivanje i tumačenje rezultata

39. Pod uslovom da su ispunjeni svi kriterijumi prihvatljivosti, ispitivana hemikalija smatra se jasno pozitivnom ako u bilo kojem od ispitanih eksperimentnih uslova:

— najmanje pri jednoj ispitnoj koncentraciji zapaženo je statistički značajno povećanje u odnosu na istovremenu negativnu kontrolu,
— odgovarajući test trenda pokazuje da je povećanje povezano s koncentracijom,
— bilo koji od rezultata je izvan distribucije podataka o prošlim negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji; vidjeti tač 33.).

Kad su ispunjeni svi ti uslovi, smatra se da ispitivana hemikalija može indukovati genske mutacije u uzgojenim ćelijama sisara u tom sistemu ispitivanja. Preporuke za najprikladnije statističke metode nalaze se u literaturi (46. i 48.).

40. Pod uslovom da su ispunjeni svi kriterijumi prihvatljivosti, ispitivana hemikalija smatra se jasno negativnom ako u svim ispitanim eksperimentalnim uslovima:

— ni pri jednoj ispitnoj koncentraciji nije zapaženo statistički značajno povećanje u odnosu na istovremenu negativnu kontrolu,
— odgovarajući test trenda pokazuje da nema povećanja povezanog s koncentracijom,
— svi su rezultati u okviru distribucije podataka o prošlim negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji; vidjeti tač 33.).

Tad se smatra da ispitivana hemikalija ne može indukovati genske mutacije u uzgojenim ćelijama sisara u tom sistemu ispitivanja.

41. Jasan pozitivan ili negativan odgovor nije potrebno provjeravati.

42. Ako odgovor nije ni jasno pozitivan ni jasno negativan kako je prethodno opisano ili kako bi se doprinijelo utvrđivanju biološke relevantnosti rezultata, podatke bi trebalo ocjenjivati na osnovu stručnog suda i/ili daljih istraživanja. Moglo bi biti korisno ponoviti eksperiment, eventualno u izmijenjenim eksperimentalnim uslovima (npr. razmak između koncentracija, drugi uslovi metaboličke aktivacije (tj. koncentracija S9 ili porijeklo S9)).

43. U rijetkim slučajevima, čak i nakon dodatnih istraživanja, skup podataka neće omogućiti donošenje zaključka o tome je li rezultat pozitivan ili negativan. Stoga bi se trebalo zaključiti da je odgovor na ispitivanu hemikaliju dvosmislen (tumači se da je jednako vjerovatno da je pozitivan ili negativan).

Izvještaj o ispitivanju

44. Izvještaj o ispitivanju trebalo bi sadržiti sljedeće informacije:

Ispitivana hemikalija:

— izvor, broj serije, rok upotrebe, ako su dostupni,
— stabilnost ispitivane hemikalije, ako je poznata,
— rastvorivost i stabilnost ispitivane hemikalije u rastvaraču, ako su poznate,
— izmjerene vrijednosti za pH, osmolalnost i taloženje u medijumu za uzgoj kulture u koji je dodata ispitivana hemikalija, prema potrebi.

Supstanca s jednim sastojkom:

— fizički izgled, rastvorivost u vodi i druga relevantna fizičko hemijska svojstva,
— hemijske identifikacione oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.

Supstanci s više sastojaka, UVCB supstanci i smješe:

— opis (koliko je to moguće) hemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizičko -khmijskih svojstava sastojaka.

Rastvarač:

- obrazloženje izbora rastvarača,
- postotak rastvarača u konačnom medijumumu za uzgoj kulture.

Ćelije:

Za laboratorijaske glavne kulture:

— vrsta, izvor ćelijskih linija,
— broj pasaža, ako je dostupan, i istorija laboratorija,
— kariotipna svojstva i/ili modalni broj hromosoma,
— metode održavanja ćelijskih kultura,
— odsustvo mikoplazme,
— vremena udvostručivanja ćelija.

Ispitni uslovi:

— obrazloženje za izbor koncentracija i broja kultura, uključujući npr. podatke o citotoksičnosti i ograničenja rastvorivosti,
— sastav medija, koncentracija CO2, nivo vlažnosti,
— koncentracija ispitivane hemikalije izražena kao konačna koncentracija u medijumumu za uzgoj kulture (npr. µg ili mg/ml ili mM medija za uzgoj kulture),
— koncentracija (i/ili volumen) rastvarača i ispitivane hemikalije koji su dodati medijumumu za uzgoj kulture,
— temperatura inkubacije,
— vrijeme inkubacije,
— trajanje tretiranja,

— gustina ćelija za vrijeme tretiranja,
— vrsta i sastav sistema metaboličke aktivacije (izvor S9, metoda pripreme mješavine S9, koncentracija ili volumen mješavine S9 i S9 u konačnom medijumu za uzgoj kulture, kontrole kvaliteta S9), supstanci pozitivne i negativne kontrole, konačne koncentracije za svaki uslov tretiranja,
— dužina perioda ekspresije (uključujući broj nasađenih ćelija te režim uzgoja supkultura i dodavanja hranjivih supstanci, ako je primjereno),
— identitet selektivnog agensa i njegova koncentracija,
— kriterijumi prihvatljivosti ispitivanja,
— metode korišćene za utvrđivanje broja vijabilnih i mutiranih ćelija,
— metode mjerenja citotoksičnosti,
— sve dodatne informacije koje se odnose na citotoksičnost i upotrijebljenu metodu,
— trajanje inkubacije nakon nasađivanja,
— kriterijumi prema kojima se istraživanje smatra pozitivnim, negativnim ili dvosmislenim,
— metode upotrijebljene za određivanje pH-vrijednosti, osmolalnosti i taloženja.

Rezultati:

— broj tretiranih ćelija i broj supkultiviranih ćelija za svaku kulturu,
— mjerenja citotoksičnosti i druga zapažanja, ako postoje,
— znaci taloženja i vrijeme utvrđivanja,
— broj ćelija nasađenih na selektivni i neselektivni medijumum,
— broj kolonija u neselektivnom medijumumu i broj otpornih kolonija u selektivnom medijumumu te povezana učestalost pojave mutanata,
— odnos koncentracije i odgovora, ako je moguće
— podaci o istovremenim negativnim kontrolama (s rastvaračem) i pozitivnim kontrolama (koncentracije i rastvarača),
— podaci o prošlim negativnim kontrolama (s rastvaračem) i prošlim pozitivnim kontrolama, zajedno s rasponima, srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama, interval pouzdanosti (npr. 95 %) te broj podataka,
— statističke analize (za pojedinačne kulture i objedinjena ponavljanja ako je primjereno) i p-vrijednosti, ako postoje.

Rasprava o rezultatima

Zaključak

FORMULE ZA PROCJENU CITOTOKSIČNOSTI I UČESTALOSTI POJAVE MUTANATA

Citotoksičnost se ocjenjuje relativnom stopom preživljavanja, tj. efektivnošću kloniranja ćelija koje se nasade odmah nakon tretiranja, prilagođeno za mogući gubitak ćelija tokom tretiranja, u poređjenju s prilagođenom efektivnošću kloniranja u negativnim kontrolama (kojima se dodjeljuje stopa preživljavanja od 100 %) (vidjeti formulu za relativnu stopu preživljavanja u nastavku).

Prilagođena efikasnost kloniranja za kulturu tretiranu ispitivanom hemikalijom računa se na sljedeći način:

Formula

Relativna stopa preživljavanja za kulturu tretiranu ispitivanom hemikalijom računa se na sljedeći način:

Formula

Učestalost pojave mutanata je efikasnost kloniranja kolonija mutanata u selektivnom medijumu podijeljeno efektivnošću kloniranja u neselektivnom medijumu koja se mjeri za istu kulturu u trenutku selekcije.

Formula

Kad se za efikasnost kloniranja upotrebljavaju ploče:

CE (efikasnost kloniranja) = broj kolonija / broj nasađenih ćelija.

Kad se za efikasnost kloniranja upotrebljavaju ploče s mikroporculanskim tanjirima sa udubljenjima:

broj kolonija po jažici na pločama s mikroporculanskim tanjirima sa udubljenjima slijedi Poissonovu distribuciju,

efikasnost kloniranja = -LnP (0) / broj nasađenih ćelija po jažici,

pri čemu je -LnP (0) vjerojatan broj praznih udubljenja od udubljenja u koje su nasađene ćelije i dobija se sljedećom formulom:

LnP (0) = -Ln (broj praznih udubljenja / broj udubljenja u koje su nasađene ćelije);

B.18. OŠTEĆENJE I REPARACIJA DNK - VANREDNA SINTEZA DNK - ĆELIJE SISARA IN VITRO

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

1.2. Referentne supstance

Referentne supstance nijesu propisane.

1.3. Princip metode

Ispitivanje vanredne sinteze DNK (u daljem tekstu: UDS) mjeri sintezu DNK za reparaciju nakon isjecanja i otklanjanja odsječka DNK koji sadrži region oštećenja koji je izazvan hemijskim i fizičkim agensima. Ispitivanje se zasniva na ugrađivanju timidina obilježenog tricijumom (u daljem tekstu: ^{3}H-TdR) u DNK ćelije sisara koje se ne nalaze u S fazi ćelijskog ciklusa. Aktivno preuzimanje ^{3}H-TdR određuje se autoradiografijom ili tečnim scintilacionim brojanjem (u daljem tekstu: LSC) DNK iz tretiranih ćelija. Ćelije sisara u kulturi, osim ukoliko se ne koriste primarni hepatociti pacova, tretiraju se ispitivanim agensom sa i bez egzogenog sistema metaboličke aktivacije. UDS se mjeri i u in vivo sistemima.

1.4. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta nijesu propisani.

1.5. Opis metode

1.6.1. Preparati

Ispitivane hemikalije i kontrolne ili referentne supstance pripremaju se u podlozi za rast ili se rastvaraju ili suspenduju u odgovarajućim vehikulumima i zatim se dodatno razblažuju u podlozi za rast za upotrebu u eksperimentu. Konačna koncentracija vehikuluma ne utiče na vijabilitet ćelija.

U eseju se koriste primarne kulture hepatocita pacova, ljudskih limfocita ili utvrĐenih ćelijskih linija (npr. ljudski diploidni fibroblasti).

Ćelije izložiti ispitivanoj hemikaliji i u prisustvu i u odsustvu odgovarajućeg sistema metaboličke aktivacije.

1.6.2. Uslovi ispitivanja

1.6.2.1. Broj kultura

Potrebno je najmanje dvije kulture ćelija za autoradiografiju i šest kultura (ili manje ukoliko je to naučno opravdano) za određivanje LSC UDS za svaku eksperimentalnu tačku.

1.6.2.2. Upotreba negativnih i pozitivnih kontrola

U svako ispitivanje su uključene istovremene pozitivne i negativne (netretirane i/ili vehikulum) kontrole, sa i bez metaboličke aktivacije.

Primjeri pozitivnih kontrola za eksperiment sa hepatocitima pacova obuhvataju 7,12-dimetil benzantracen (7,12-DMBA) ili 2-acetil aminofluoren (2-AAF). U slučaju utvrĐenih ćelijskih linija, 4-nitrokvinolin-N-oksid (4-NQO) predstavlja primjer pozitivne kontrole i za autoradiografske i za LSC eseje koji se izvode bez metaboličke aktivacije. N-dimetil nitrozamin je primjer jedinjenja pozitivne kontrole kada se koriste sistemi metaboličke aktivacije.

1.6.2.3. Koncentracije izlaganja

Primjeniti višestruke koncentracije ispitivane supstance u rasponu koji odgovara za definisanje odgovora. Najviša koncentracija izaziva određene citotoksične efekte. Jedinjenja koji su relativno nerastvorna u vodi ispitati do granice rastvorljivosti. U slučaju hemikalija koje su netoksične i dobro rastvorne u vodi, gornja ispitivana koncentracija hemikalije utvrđuje se u zavisnosti od slučaja.

1.6.2.4. Ćelije

Prilikom održavanja kultura primjeniti odgovarajući podlogu za rast, koncentraciju CO_2, temperaturu i vlažnost. UtvrĐene ćelijske linije periodično se provjeravaju na kontaminaciju mikoplazmom.

1.6.2.5. Metabolička aktivacija

Sistem metaboličke aktivacije ne koristi se sa primarnim kulturama hepatocita. Određene ćelijske linije i limfociti izlažu se ispitivanoj supstanci i u prisustvu i u odsustvu odgovarajućeg sistema metaboličke aktivacije.

1.6.3. Postupak

1.6.3.1. Priprema kultura

UtvrĐene ćelijske linije dobijaju se iz "stock", kultura (npr. tripsinizacijom ili otresanjem), zasaĐuju se u posude za kultivisanje pri odgovarajućoj gustini i inkubiraju na temperaturi od 37°C.

Kratkotrajne kulture hepatocita pacova utvrĐuju se omogućavanjem svježe izdvojenim hepatocitima da se u odgovarajućoj podlozi pričvrste za površinu za rast.

Kulture ljudskih limfocita uspostavljaju se korišćenjem odgovarajućih metoda.

1.6.3.2. Tretiranje kultura ispitivanom supstancom

1.6.3.2.1. Primarni hepatociti pacova

Svježe izolovani hepatociti pacova tretiraju se ispitivanom supstancom u podlozi koja sadrži ^{3}HTdR tokom odgovarajućeg vremenskog perioda. Na kraju perioda tretiranja, podlogu odstraniti sa ćelija, koje se nakon toga ispiraju, fiksiraju i suše. Slajdove zatim umočiti u autoradiografsku emulziju (koristi se alternativni tanki film), izložiti, razviti, obojiti i prebrojati.

1.6.3.2.2. UtvrĐene ćelijske linije i limfociti

Autoradiografske tehnike: ćelijske kulture se izlažu ispitivanoj supstanci tokom odgovarajućih vremenskih perioda, nakon čega se tretiraju sa ^{3}H-TdR. Vremenski periodi se određuju u skladu sa prirodom supstance, aktivnosti metaboličkih sistema i vrstom ćelija. Kako bi se otkrio maksimum UDS-a, dodati ^{3}H-TdR, istovrijemeno s ispitivanom supstancom ili tokom nekoliko minuta nakon izlaganja ispitivanoj supstanci. Na izbor jednog od ova dva postupka utiču moguće interakcije ispitivane supstance i ^{3}H-TdR. Kako bi se napravila razlika između UDS i semikonzervativne replikacije DNK, ova druga se može spriječiti, npr. primjenom podloge bez arginina, niskog sadržaja seruma ili hidroksiureom u podlozi za kultivisanje.

LSC mjerenja UDS-a: prije tretiranja ispitivanom supstancom blokirati ulazak ćelija u S-fazu na način kako je gore opisano. Ćelije se zatim izlažu ispitivanoj hemikaliji na način kako je opisano za autoradiografiju. Na kraju perioda inkubacije, DNK se ekstrahuje iz ćelija i određuje se ukupni sadržaj DNK i stepen inkorporacije ^{3}H-TdR.

U slučajevima kada se koriste ljudski limfociti u gore navedenim tehnikama, kod nestimulisanih kultura nije potrebna supresija semi-konzervativne replikacije DNK.

1.6.3.3. Analize

1.6.3.3.1. Autoradiografska određivanja

Prilikom određivanja UDS-a u ćelijama u kulturi ne prebrojavaju se jedra u S-fazi. Prebrojati najmanje 50 ćelija po koncentraciji. Slajdove prije prebrojavanja šifrovati. Na svakom slajdu prebrojiti nekoliko široko razdvojenih nasumičnih polja. Količina inkorporacije ^{3}H-TdR u citoplazmi određuje se prebrojavanjem tri područja veličine nukleusa u citoplazmi svake prebrojane ćelije.

1.6.3.3.2. LSC određivanja

Za LSC UDS određivanja, za svaku koncentraciju, primjenjuje se odgovarajući broj kultura, kao i za kontrolu. Sve rezultate potvrditi u nezavisnom eksperimentu.

2. Podaci

Podaci se navode tabelarno.

2.1. Autoradiografska određivanja

Stepen inkorporacije ^{3}H-TdR u citoplazmi i broj zrna pronaĐenih u jedru ćelije odvojeno se navode.

Za opisivanje raspodjele stepena inkorporacije ^{3}H-TdR u citoplazmi i broja zrna po nukleusu koriste se srednje vrijednosti, medijana i modus.

2.2. LSC određivanja

Određivanja koja se odnose na LSC, inkorporaciju ^{3}H-TdR izraziti kao dpm/µg DNK. Primjeniti srednju vrijednost dpm/µg DNK sa standardnom devijacijom, a kako bi se opisala raspodjela inkorporacije. Podaci se procjenjuju odgovarajućim statističkim metodama.

3. Izvještaj

3.1. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:
- upotrijebljenim ćelijama, gustini i broju prolaza u vrijeme tretiranja, broju kultura ćelija; - metodi primjenjenoj u održavanju ćelijskih kultura, uključujući podlogu, temperaturu i koncentraciju CO_2;
- ispitivanoj supstanci, vehikulumu, koncentraciji i logičkoj osnovi za izbor koncentracija primjenjenih u ispitivanju;
- detaljima o sistemima metaboličke aktivacije;
- rasporedu tretmana;
- pozitivnim i negativnim kontrolama;
- primjenjenoj autoradiografskoj tehnici;
- pokolonama korišćenim za blokiranje ulaska ćelija u S-fazu;

- pokolonama korišćenim za ekstrakciju DNK i utvrĐivanje ukupnog sadržaja DNK u LSC odreĐivanju;
- odnosu doza/odgovor, kada je moguće;
- statističkoj procjeni;
- obrazloženju rezultata; - tumačenju rezultata.

3.2. Procjena i tumačenje rezultata

Procjena i tumačenje rezultata su date u Opšti uvod.

B.19. IN VITRO ISPITIVANJE IZMJENE SESTRINSKIH HROMATIDA

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

1.2. Referentne supstance

Referentne supstane nijesu propisane.

1.3. Princip metode

Ispitivanje izmjene sestrinskih hromatida (u daljem tekstu: SCE) je kratkotrajno ispitivanje namjenjeno otkrivanju meĐusobnih izmjena DNK dvije sestrinske hromatide hromozoma koji se udvostručava. SCE predstavlja izmjenu proizvoda replikacije DNK na naizgled homologim mestima. Postupak razmjene vjerovatno obuhvata prekidanje i ponovno sjedinjavanje DNK, iako se malo zna o njegovoj molekulskoj osnovi. Detekcija SCE-a zahtijeva ulaganje određenog napora u diferencijalno obilježavanje sestrinskih hromatida, što se može postići inkorporacijom bromdeoksiuridina (u daljem tekstu: BrdU) u hromozomsku DNK kroz dva ćelijska ciklusa.

Ćelije sisara in vitro izlažu se ispitivanoj hemikaliji sa i bez sisarskog egzogenog sistema metaboličke aktivacije, ukoliko je svrsishodno i kultivišu se tokom dva kruga replikacije u medijumumu koji sadrži BrdU. Poslije obrade inhibitorom diobnog vretena (npr. kolhicinom) da bi se akumulirale ćelije u stadijumu mitoze koji je sličan metafazi (c-metafaza) ćelije se skupljaju i pripremaju se hromozomski preparati.

1.4. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta nijesu propisani.

1.5. Opis metode

1.6.1. Preparati

U ispitivanju se koriste primarne kulture (ljudski limfociti) ili određene ćelijske linije (npr. ćelije ovarijuma kineskog hrčka). Ćelijske linije provjeriti na kontaminaciju mikoplazmom,

Primjeniti odgovarajući medijumum za kulture i uslovi inkubacije (npr. temperatura, posude za kulture, koncentracija CO_2 i vlažnost).

Ispitivane supstance se pripreme u medijumumu kulture ili da se rastvore ili suspenduju u odgovarajućim vehikulumima prije tretiranja ćelija. Konačna koncentracija vehikuluma u sistemu kulture ne utiče u znatnoj mjeri na vijabilitet ćelija ili stepen rasta. Uticaj na učestalost SCE-a pratiti putem kontrole rastvarača.

Ćelije su izložene ispitivanoj supstanci u prisustvu i u odsustvu sisarskog egzogenog sistema metaboličke aktivacije. Alternativno, u slučajevima kada se koriste tipovi ćelija s intrinzičnom metaboličkom aktivnošću, obim i priroda aktivnosti odgovaraju klasi hemikalije koja se ispituje.

1.6.2. Uslovi ispitivanja

1.6.2.1. Broj kultura

Za svaku tačku ispitivanja primjeniti najmanje dvije kulture.

1.6.2.2. Primjena pozitivnih i negativnih kontrola

U svaki eksperiment su uključene pozitivne kontrole i to primjenom jedinjenja direktnog dejstva, kao i jedinjenja koje zahtijeva metaboličku aktivaciju. Primjenjuje se i kontrola vehikuluma.

Supstance koje se primjenjuju kao pozitivne kontrole:

- jedinjenje direktnog djelovanja;
- etil-metansulfonat;
- jedinjenje indirektnog djelovanja; - ciklofosfamid.

Kada je primjereno, u ispitivanje se uključuju dodatna pozitivna kontrola iste hemijske klase kojoj pripada i hemikalija koja se ispituje.

1.6.2.3. Koncentracije izlaganja

Primjeni bar tri odgovarajuće raspoređene koncentracije ispitivane supstance. Najviša koncentracija izaziva značajan toksični efekt, ali pri tome omogućava odgovarajuću replikaciju ćelija. Supstance koje su relativno nerastvorljive u vodi ispitati do granice rastvorljivisti uz primjenu odgovarajućih postupaka. U slučaju supstanci koje su slobodno rastvorljive u vodi i nisu toksične, gornja koncentracija ispitivane supstance utvrđuje se od slučaja do slučaja.

1.6.3. Postupak

1.6.3.1. Priprema kultura

Utvrđene ćelijske linije dobijaju se iz postojećih ("stock") kultura (npr. tripsinizacijom ili otresanjem), zasijavaju se u posude za kulture na odgovarajućoj gustini i inkubiraju na temperaturi od 37°C. Za jednoslojne kulture prilagoditi broj ćelija po posudi, tako da kulture u vrijeme skupljanja ne budu konfluentne mnogo više od 50%. Alternativno, mogu se primjenjivati

ćelije u kulturi u obliku suspenzije. Kulture ljudskih limfocita dobijaju se iz heparinizirane krvi odgovarajućim tehnikama i inkubiraju se na temperaturi od 37°C.

1.6.3.2. Tretiranje

Ćelije koje se nalaze u eksponencijalnom stadijumu rasta izlažu se ispitivanoj supstanci u odgovarajućem vremenskom periodu. U većini slučajeva jedan do dva sata može da bude djelotvorno, ali je u određenim situacijama moguće produžiti vrijeme tretiranja do dva cijela ćelijska ciklusa. Ćelije bez dovoljne intrinzične (sopstvene) metaboličke aktivnosti izlagati ispitivanoj hemikaliji u prisustvu i odsustvu odgovarajućeg sistema metaboličke aktivacije. Po završetku perioda izlaganja sa ćelija se ispiraju ostaci ispitivane supstance pa se iste kultivišu tokom dva kruga replikacije u prisustvu BrdU. Kao alternativa se primjenjuje postupak tokom kog se ćelije istovrijemeno izlažu ispitivanoj hemikaliji i BrdU tokom čitavog vremena kultivisanja od dva ćelijska ciklusa.

Kulture ljudskih limfocita tretiraju se dok se nalaze u polusinhronom stanju.

Analiza ćelija obavlja se tokom njihove druge deobe poslije tretmana, kako bi se obezbjedilo da najosjetljivi stadijumi ćelijskog ciklusa budu izloženi hemikaliji. Sa svim kulturama kojima se dodaje BrdU rukuje se u mraku ili uz prigušenu svijetlost inkandescentnih lampi, sve do skupljanja ćelija, kako bi se fotoliza DNK koji sadrži BrdU svela na najmanju mjeru.

1.6.3.3. Skupljanje ćelija

Ćelijske kulture tretiraju se inhibitorom diobnog vretena (npr. kolhicinom) jedan do četiri sata prije skupljanja. Ćelije svake kulture ubiraju se i obrađuju odvojeno za preparate hromozoma.

1.6.3.4. Preparati i bojenje hromozoma

Hromozomski preparati pripremaju se primjenom standardnih citogenetskih tehnika. Bojenje slajdova, kako bi se prikazali SCE, se izvedi pomoću nekoliko tehnika (npr. fluorescencija plus Giemsa metoda).

1.6.4. Analiza

Broj analiziranih ćelija se zasniva na spontanoj kontrolnoj učestalosti SCE. Obično se za SCE analizira najmanje 25 dobro rasprostranjenih metafaza po kulturi. Slajdovi se prije analize šifriraju. Kod ljudskih limfocita analiziraju se samo metafaze koje sadrže 46 centromera. Kod utvrđenih ćelijskih linija analiziraju se samo metafaze koje sadrže ± 2 centrodnose modalnog broja. Navodi se da li se centrodnosna zamjena oznake vrednuje kao SCE. Rezultati se potvrđuju u nezavisnom ispitivanju.

2. Podaci

Podaci se navode tabelarno. Broj SCE za svaku metafazu i broj SCE po hromozomu za svaku metafazu navode se odvojeno za sve tretirane i kontrolne kulture.

Podaci se procjenjuju korišćenjem odgovarajućih statističkih metoda.

3. Izvještaj

3.1. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:
- upotrijebljenim ćelijama, metodama održavanja ćelijske kulture;
- uslovima ispitivanja: sastav medijumuma, koncentracija CO_2, koncentracija ispitivane supstance, korišćeni vehikulum, temperatura inkubacije, vrijeme tretiranja, korišćeni inhibitor diobnog vretena, njegova koncentracija i trajanje tretmana istim, vrsta korišćenog sisarskog sistema aktivacije, pozitivne i negativne kontrole; - broju ćelijskih kultura po tački ispitivanja;
- detaljima tehnike korišćene za pripremu slajdova;
- broju analiziranih metafaza (podaci se navode odvojeno za svaku kulturu);
- prosječnom broju SCE po ćeliji i po hromozomu (podaci se navode odvojeno za svaku kulturu); - kriterijumima za vrednovanje SCE;
- logičkoj osnovi za izbor doze;
- odnosu doza/odgovor, ako je primjenjivo;
- statističkoj procjeni; - obrazloženju rezultata; - tumačenju rezultata.

3.2. Procjena i tumačenje rezultata

Procjena i tumačenje rezultata dati su u Opšti uvod.

B.20. ISPITIVANJE RECESIVNE LETALNOSTI VEZANE ZA POL NA DROSOPHILA-e MELANOGASTER

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

1.2. Referentne supstance

Referenten supstance nijesu propisane.

1.3. Princip metode

Ispitivanjem recesivne letalnosti vezane za pol (u daljem tekstu: SLRL) kod Drosophila-e melanogaster otkriva se pojava mutacija, uključujući i tačkaste mutacije i male delecije, u polnoj lozi insekta. Navedeno ispitivanje je analiza napredne mutacije, koja je sposobna za skrining mutacija na oko 800 lokusa (genskih mjesta) na hromozomu X; što čini oko 80% svih lokusa hromozoma X. Hromozom X predstavlja približno jednu petinu čitavog haploidnog genoma.

Mutacije u hromozomu X Drosophila-e melanogaster fenotipski su izražene kod mužjaka koji nose mutirani gen. Kad je mutacija letalna u hemizigotnim uslovima, o njenom postojanju se zaključuje na osnovu izostanka jedne kategorije muških potomaka od dvije kategorije koje normalno iznese heterozigotna ženka. SLRL ispitivanje koristi navedene činjenice pomoću posebno označenih i raspoređenih hromozoma.

1.4. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta nijesu propisani.

1.5. Opis metode

1.5.1. Pripreme

1.5.1.1. Kulture soja

Primjenjuju se mužjaci kvalitetno definisane kulture soja divljeg tipa i ženki kulture soja Myller-5. Upotrebljavaju se i ostale, dobro označene, ženske kulture soja s višestrukim invertiranim hromozomima X.

1.5.1.2. Ispitivana supstanca

Ispitivane supstance rastvoriti u vodi. Supstance koje su nerastvorljive u vodi rastvaraju se ili suspenduju u odgovarajućem vehikulumu (npr. smješi etanola i Tween-a 60 ili 80), a zatim prije primjene se razblažuju u vodi ili rastvoru soli. Dimetilsulfoksid (u daljem tekstu: DMSO) izbjegavati kao medijumum.

1.5.1.3. Broj životinja

Ispitivanje je osmišljeno tako da ima unaprijed određenu osjetljivost i snagu. Učestalost spontanih mutacija, koja bude primjećena u odgovarajućem kontrolnom uzorku, u značajnoj mjeri utiče na broj tretiranih hromozoma koji se analiziraju.

1.5.1.4. Put primjene

Izlaganje može biti: oralnim putem, putem injekcije ili izlaganje gasovima ili parama. Ispitivana supstanca daje se i u rastvoru šećera. Kada je neophodno, materija se rastvora u 0,7% rastvoru NaCl i ubrizgava se u grudni koš ili abdomen.

1.5.1.5. Primjena pozitivnih i negativnih kontrola

Neophodno je uključiti negativne (vehikulum) i pozitivne kontrole. Ukoliko postoje odgovarajući laboratorijaski podaci iz prethodnih ispitivanja, nisu potrebne istovremene kontrole.

1.5.1.6. Nivoi izlaganja

Primjenjuju se tri nivoa izlaganja. Za preliminarnu procjenu primjenjuje se jedan nivo izlaganja ispitivanoj supstanci, s tim da je navedeni nivo izlaganja ili maksimalna tolerisana koncentracija ili ona koncentracija pri kojoj nastaju neki znaci toksičnosti. Za netoksične materije potrebno je izlaganje maksimalno mogućoj koncentraciji.

1.5.2. Postupak

Mužjaci divljeg tipa (stari tri do pet dana) tretiraju se ispitivanom supstancom i pojedinačno pare s velikim brojem nevinih ženki kulture soja Myller-5 ili druge kulture soja, označenim (višestrukim invertiranim hromozomima X) na odgovarajući način. Ženke se zamjenjuju novim nevinim ženkama svaka dva do tri dana kako bi se obuhvatio čitav ciklus polne ćelije. Potomci navedenih ženki provjeravaju se na postojanje letalnih efekta koji odgovaraju efektima na

zrelom spermatozoidu, spermatidima u srednjoj ili kasnoj fazi, spermatidima u ranoj fazi, spermatocitima i spermatogonijima u vrijeme tretiranja ispitivanom supstancom.

Heterozigotnim F_1 ženkama, dobijenima navedenim ukrštanjem, dopušteno je da se pojedinačno pare (tj. jedna ženka po bočici) sa svojom braćom. U F_2 generaciji svaka se kultura provjerava na odsustvo mužjaka divljeg tipa. Ukoliko se dogodi da kultura potiče od F_1 ženke koja je nosilac smrtnosti u roditeljskom hromozomu X (tj. nije primjećen nijedan mužjak s tretiranim hromozomom), kćeri ženke s istim genotipom obavezno ispitati kako bi se utvrdilo da li se smrtnost ponavlja u narednoj generaciji.

2. Podaci

Podaci se navode u tablearnom obliku kako bi se prikazao broj ispitanih hromozoma X, broj neplodnih mužjaka i broj letalnih hromozoma pri svakoj koncentraciji izlaganja i za svaki period parenja za svakog tretiranog mužjaka. Navode se i brojevi grupa (klastera) različitih veličina po svakom mužjaku. Dobijene rezultate potvrditi u posebnom ispitivanju.

Prilikom procjene ispitivanja recesivne letalnosti vezane za pol primjenjuju se odgovarajuće statističke metode. Grupisanje recesivnih smrtnih ishoda koji potiču od jednoga mužjaka razmatra se i procjenjuje odgovarajućom statističkom metodom.

3. Izvještaj

3.1. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:
- kulturi soja: korišćene kulture soja ili sojevi Drosophila-e, starost insekata, broj tretiranih mužjaka, broj sterilnih mužjaka, broj utvrĐenih F2 kultura, broj F2 kultura bez potomstva, broj hromozoma nosilaca letala koji su primjećeni pri svakome stadijumu polne ćelije;
- kriterijumima za utvrĐivanje veličine tretiranih grupa;
- uslovima ispitivanja, detaljan opis plana tretiranja i uzorkovanja, nivoe izlaganja, podatke o toksičnosti, negativne (rastvarač) i pozitivne kontrole, zavisno od konkretnog slučaja;
- kriterijumima za bilježenje letalnih mutacija;
- odnosu izloženost/efekat, gde je moguće;
- procjeni podataka;
- obrazloženju rezultata;
- tumačenju rezultata.

3.2. Procjena i tumačenje rezultata

Procjena i tumačenje rezultata su dati u Opšti uvod.

B.21. IN VITRO ISPITIVANJA TRANSFORMACIJE ĆELIJA SISARA

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

1.2. Referentne supstance

Referentne supstance nijesu propisane.

1.3. Princip metode

Kulture ćelija sisara se koriste za otkrivanje fenotipskih promjena in vitro izazvanih hemijskim supstancama koje su povezane s malignom transformacijom in vivo. MeĐu ćelije koje se najviše primjenjuju spadaju: C3H10$T_{1/2}$, 3T3, SHE i ćelije pacova Fischer soja, dok se ispitivanja oslanjaju na promjene u morfologiji ćelije, formiranju fokusa ili promjene u zavisnosti od pričvršćivanja u polučvrstom agaru. Postoje i kulture ćelija koje se reĐe koriste, a koje otkrivaju druge fiziološke ili morfološke promjene u ćelijama poslije izlaganja karcinogenim hemikalijama. Nijedna od in vitro krajnjih tačaka ispitivanja nema utvrĐenu mehanističku vezu s rakom. Neke od kultura ćelija detektuju promotere tumora. Citotoksičnost se utvrđuje mjerenjem efekta ispitivanog materijala na sposobnosti formiranja kolonija (efikasnost kloniranja) ili stepjene rasta kultura. Mjerenje citotoksičnosti služi da se utvrdi da je izlaganje ispitivanoj hemikaliji bilo toksikološki relevantno, ali se ne upotrebljava za iizračunavanje transformacije: učestalosti kod svih analiza s obzirom da neke od njih mogu da uključuju produženu inkubaciju i/ili subkultivisanje.

1.4. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta nijesu propisani.

1.5. Opis metode

1.5.1. Pripreme

1.6.1.1. Ćelije

U zavisnosti od vrste ispitivanja transformacije koja se koristi, dostupne su različite ćelijske linije ili primarne ćelije. Ispitivač je dužan da se pobrine da se kod ćelija koje se koriste u ispitivanju poslije izlaganja poznatim karcinogenima pokaže odgovarajuća promjena u fenotipu, kao i da se pobrine za to da je ispitivanje, u laboratorijai ispitivača, dokazanog i dokumentovanog kvaliteta i pouzdanosti.

1.6.1.2. Medijumum

Neophodno je da se koristi medijumum i eksperimentalni uslovi koji odgovaraju obliku ispitivanja transformacije koji se koristi.

1.6.1.3. Ispitivana supstanca

Ispitivane supstance se pripremaju u medijumumu kulture ili da se rastvore ili suspenduju u odgovarajućim vehikulumima prije tretiranja ćelija. Konačna koncentracija vehikuluma u sistemu kulture ne utiče na vijabilitet ćelija, stepen rasta ili učestalost transformacija.

1.6.1.4. Metabolička aktivacija

Ćelije su izložene ispitivanoj supstanci u prisustvu i u odsustvu odgovarajućeg sistema metaboličke aktivacije. Alternativno, kada se koriste tipovi ćelija sa intrinzičnom (sopstvenom) metaboličkom aktivnošću, priroda aktivnosti odgovara kategoriji (klasi) hemikalije koja se ispituje.

1.6.2. Uslovi ispitivanja

1.6.2.1. Primjena pozitivnih i negativnih kontrola

U svako ispitivanje uključene su pozitivne kontrole i to primjenom jedinjenja direktnog djelovanja, kao i jedinjenja koje zahtijeva metaboličku aktivaciju. Neophodno je primjeniti i negativne kontrole (vehikuluma).

Supstance koje se mogu primjeniti kao pozitivne kontrole su:

a) Hemikalije direktnog djelovanja: - etil metansulfonat; - β propiolakton.
b) Jedinjenja koji zahtijevaju metaboličku aktivaciju:

- 2- acetil aminofluoren; - 4-dimetilaminoazobenze; - 7,12-dimetilbenz[a]antracen.

Kad je primjereno, u ispitivanje se uključuje dodatna pozitivna kontrola iste hemijske kategorije kojoj pripada i jedinjenje koji se ispituje.

1.6.2.2. Koncentracije izlaganja

Neophodno je da se primjeni nekoliko koncentracija ispitivane supstance. Navedene koncentracije izazivaju toksične efekte zavisne od koncentracije, pri čemu najviša koncentracija uzrokuje nizak stepen preživljenja, dok je preživljenje kod najniže koncentracije slično onome kod negativne kontrole. Supstance koje su relativno nerastvorljive u vodi ispitati do granice rastvorljivosti, uz primjenu odgovarajućih postupaka. U slučaju supstanci koje su netoksične i dobro rastvorljive u vodi, gornja koncentracija ispitivane supstance utvrđuje se posebno za svaki pojedinačni slučaj.

1.6.3. Postupak

Postoji nekoliko planova za izvoĐenje postupka. Najviše se primjenjuje doziranje ispitivane supstance u obliku jednokratne primjene. Primjenjuju se i drugi planovi tretiranja.

Pojedini mužjaci se sekvencijalno pare s jednom ili dvije netretirane nevine ženke u odgovarajućim vremenskim intervalima poslije tretiranja ispitivanom supstancom. Ženke ostaviti zajedno s mužjacima tokom najmanje jednog estrusnog ciklusa ili dok ne doĐe do parenja koje se utvrđuje prema prisutnosti sperme u vagini ili prema postojanju vaginalnog "čepa".

Broj parenja poslije tretiranja rukovodi se planom tretiranja i obezbjeđuje uzorkovanje svih stadijuma polnih ćelije poslije tretiranja.

Ženke se žrtvuju u drugoj polovini graviditeta i pregleda se sadržaj materice kako bi se utvrdio broj živih i mrtvih implanta. Pregledaju se i jajnici kako bi se utvrdio broj žutih tijela.

2. Podaci

Podaci se navode tabelarno kako bi se prikazao broj mužjaka, broj gravidnih ženki i broj negravidnih ženki. Rezultati svakoga parenja, uključujući identitet svakog mužjaka i ženke, navode se pojedinačno. Zabilježiti nedelju parenja za svaku ženku, veličinu doze koju su primili mužjaci, kao i učestalosti pojave živih i mrtvih implanta.

Iizračunavanje ukupnog efekta dominantne letalnosti zasniva se na poreĐenju živih implanta po svakoj ženki u ispitivanoj grupi sa živim implantima po svakoj ženki u kontrolnoj grupi. Odnos mrtvih i živih implanta iz tretirane grupe u poreĐenju sa odnosom u kontrolnoj grupi analizira se kako bi se pokazao postimplantacioni gubitak.

Ukoliko se podaci navode u obliku ranih i kasnih smrti, u tabelama to jasno naznačiti. Navodi se i predimplantacioni gubitak, ukoliko je procjenjen. Predimplantacioni gubitak se iizračunava kao razlika između broja žutih tijela i broja implanta ili kao smanjenje prosječnog broja implanta po materici, a u poreĐenju sa kontrolnim parenjima.

Podaci se procjenjuju primjenom odgovarajućih statističkih metoda.

3. Izvještaj

3.1. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:
- životinjskoj vrsti, soju, starosti i tjelesnoj masi korišćenih životinja, broju životinja svakoga pola u eksperimentalnim i kontrolnim grupama;
- ispitivanoj supstanci, medijumumu, ispitanim nivoima doza i logičkoj osnovi za izbor doza, negativnoj i pozitivnoj kontroli, toksičnosti;
- putu i planu primjene;

- rasporedu parenja;
- metodama koje su korišćene da bi se utvrdilo da je došlo do parenja;
- vremenu žrtvovanja;
- kriterijumima bilježenja dominantnih letala;
- odnosu doza/efekat, ako je primjenjivo;
- statističkoj procjeni; - obrazloženju rezultata; - tumačenju rezultata.

3.2. Procjena i tumačenje rezultata

Procjena i tumačenje rezultata su dati u Opšti uvod.

B.22. ISPITIVANJE DOMINANTNIH LETALNIH GENA NA GLODARIMA

UVOD

1.Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 478 (2016.). Ispitne metode periodično se preispituju uzimajući u obzir naučni napred, promjene regulatornih potreba i razmatranja o dobrobiti životinja. U ovoj izmijenjenoj verziji ispitne metode uzima se u obzir više od trideset godina iskustva s tim ispitivanjem i mogućnost integrisanja ili kombinovanja tog ispitivanja s drugim ispitivanjima toksičnosti kao što su razvojne studije ili studije reproduktivne toksičnosti ili genotoksičnosti; međutim, zbog njegovih ograničenja i upotrebe velikog broja životinja, ovo ispitivanje nije namijenjeno za upotrebu kao primarna metoda, već kao dodatna ispitna metoda koja se može upotrebljavati samo ako ne postoji alternativa za regulatorne zahtjeve. Kombinovanjem ispitivanja toksičnosti stvara se mogućnost da se u ispitivanjima toksičnosti ne upotrijebi mnogo životinja. OECD je sastavio dokument u kojem se daju sažete informacije o ispitivanju u području genetske toksikologije te pregled novijih promjena smjernica OECD-a za ispitivanje genotoksičnosti (1.).

2. Svrha je ispitivanja dominantnih letalnih gena ispitati uzrokuju li hemikalije mutacije koje su posljedica hromozomskih aberacija polnih ćelija. Osim toga, ispitivanje dominantnih letalnih gena relevantano je za ocjenu genotoksičnosti jer, iako se mogu razlikovati među vrstama, faktori in vivo metabolizma, farmakokinetika i procesi popravka DNK aktivni su i doprinose odgovorima. Indukcija mutacije dominantnih letalnih gena nakon izlaganja ispitivanoj hemikaliji ukazuje na činjenicu da je hemikalija djelovala na zametno tkivo ispitne životinje.

3. Mutacije dominantnih letalnih gena uzrokuju embrionalnu ili fetalnu smrt. Indukcija mutacije dominantnih letalnih gena nakon izlaganja ispitivanoj hemikaliji ukazuje na činjenicu da je hemikalija djelovala na zametne ćelije ispitne životinje.

4. Test dominantnih letalnih gena koristan je kao potvrda pozitivnih rezultata ispitivanja u kojima se upotrebljavaju somatske in vivo krajnje tačke te je relevantna krajnja tačka za predviđanje rizika po ljude i rizika od genetskih bolesti koje se prenose zametnom lozom. Međutim, za taj je test potrebno mnogo životinja i sati rada; stoga je i vrlo skup te dugo traje. Budući da je spontana učestalost mutacija dominantnih letalnih gena prilično velika, osjetljivost testa za otkrivanje malih povećanja učestalosti mutacija uopšteno je ograničena.

POČETNA RAZMATRANJA

6.Ispitivanje se najčešće sprovodi na miševima (2., 3. i 4.), ali u određenim slučajevima mogu biti primjerene i druge vrste, ako je to naučno opravdano. Dominantni letalni geni obično su rezultat velikih hromozomskih aberacija (strukturnih i numeričkih abnormalnosti) (9., 10. i 11.), ali ne mogu se isključiti genske mutacije. Mutacija dominantnih letalnih gena je mutacija do koje dolazi u polnoj ćeliji automatski ili se fiksira nakon oplodnje u ranoj fazi embrija, a ne uzrokuje disfunkciju gamete, ali je smrtonosna za oplođeno jajašce ili embrijum u razvoju.

7. Svaki se mužjak u odgovarajućim vremenskim intervalima uzastopno pari sa ženkama koje se prethodno nisu parile. Broj parenja nakon tretiranja zavisi o krajnjoj svrsi istraživanja dominantnih letalnih gena i trebao bi osigurati da se sve faze sazrijevanja polnih ćelija mužjaka ocijene u pogledu dominantnih letalnih gena (12.).

8. Ako postoje dokazi da ispitivana hemikalija ili njeni metaboliti neće dospjeti do testisa, ovaj oblik ispitivanja nije prikladan.

NAČELO ISPITIVANJA

9. Obično se mužjaci izlažu ispitivanoj hemikaliji prikladnim načinom izlaganja te se pare s netretiranim ženkama koje se prethodno nisu parile. Različite vrste polnih ćelija mogu se ispitati primjenom uzastopnih intervala parenja. Nakon parenja ženke se nakon odgovarajućeg perioda eutanaziraju i njihove se maternice pregledavaju kako bi se utvrdio broj implantata te živih i mrtvih embrija. Dominantno letalno djelovanje ispitivane hemikalije utvrđuje se usporedbom živih implantata po ženki u tretiranoj grupi sa živim implantatima po ženki u kontrolnoj grupi s nosačem/rastvaračem. Povećanje broja mrtvih implantata po ženki u tretiranoj grupi u odnosu na broj mrtvih implantata po ženki u kontrolnoj grupi odražava postimplantacijski gubitak indukujen ispitivanom hemikalijom. Postimplantacijski gubitak računa se utvrđivanjem odnosa mrtvih implantata u odnosu na njihov ukupan broj u tretiranoj grupi u poređjenju s odnosom mrtvih implantata u odnosu na njihov ukupan broj u kontrolnoj grupi. Predimplantacijski gubitak može se procijeniti usporedbom broja žutih tijela umanjenog za ukupan broj implantata ili ukupnog broja implantata po ženki u tretiranoj i kontrolnoj grupi.

PROVJERA OSPOSOBLJENOSTI LABORATORIJA

10.Osposobljenost za primjedbu ovog ispitivanja trebalo bi utvrditi dokazivanjem sposobnosti reprodukovanja učestalosti pojave mutacija dominantnih letalnih gena na osnovu objavljenih podataka (npr. 13., 14., 15., 16., 17. i 18.) s supstancima za pozitivnu kontrolu (uključujući slabe odgovore) kao što su one navedene u tabeli 1., i kontrolama s nosačem te postizanja učestalosti u negativnim kontrolama koje su u skladu s prihvatljivim rasponom podataka (vidjeti prethodna upućivanja) ili distribucijom proslih kontrola laboratorija, ako su dostupni.

OPIS METODE

Pripreme

Izbor životinjske vrste

11.Trebalo bi upotrebljavati zdrave, polno zrele životinje sojeva koji se obično upotrebljavaju u laboratorijskim istraživanjima. Obično se upotrebljavaju miševi. Moguća je upotreba bilo koje druge prikladne vrste sisara ako je to naučno opravdano u izvješću.

Uslovi smještaja i hranjenja životinja

12.U slučaju glodara, temperatura prostorije u kojoj se drže životinje trebala bi biti 22 °C (±3 °C). Iako bi u idealnim okolnostima relativna vlažnost trebala biti 50–60 %, ona bi trebala biti najmanje 40 %, a poželjno je da ne prelazi 70 %, osim tokom čišćenja prostorije. Rasvjeta bi trebala biti vještačka uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Za hranjenje se može upotrebljavati konvencionalna laboratorijska hrana uz neograničenu količinu vode za piće. Kad se ispitivana hemikalija primjenjuje ovim načinom izlaganja, na izbor prehrane može uticati potreba da se osigura odgovarajuća primjesa ispitivane hemikalije. Prije tretiranja ili parenja glodavce bi trebalo držati u malim grupama (najviše pet) istog pola ako se ne očekuje ili ne uoči agresivno ponašanje, po mogućnosti u čvrstim kavezima s primjereno obogaćenim životna sredinaem. Ako je to naučno opravdano, životinje se mogu držati u posebnim prostorijama.

Priprema životinja

13.Zdrave, polno zrele mužjake i ženke nasumce se raspoređuje u kontrolne grupe i grupe za tretiranje. Pojedinačne životinje označavaju se na jedinstven način upotrebom humane, najmanje invazivne metode (npr. prstenovanjem, stavljanjem oznaka, mikročipovanjem ili biometrijskom identifikacijom, ali ne rezanjem prsta i uha) i prilagođavaju laboratorijskim uslovima najmanje pet dana. Kaveze bi trebalo rasporediti tako da se efekti do kojih bi moglo doći zbog položaja kaveza svedu na minimum. Trebalo bi izbjegavati unakrsnu kontaminaciju pozitivnom kontrolom i ispitivanom hemikalijom. Na početku istraživanja razlike u tjelesnoj masi životinja trebale bi biti minimalne i ne bi trebale prelaziti ±20 % srednje vrijednosti mase svakog pola.

Priprema doza

14.Prije nego što se doza daje životinjama, čvrste ispitivane supstanci po potrebi treba rastvoriti ili suspendovati u odgovarajućim rastvaračima ili nosačima ili dodati hrani ili vodi za piće. Tečno ispitivane hemikalije mogu se dozirati direktno ili razrijediti prije doziranja. Za potrebe inhaliranja, ispitivane hemikalije mogu se primijeniti u obliku gasa, pare ili čvrstog/tečnog aerosola, u zavisnosti od fizičko -hemijskih svojstava. Ako prema podacima o stabilnosti skladištenje nije prihvatljivo i ako nisu utvrđeni prikladni uslovi skladištenja, preparate ispitivane hemikalije trebalo bi upotrebljavati svježe.

Ispitni uslovi

Rastvarač/nosač

15. Pri upotrijebljenom volumenu doze rastvarač/nosač ne smije imati toksične efekte i ne smije postojati sumnja da bi mogao hemijski reagovati s ispitivanom supstancom. Ako se upotrebljavaju rastvori/nosači koji nisu dobro poznati, njihovo uključivanje u ispitivanje trebalo bi potkrijepiti referentnim podacima kojima se dokazuje njihova usklađenost. Kad je god moguće, preporučuje se najprije razmotriti mogućnost primjene vodenog rastvarača/nosača. Primjeri uobičajeno korištenih usklađenih rastvaračaa/nosača uključuju vodu, fiziološki rastvor, rastvor metil-celuloze, rastvor natrijumove soli karboksimetilne celuloze, maslinovo ulje i kukuruzno ulje.

Pozitivne kontrole

16. Uvijek bi se trebale upotrebljavati životinje istovremenih pozitivnih kontrola, osim ako je laboratorija dokazala osposobljenost za primjenu ispitivanja te je u nedavnoj prošlosti rutinski upotrebljavao ispitivanje (npr. u posljednjih pet godina). Međutim, životinje pozitivnih kontrola nije potrebno tretirati istim putem izlaganja kao životinje koje primaju ispitivanu hemikaliju ili uzimati uzorke u svim intervalima parenja. Za supstancu za pozitivnu kontrolu trebalo bi biti poznato da proizvode dominantne letalne gene u uslovima koji se upotrebljavaju za ispitivanje. Izuzimajući tretiranje, sa životinjama u kontrolnim grupama treba postupati jednako kao sa životinjama u tretiranim grupama.

17. Doze supstanci za pozitivnu kontrolu trebale bi se odabrati tako da proizvode slabe ili umjerene efekte kojima se kritički procjenjuju uspješnost i osjetljivost ispitivanja, ali da dosljedno dovode do pozitivnih dominantno letalnih efekata. Primjeri supstanci za pozitivnu kontrolu i primjerene doze navedeni su u tabeli 1.

Tabela 1. **Primjeri supstanci za pozitivnu kontrolu**

Supstanca [CAS br.] (referentni br.)	**Raspon efektivnih doza (mg/kg) (vrsta glodara)**	**Trajanje primjene (u danima)**
Trietilenmelamin [51-18-3] (15.)	0,25 (miševi)	1
Ciklofosfamid [50-18-0] (19.)	50–150 (miševi)	5
Ciklofosfamid [50-18-0] (5.)	25–100 (pacovi)	1
Etil metansulfonat [62-50-0] (13.)	100–300 (miševi)	5
Monomerni akrilamid [79-06-1] (17.)	50 (miševi)	5
Hlorambucil [305-03-3] (14.)	25 (miševi)	1

Negativne kontrole

18. Životinje negativne kontrole, koje se tretiraju samo s rastvaračem ili nosačem i koje su osim toga tretirane na jednak način kao i grupe za tretiranje, trebale bi biti uključene u svako vrijeme uzorkovanja (20.). Ako ne postoje prošli ili objavljeni kontrolni podaci kojima se dokazuje da odabrano rastvarač ili nosač ne indukuje dominantne letalne gene ili druge štetne efekte, netretirane kontrolne životinje također bi trebale biti uključene u svako vrijeme uzorkovanja kako bi se utvrdila prihvatljivost kontrole s nosačem.

POSTUPAK

Broj životinja

19. Svaki se mužjak u odgovarajućim unaprijed utvrđenim vremenskim intervalima (npr. u nedeljnim intervalima) uzastopno pari, po mogućnosti s jednom ženkom koja se prethodno nije parila. Broj mužjaka po grupi treba unaprijed utvrditi kako bi bio dovoljan (u kombinaciji s brojem parenih ženki u svakom intervalu parenja) za osiguravanje statističke snage potrebne kako bi se otkrilo barem udvostručenje učestalosti pojave dominantnih letalnih gena.

20. Broj ženki po intervalu parenja isto treba unaprijed utvrditi izračunavanjem statističke snage kako bi se omogućilo otkrivanje barem udvostručenja učestalosti pojave dominantnih letalnih

gena (tj. dovoljan broj gravidnih ženki kako bi se ukupno dobilo najmanje 400 implantata) i tako da se očekuje najmanje jedan mrtvi implantat po jedinici analize (tj. grupi parenja po dozi).

Period primjene i intervali parenja

21. Broj intervala parenja koji slijedi nakon tretiranja određen je režimom tretiranja i trebao bi osigurati ocjenjivanje svih faza sazrijevanja polnih ćelija mužjaka u pogledu indukovanja dominantnih letalnih gena. Kod jednog tretiranja u kojem se primjenjuje do pet dnevnih doza trebalo bi ssprovesti osam (miševi) ili deset (štakori) parenja u nedeljnim intervalima nakon posljednjeg tretiranja. Kod primjene više doza broj intervala parenja može se smanjiti odnosno produženju perioda primjene, ali tako da se zadrži cilj ocjenjivanja svih faza spermatogeneze (npr. kod miševa su nakon 28-dnevnog izlaganja dovoljna samo četiri nedelje parenja kako bi se ocijenile sve faze spermatogeneze). Svi režimi tretiranja i parenja trebali bi biti naučno opravdani.

22.Ženke bi trebale ostati s mužjacima barem tokom jednog ciklusa estrusa (npr. kod miševa i glodara jedna nedelja obuhvata jedan ciklus estrusa). Ženke koje se nisu parile tokom jednonedeljnog intervala mogu se upotrijebiti za sljedeći interval parenja. Ili dok ne dođe do parenja, što se utvrđuje na osnovu prisutnosti sperme u vagini ili na osnovu prisutnosti vaginalnog čepa.

23.Izlaganje i režim parenja koji se primjenjuju zavise od krajnje svrhe istraživanja dominantne letalnosti. Ako je cilj utvrditi indukuje li se određena hemikalija mutacije dominantnih letalnih gena automatski, tad bi prihvatljiva metoda bila izlaganje cijelog ciklusa spermatogeneze (npr. sedam nedelja kod miševa, 5–7 tretiranja nedeljno) i jedno parenje na kraju ciklusa. Međutim, ako je cilj utvrditi vrstu polnih ćelija osjetljivu na indukovanje dominantnih letalnih gena, prednost se daje jednom ili petodnevnom izlaganju nakon kojeg slijedi nedeljno parenje.

Visine doza

24.Ako se sprovodi preliminarno istraživanje za određivanje raspona jer još nisu dostupni prikladni podaci koji bi pomogli u izboru doza, trebalo bi ga ssprovesti u istom laboratoriju primjenom iste vrste, soja, pola i režima tretiranja kao i u glavnom istraživanju. Istraživanjem bi se trebala odrediti maksimalna podnošljiva doza (MTD), koja je definisana kao najviša doza koja će se podnijeti bez dokaza o toksičnosti ograničene istraživanjem, povezane s trajanjem istraživanja (na primjer, neuobičajeno ponašanje ili reakcije, manji gubitak tjelesne mase ili hematopoetska sistemska citotoksičnost), isključujući smrt ili dokaze o boli, patnji ili stresu zbog kojih se zahtijeva humana eutanazija.

25.Maksimalna podnošljiva doza ne smije negativno uticati ni na uspjeh parenja.

26.Ispitivane hemikalije s posebnim biološkim djelovanjem u slabim netoksičnim dozama (kao što su hormoni i mitogeni) i hemikalije koje pokazuju zasićenost toksikokinetičkih svojstava mogu se izuzeti iz kriterijuma u pogledu određivanja doza i trebale bi se procjenjivati od slučaja do slučaja.

27.Kako bi se dobile informacije o odgovoru na dozu, potpuno istraživanje trebalo bi uključivati negativnu kontrolnu grupu i minimalno tri visine doze pri čemu je svaka uglavnom dvostruko veća od prethodne, ali najviše četvorostruko. Ako ispitivana hemikalija u istraživanju za

određivanje raspona ili na osnovu postojećih podataka ne izaziva toksičnost, najviša doza za jednu primjenu trebala bi biti 2 000 mg/kg tjelesne mase. Međutim, ako ispitivana hemikalija uzrokuje toksičnost, MTD bi trebao biti najviša primijenjena doza i poželjno je da se primijenjenim visinama doze obuhvati raspon od maksimalne doze do doze koja izaziva malu toksičnost ili ne izaziva toksičnost. Za netoksične hemikalije granična doza za period primjene od 14 dana ili više iznosi 1 000 mg/kg tjelesne mase dnevno, a za period primjene kraća od 14 dana granična doza iznosi 2 000 mg/kg tjelesne mase dnevno.

Primjena doza

28.Pri planiranju testa u obzir bi trebalo uzeti očekivani način izlaganja kod ljudi. Stoga se, ako je to opravdano, mogu odabrati načini izlaganja kao što su unos s hranom, unos s vodom za piće, potkožna primjena, intravenozna primjena, lokalna primjena, inhalacija, oralna primjena (oralna intubacija) ili implantacija. U svakom slučaju, način izlaganja trebalo bi odabrati tako da se osigura prikladno izlaganje ciljnog tkiva. Intraperitonealna injekcija obično se ne preporučuje jer nije način izlaganja namijenjen ljudima i trebalo bi je upotrebljavati samo uz posebno naučno opravdanje. Ako se ispitivana hemikalija dodaje hrani ili vodi za piće, posebno u slučaju primjene jedne doze, trebalo bi voditi računa o tome da se osigura dovoljno vrijeme od unosa hrane i vode do parenja kako bi se omogućilo otkrivanje efekata. Maksimalni volumen tečnosti koji se odjednom može primijeniti oralnom intubacijom ili injekcijom zavisi o veličini ispitne životinje. Taj volumen obično ne bi trebao biti veći od 1 ml/100 g tjelesne mase, osim u slučaju vodenih rastvora kod kojih je dopušteno upotrijebiti maksimalno 2 ml/100 g. Primjene većih volumena od navedenog (ako je dopušteno zakonodavstvom o dobrobiti životinja) treba opravdati. Variranje ispitnih volumena treba svesti na minimum podešavanjem koncentracije kako bi se kod svih visina doza osigurao stalni volumen u odnosu na tjelesnu masu.

Zapažanja

29.Najmanje jednom dnevno treba sprovoditi opšta klinička zapažanja o ispitnim životinjama i zabilježiti kliničke znake, po mogućnosti svaki dan u isto vrijeme ili vremena, vodeći računa o razdoblju najvećeg intenziteta očekivanih efekata nakon doziranja. Najmanje dvaput dnevno tokom perioda primjene doze, kod svih životinja treba provjeriti ima li slučajeva morbiditeta ili smrtnosti. Sve bi životinje trebalo izvagati na početku istraživanja i najmanje jednom nedeljno tokom istraživanja s ponovljenim dozama te prilikom eutanazije. Unos hrane treba mjeriti najmanje jednom nedeljno. Ako se ispitivana hemikalija daje s vodom za piće, unos vode trebalo bi mjeriti pri svakoj promjeni vode i najmanje jednom nedeljno. Životinje koje pokazuju nesmrtonosne pokazatelje prekodnosne toksičnosti trebalo bi eutanazirati prije dovršetka perioda ispitivanja (27.).

Prikupljanje i obrada tkiva

30.Ženke se eutanaziraju u drugoj polovini gravidnosti, na 13. dan gestacije kod miševa i 14.–15. dan kod glodara. Maternice se pregledavaju s obzirom na dominantno letalne efekte kako bi se utvrdio broj implantata, živih i mrtvih embrija te žutih tijela.

31.Rog maternice i jajnici izlažu se kako bi se prebrojala žuta tijela, a fetusi se uklanjaju, broje i važu. Trebalo bi oprezno pregledati maternice kako bi se otkrile resorpcije koje mogu prikriti živi fetusi i kako bi se osiguralo da se nabroje sve resorpcije. Bilježi se fetalna smrtnost. Bilježi se i broj uspješno oplođenih ženki i ukupan broj implantacija, predimplantacijskih gubitaka i

postimplantacijska smrtnost (uključujući rane i kasne resorpcije). Osim toga, vidljivi fetusi mogu se čuvati u Bouinovu fiksativu najmanje dvije nedelje, nakon čega slijedi pregled kojim se utvrđuju velike spoljašnje deformacije (28.) kako bi se dobile dodatne informacije o reproduktivnim i razvojnim efektima ispitnog agensa.

PODACI I IZVJEŠTAVANJE

Obrada rezultata

32.Podatke treba prikazati u obliku tabele iz koje se može vidjeti broj mužjaka koji su se parili, broj gravidnih ženki i broj negravidnih ženki. Rezultate svakog parenja, uključujući identifikacionu oznaku svakog mužjaka i ženke, treba bilježiti pojedinačno. Za svaku ženku trebalo bi navesti interval parenja, visinu doze za tretirane mužjake i broj živih i mrtvih implantata.

33.Postimplantacioni gubitak računa se utvrđivanjem odnosa mrtvih implantata u odnosu na njihov ukupan broj iz tretirane grupe u poređenju sa odnosom mrtvih implantata u odnosu na njihov ukupan broj iz kontrolne grupe s nosačem/rastvaračem.

34.Predimplantacioni gubitak računa se kao razlika između broja žutih tijela i broja implantata ili kao smanjenje prosječnog broja implantata po ženki u poređenju s parenjima u kontrolnoj grupi. Ako su procijenjeni gubici prije implantacije, treba ih zabilježiti.

35.Faktor dominantne letalnosti procjenjuje se kao: (broj postimplantacijskih smrti / ukupan broj implantacija po ženki) × 100.

36.Treba izvijestiti o podacima o toksičnosti i kliničkim znacima.

Kriterijumi prihvatljivosti

37.Prihvatljivost ispitivanja utvrđuje se na osnovu sljedećih kriterijuma.

- Istovremena negativna kontrola u skladu je s objavljenim normama za podatke o prošlim negativnim kontrolama i podacima laboratorija o prošlim kontrolama, ako su dostupni.
- Istovremene pozitivne kontrole indukuju odgovore koji su u skladu s objavljenim normama za podatke o prošlim pozitivnim kontrolama ili bazom podataka laboratorija o prošlim pozitivnim kontrolama, ako je dostupno, i dovode do statistički značajnog povećanja u poređenju s negativnom kontrolom.
- Analiziran je odgovarajući ukupan broj implantata i doza.
- Kriterijumi za izbor najviše doze.

Ocjenjivanje i tumačenje rezultata

38.Treba analizirati barem tri grupe tretirane dozom da bi se prikupilo dovoljno podataka za analizu doze i odgovora.

39.Pod uslovom da su ispunjeni svi kriterijumi prihvatljivosti, ispitivana hemikalija smatra se jasno pozitivnom:

- ako najmanje jedna od ispitnih doza pokazuje statistički značajno povećanje u poređenju s istovremenom negativnom kontrolom,
- ako je povećanje povezano s dozom u najmanje jednom eksperimentalnom uslovu (npr. nedečkni interval parenja) kad se ocjenjuje odgovarajućim testom, i
- ako je bilo koji od rezultata van prihvatljivog raspona podataka o negativnim kontrolama ili distribucije podataka laboratorija o prošlim negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji), ako su dostupni.

Tad se smatra da ispitivana hemikalija može indukovati mutacije dominantnih letalnih gena u somatskim ćelijama ispitnih životinja. Upotrijebljena statistička ispitivanja trebala bi kao eksperimentnu jedinicu uzimati životinju.

40.Pod uslovom da su ispunjeni svi kriterijumi prihvatljivosti, ispitivana hemikalija smatra se jasno negativnom:

- ako ni pri jednoj ispitnoj dozi nije zapaženo statistički značajno povećanje u odnosu na istovremenu negativnu kontrolu,
- ako ni u jednom eksperimentnom uslovu nema povećanja povezanog s dozom, i
- ako su svi rezultati unutar prihvatljivog raspona podataka o negativnim kontrolama ili podataka o prošlim negativnim kontrolama laboratorija (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji), ako su dostupni.

Tad se smatra da ispitivana hemikalija ne može indukovati mutacije dominantnih letalnih gena u somatskim ćelijama ispitnih životinja.

41.Jasan pozitivan ili negativan odgovor nije potrebno provjeriti.

42.Ako odgovor nije jasno negativan ili pozitivan i kako bi se pomoglo utvrditi biološku relevantnost rezultata (npr. slabo ili granično povećanje), podatke bi trebalo ocjenjivati na osnovu stručne procjene i/ili daljih istraživanja uz upotrebu postojećih eksperimentalnih podataka, kao što su razmatranja o tome je li pozitivan rezultat izvan prihvatljivog raspona podataka o negativnim kontrolama ili podataka laboratorija o prošlim negativnim kontrolama.

43.U rijetkim slučajevima, čak i nakon dodatnih istraživanja, skup podataka neće omogućiti donošenje zaključka o tome je li rezultat pozitivan ili negativan te će se stoga zaključiti da je dvosmislen.

44.Upotrijebljena statistička ispitivanja trebala bi kao eksperimentnu jedinicu uzimati mužjaka. Iako je moguće da podaci o broju (npr. broj implantata po ženki) mogu odgovarati Poissonovoj distribuciji i/ili da udjeli (npr. udio mrtvih implantata) mogu biti binomno distribuirani, ti su podaci često previše raspršeni. U skladu s tim, u statističkoj analizi prvo bi se trebao primijeniti test za veću ili manju raspršenost upotrebom testa varijance kao što je Cochranov test binomne varijance ili Taroneov C(α) test za binomnu veću raspršenost. Ako se ne otkrije odstepene od binomne raspršenosti, trendovi udjela u svim visinama doza mogu se ispitati upotrebom Cochran-Armitageova testa trenda, a poređenje u parovima s kontrolnom grupom može se ispitati upotrebom Fisherova egzaktnog testa. Isto tako, ako se ne otkrije odstepene od Poissonove raspršenosti, trendovi u brojevima mogu se ispitati upotrebom Poissonove regresije, a poređenje u parovima s kontrolnom grupom može se ispitati u kontekstu

Poissonova modela upotrebom kontrasta u parovima. Ako se otkrije znatno veća ili manja raspršenost, preporučuju se neparametarske metode. One obuhvataju testove koji se baziraju na rangovima, kao što su Jonckheere-Terpstraov test trenda i Mann-Whitneyjevi testovi za poređenje u parovima s kontrolnom grupom s nosačem/rastvaračem te testovi permutacija, ponovnog uzorkovanja i samonadopunjavanja (bootstrap) za trendove i poređenja u parovima s kontrolnom grupom.

45.Pozitivni test dominantnih letalnih gena pruža dokaze o genotoksičnosti ispitivane hemikalije u somatskim ćelijama tretiranog mužjaka ispitne vrste.

46.Pri procjeni biološke važnosti odgovora kao orijentacija mogu poslužiti razmatranje o tome jesu li uočene vrijednosti u ili van raspona proslih kontrola.

Izvještaj o ispitivanju

47.Izvještaj o ispitivanju trebalo bi sadržiti sljedeće informacije.

Rezime

Ispitivana hemikalija:

- izvor, broj serije, rok upotrebe, ako su dostupni,
- stabilnost ispitivane hemikalije, ako je poznata,
- rastvorljivost i stabilnost ispitivane hemikalije u rastvaraču, ako su poznate,
- izmjerene vrijednosti za pH, osmolalnost i taloženje u medijumu za uzgoj kulture u koji je dodata ispitivana hemikalija, prema potrebi.

Supstanca s jednim sastojkom:

- fizički izgled, rastvorljivost u vodi i druga relevantna fizičko -hemijska svojstva,
- hemijske identifikacione oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.
- Supstanci s više sastojaka, UVCB supstanci i smješe:
- opis (koliko je to moguće) hemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizičko-hemijskih svojstava sastojaka.

Priprema ispitivane hemikalije:

- obrazloženje za izbor nosača,
- rastvorljivost i stabilnost ispitivane hemikalije u rastvaraču/nosaču, ako su poznate,
- priprema formulacija koje se unose s hranom, vodom za piće ili udisanjem,
- analitička određivanja formulacija (npr. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije), ako se sprovode.

Ispitne životinje:

- vrsta/soj te obrazloženje tog izbora,
- broj, dob i pol životinja,
- porijeklo, uslovi smještaja, prehrana itd.,
- metoda jedinstvenog identifikovanja životinja,
- za kratkotrajna istraživanja: pojedinačna tjelesna masa mužjaka na početku i na kraju ispitivanja; za istraživanja duža od nedelju dana: pojedinačna tjelesna masa tokom istraživanja i unos hrane. Trebalo bi uključiti raspon tjelesne mase, srednju vrijednost i standardno odstepene za svaku grupu.

Ispitni uslovi:

- podaci o pozitivnim i negativnim kontrolama (nosač/rastvarač),
- podaci iz istraživanja za određivanje raspona,
- obrazloženje izbora visine doze,
- pojedinosti o pripremi ispitivane hemikalije,
- pojedinosti o primjeni ispitivane hemikalije,
- obrazloženje izbora načina primjene,
- metode mjerenja toksičnosti životinje, uključujući, ako je dostupno, histopatološke ili hematološke analize i učestalost kojom su obavljeni posmatranje i vaganje životinje,
- metode kojima se provjerava je li ispitivana hemikalija dospjela u ciljno tkivo ili krvotok, ako se dobiju negativni rezultati,
- stvarna doza (mg/kg tjelesne mase/dan) izračunata na osnovu koncentracije ispitivane hemikalije u hrani/vodi za piće (ppm) i unosa hrane/vode, ako je primjenjivo,
- pojedinosti o kvaliteti hrane i vode,
- pojedinosti o obogaćivanju sredine u kavezu,
- detaljan opis režima tretiranja i uzorkovanja te obrazloženje tih izbora,
- metoda analgezije,
- metoda eutanazije,
- postupak izdvajanja i očuvanja tkiva,
- izvor i serijski brojevi sve opreme i reagensa (ako je primjenjivo),
- metode prebrojavanja dominantnih letalnih gena,
- režim parenja,
- metode korištene da bi se utvrdilo da je došlo do parenja,
- vrijeme eutanazije,
- kriterijumi za ocjenjivanje dominantno letalnih efekata, uključujući žuta tijela, implantacije, resorpcije i predimplantacione gubitke, žive implantate i mrtve implantate.

Rezultati:

- stanje životinje prije i tokom perioda ispitivanja, uključujući znake toksičnosti,
- tjelesna masa mužjaka tokom perioda tretiranja i parenja,
- broj parenih ženki,
- odnos doze i odgovora, ako je to moguće,
- podaci o istovremenim i prošlim negativnim kontrolama s rasponima, srednjim vrijednostima i standardnim odstepenima,
- podaci o istovremenim pozitivnim kontrolama,

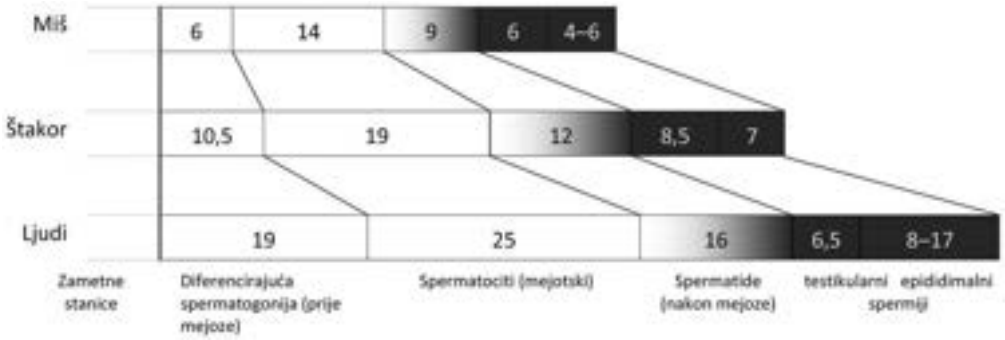
- tabelarni podaci za svaku ženku (majku), uključujući: broj žutih tijela po ženki; broj implantacija po ženki; broj resorpcija i predimplantacionih gubitaka po ženki; broj živih implantata po ženki; broj mrtvih implantata po ženki; težine fetusa,
- prethodno navedeni podaci sažeti za svaki period parenja i dozu, s učestalostima pojave mutacija dominantnih letalnih gena,
- primijenjene statističke analize i metode.

Rasprava o rezultatima.

Zaključak.

Dodatak 2.

TOK SPERMATOGENEZE KOD SISARA



Slika 1.: poređenje trajanja (u danima) razvoja muških polnih ćelija u miševa, glodara i ljudi. Do popravka DNK ne dolazi tokom perioda koja su osjenčana.Gore je prikazan shematski prikaz spermatogeneze kod miševa, glodara i ljudi (preuzeto iz Adler, 1996.). Nediferencirane spermatogonije uključuju: spermatogonije tipa A_s, A_{pr} i A_{al} (Hess i de Franca, 2008.). A_s se smatra pravom matičnom ćelijom; stoga od posljednje injekcije ispitivane hemikalije do parenja mora proći najmanje 49 dana (kod miševa) kako bi se procijenili efekti na somatske ćelije.

B.23. ISPITIVANJE HROMOZOMSKIH ABERACIJA NA SPERMATOGONIJIMA SISARA

UVOD

1.Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 483 (2016.). Ispitne metode periodično se preispituju uzimajući u obzir naučni napred, promjene regulatornih potreba i razmatranja o dobrobiti životinja. U ovoj izmijenjenoj verziji ispitne metode uzimaju se u obzir godine iskustva s tim testom i mogućnost integrisanja ili kombinovanja tog ispitivanja s drugim studijama toksičnosti ili genotoksičnosti. Kombinovanjem studija toksičnosti može se smanjiti broj životinja koje se upotrebljavaju u ispitivanjima toksičnosti. Ova je ispitna metoda dio niza ispitnih metoda u području genetske toksikologije. OECD je sastavio dokument u kojem se daju sažete informacije o ispitivanju u području genetske toksikologije te pregled novijih promjena smjernica OECD-a za ispitivanje genotoksičnosti

2. Svrha je in vivo testa hromozomskih aberacija u spermatogonijama sisara utvrditi hemikalije koje uzrokuju strukturne hromozomske aberacije u spermatogonijskim ćelijama sisara. Osim toga, ovo je ispitivanje relevantno za ocjenu genotoksičnosti jer, iako se mogu razlikovati među vrstama, faktori in vivo metabolizma, farmakokinetika i procesi popravka DNK aktivni su i doprinose odgovorima. Ova ispitna metoda nije namijenjena mjerenju numeričkih abnormalnosti; test se ne upotrebljava rutinski u tu svrhu.
3. Ovim se ispitivanjem mjere strukturne hromozomske aberacije (i hromozomskog i hromatidnog tipa) u spermatogonijskim somatskim ćelijama u fazi diobe te se stoga očekuje da se tim ispitivanjem može predvidjeti indukcija nasljednih mutacija u tim somatskim ćelijama.

POČETNA RAZMATRANJA

5. U ovom ispitivanju obično se upotrebljavaju glodari, ali i druge vrste mogu biti prikladne u određenim slučajevima, ako je to naučno opravdano. Standardni citogenetski preparati testisa glodara daju mitotske (spermatogonije) i mejotske (spermatocit) metafaze. Mitotske i mejotske metafaze utvrđuju se na osnovu morfologije hromozoma. Ovim se in vivo citogenetskim testom otkrivaju strukturne hromozomske aberacije pri spermatogonijskoj mitozi. Druge ciljne ćelije nisu predmet ove ispitne metode.

6.Kako bi se moglo otkriti aberacije hromatidnog tipa u spermatogonijskim ćelijama, treba ispitati prvu mitotsku diobu ćelija nakon tretiranja, prije nego što se te aberacije pretvore u aberacije hromozomskog tipa u kasnijim ćelijskim diobama. Dodatne informacije o tretiranim spermatocitima mogu se dobiti analizom strukturnih hromozomskih aberacija kod hromozoma tokom mejoze u dijakinezi-metafazi I i metafazi II.

7.U testisu se nalaze brojne generacije spermatogonija i te različite vrste polnih ćelija mogu biti različito osjetljive na tretiranje hemikalijama. Prema tome, uočene aberacije predstavljaju grupu reakciju tretiranih populacija spermatogonijskih ćelija. Većinu mitotskih ćelija u preparatima testisa čine spermatogonije tipa B, koje imaju ćelijski ciklus od približno 26 sati.

8.Ako postoje dokazi da ispitivana hemikalija ili njeni metaboliti neće dospjeti do testisa, ovaj oblik ispitivanja nije prikladan.

NAČELO ISPITNE METODE

9.Obično se životinje izlažu ispitivanoj hemikaliji prikladnim načinom izlaganja i eutanaziraju u odgovarajućim trenucima nakon tretiranja. Prije eutanazije životinje se tretiraju agensom za zaustavljanje metafaze (npr. kolhicinom ili Colcemidom®). Nakon toga naprave se i oboje hromosomski preparati polnih ćelija te se analizom utvrđuje je li došlo do hromozomskih aberacija metafaznih ćelija.

PROVJERA OSPOSOBLJENOSTI LABORATORIJA

10.

Osposobljenost za primjedbu ovog testa trebalo bi utvrditi dokazivanjem sposobnosti reprodukovanja očekivanih rezultata za učestalost pojave hromozomske aberacije kod spermatogonija s supstancima za pozitivnu kontrolu (uključujući slabe odgovore), kao što su one navedene u tabeli 1., te postizanja učestalosti u negativnim kontrolama koje su u skladu s prihvatljivim rasponom podataka o kontrolama u objavljenoj literaturi ili distribucijom proslih kontrola laboratorija, ako su dostupni.

OPIS METODE

Pripreme

Izbor životinjske vrste

11. Trebalo bi upotrebljavati zdrave, mlade odrasle životinje sojeva koji se obično upotrebljavaju u laboratorijskim istraživanjima. Obično se upotrebljavaju mužjaci miševa; međutim, mogu se upotrebljavati mužjaci drugih prikladnih vrsta sisara ako za to postoji naučno opravdanje i ako se time omogućava da se ispitivanje sprovodi zajedno s drugom ispitnom metodom. U izvještaju bi trebalo navesti naučno opravdanje za upotrebu drugih vrsta osim glodara.

Uslovi smještaja i hranjenja životinja

12.U slučaju glodara, temperatura prostorije u kojoj se drže životinje trebala bi biti 22 °C (±3 °C). Iako bi u idealnim okolnostima relativna vlažnost trebala biti 50–60 %, ona bi trebala biti najmanje 40 %, a poželjno je da ne prelazi 70 %, osim tokom čišćenja prostorije. Rasvjeta bi trebala biti vještačka uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Za hranjenje se može upotrebljavati konvencionalna laboratorijska hrana uz neograničenu količinu vode za piće. Kad se ispitivana hemikalija primjenjuje ovim načinom izlaganja, na izbor prehrane može uticati potreba da se osigura odgovarajuća primjesa ispitivane hemikalije. Glodari bi trebali biti smješteni u malim grupama (ne više od pet po kavezu) ako se ne očekuje agresivno ponašanje, po mogućnosti u kavezima s čvrstim podom i uz prikladno obogaćivanje životne sredine. Ako je to naučno opravdano, životinje se mogu držati u posebnim staništima.

Priprema životinja

13. Obično se upotrebljavaju zdravi mladi odrasli mužjaci (stari 8–12 nedelja na početku tretiranja) te se nasumce raspoređuju u kontrolne grupe i grupe za tretiranje. Pojedinačne životinje označavaju se na jedinstven način upotrebom humane, najmanje invazivne metode (npr. prstenovanjem, stavljanjem oznaka, mikročipovanjem ili biometrijskom identifikacijom, ali ne rezanjem uha ili prsta) i prilagođavaju laboratorijskim uslovima najmanje pet dana. Kaveze bi trebalo rasporediti tako da se efekti do kojih bi moglo doći zbog položaja kaveza svedu na minimum. Trebalo bi izbjegavati unakrsnu kontaminaciju pozitivnom kontrolom i ispitivanom hemikalijom. Na početku istraživanja variranje tjelesne mase pojedinačnih životinja treba biti što manje i ne smije prelaziti ±20 %.

Priprema doza

14. Prije nego što se doza daje životinjama, čvrste ispitivane supstanci po potrebi treba rastvoriti ili suspendovati u odgovarajućim rastvaračima ili nosačima ili dodati hrani ili vodi za piće. Tečno ispitivane hemikalije mogu se dozirati direktno ili razrijediti prije doziranja. Za potrebe inhaliranja, ispitivane hemikalije mogu se primijeniti u obliku gasa, pare ili

čvrstog/tečnog aerosola, u zavisnosti od njihovih fizičko-hemijskih svojstava. Ako prema podacima o stabilnosti skladištenje nije prihvatljivo i ako nisu utvrđeni prikladni uslovi skladištenja, preparate ispitivane hemikalije trebalo bi upotrebljavati svježe.

Ispitni uslovi – rastvarač/nosač

15.Pri visinama doza koje se primjenjuju rastvarač/nosač ne smije imati toksične efekte i ne smije postojati sumnja da bi mogao hemijski reagovati s ispitivanim hemikalijama. Ako se upotrebljavaju rastvarači/nosači koji nisu dobro poznati, njihovo uključivanje u ispitivanje trebalo bi potkrijepiti referentnim podacima kojima se dokazuje njihova usklađenost. Kad je god moguće, preporučuje se najprije razmotriti mogućnost primjene vodenog rastvarači/nosača. Primjeri uobičajeno korištenih usklađenih rastvarači/nosača uključuju vodu, fiziološki rastvor, rastvor metil-celuloze, rastvor natrijumove soli karboksimetilne celuloze, maslinovo ulje i kukuruzno ulje. Ako ne postoje prošli ili objavljeni podaci o kontrolama kojima se dokazuje da odabranim atipičnim rastvaračem/nosačem nisu indukovane strukturne hromozomske aberacije ili drugi štetni efekti, trebalo bi ssprovesti početno istraživanje kako bi se utvrdila prihvatljivost kontrole s rastvaračem/nosačem.

Pozitivne kontrole

16.Uvijek bi se trebale upotrebljavati životinje istovremenih pozitivnih kontrola, osim ako je laboratorija dokazala osposobljenost za primjenu ispitivanja te je u nedavnoj prošlosti rutinski upotrebljavao ispitivanje (npr. u posljednjih pet godina). Ako nije uključena istovremena pozitivna kontrolna grupa, u svaki eksperiment trebalo bi uključiti kontrole ocjenjivanja (fiksirana i nebojena predmetna stakalca). One se mogu dobiti uključivanjem u ocjenjivanje istraživanja prikladnih referentnih uzoraka koji su dobijeni i sačuvani iz posebnog eksperimenta s pozitivnom kontrolom koji se sprovodi periodično (npr. svakih šest do 18 mjeseci) u laboratoriji u kojem se sprovodi ispitivanje; na primjer, tokom ispitivanja osposobljenosti laboratorija i redovno nakon toga, ako je potrebno.

17.Supstanci za pozitivnu kontrolu trebale bi pouzdano izazvati zamjetno povećanje učestalosti ćelija sa strukturnim hromosomskim aberacijama iznad spontanih nivo. Doze pozitivnih kontrola trebalo bi odabrati tako da efekti budu jasni, ali da analitičar ne može odmah vidjeti identitet kodiranih uzoraka. Primjeri supstanci za pozitivnu kontrolu navedeni su u tabeli 1.

Tabela 1. Primjeri supstance za pozitivnu kontrolu

Supstance [CAS br.] (referentni br.)
Ciklofosfamid (monohidrat) [CAS br. 50-18-0 (CAS br. 6055-19-2)] (9.)
Cikloheksilamin [CAS br. 108-91-8] (7.)

Mitomicin C [CAS br. 50-07-7] (6.)
Monomerni akrilamid [CAS 79-06-1] (10.)
Trietilenmelamin [CAS 51-18-3] (8.)

Negativne kontrole

Životinje negativne kontrole, koje se tretiraju samo s rastvaračem ili nosačem, a inače se tretiraju jednako kao grupe za tretiranje, trebale bi biti uključene u svako vrijeme uzorkovanja. Ako ne postoje prošli ili objavljeni kontrolni podaci kojima se dokazuje da odabrano rastvarač ili nosač ne indukuje nikakve hromozomske aberacije ili druge štetne efekte, i netretirane kontrolne životinje trebale bi biti uključene u svako vrijeme uzorkovanja kako bi se utvrdila prihvatljivost kontrole s nosačem.

POSTUPAK

Broj životinja

Na početku istraživanja trebalo bi utvrditi veličine grupa kako bi se po grupi osiguralo minimalno pet mužjaka. Taj se broj životinja smatra dovoljnim za dobijanje primjerene statističke snage (tj. uopšteno se može otkriti barem udvostručenje učestalosti pojave hromozomske aberacije kad je nivo negativne kontrole 1,0 % ili veći s 80-postotnom vjerovatnoćom pri nivou značajnosti od 0,05) (3. i 11.). Kao smjernica za uobičajene maksimalne zahtjeve u pogledu životinja, za istraživanje s dva vremena uzorkovanja, s tri grupe koje primaju dozu i istovremenom negativnom kontrolnom grupom plus pozitivnom kontrolnom grupom (pri čemu se svaka grupa sastoji od pet životinja) bilo bi potrebno 45 životinja.

Režim tretiranja

Ispitivane hemikalije obično se primjenjuju jednom (tj. kao jednokratno tretiranje); mogu se primjenjivati i drugi režimi doziranja uz uslov da su naučno opravdani.

Kod grupe na koju se primjenjuje najviša doza uzorci se uzimaju dvaput nakon tretiranja. Budući da vrijeme potrebno za apsorpciju i metabolizam ispitivane hemikalije ili hemikalija, kao i njeno djelovanje na kinetiku ćelijskog ciklusa, mogu uticati na optimalno vrijeme za otkrivanje hromozomskih aberacija, jedno se uzorkovanje obavlja ranije, a jedno kasnije, približno 24 sata i 48 sati nakon tretiranja. Kod ostalih doza ranije uzorke treba uzeti 24 sata nakon tretiranja (manje od trajanja ćelijskog ciklusa spermatogonija tipa B ili jednako tom trajanju, čime se poboljšava vjerovatnoća ocjene prve metafaze nakon tretiranja), osim ako je poznato da je neko drugo vrijeme uzorkovanja primjerenije i opravdano.

Uzorci se mogu uzeti i u neko drugo vrijeme. Na primjer, u slučaju hemikalija koje imaju efekte nezavisne o S-fazi, uzorkovanja može biti primjereno obaviti ranije (tj. u razdoblju kraćem od 24 sata).

Može se upotrijebiti režim ponovljenih doza tretiranja, na primjer, zajedno s ispitivanjem na drugoj krajnjoj tački kod koje se upotrebljava period primjene od 28 dana (npr. ispitna metoda B.58.); međutim, bile bi potrebne dodatne grupe životinja kako bi se uzela u obzir različita vremena uzorkovanja. U skladu s tim, primjerenost tog režima treba naučno opravdati od slučaja do slučaja.

Prije eutanazije životinjama se intraperitonealno ubrizgava odgovarajuća doza hemikalije za zaustavljanje metafaze (npr. Colcemid® ili kolhicin). Zatim se nakon odgovarajućeg vremenskog intervala životinje podvrgavaju uzorkovanju. Za miševe i glodare taj interval iznosi približno 3–5 sati.

Visine doza

Ako se sprovodi preliminarno istraživanje za određivanje raspona doza jer još nisu dostupni prikladni podaci koji bi pomogli u izboru doza, trebalo bi ga ssprovesti u istom laboratoriju primjenom iste vrste, soja i režima tretiranja kao i u glavnom istraživanju, u skladu s preporukama za ssprovođenje istraživanja za određivanje raspona doza. Tim bi se istraživanjem trebala odrediti maksimalna podnošljiva doza (MTD), koja se definiše kao doza koja indukuje blage toksične efekte povezane s trajanjem istraživanja (na primjer, neuobičajeno ponašanje ili reakcije, manji gubitak tjelesne mase ili hematopoetska sistemska citotoksičnost), ali ne indukuje smrt ili znake boli, patnje ili stresa zbog kojih bi životinju trebalo eutanazirati.

Najviša se doza može definisati i kao doza pri kojoj se javljaju određeni znaci toksičnosti u spermatogonijskim ćelijama (npr. smanjenje odnosa spermatogonijskih mitoza u odnosu na prvu i drugu mejotsku metafazu). Navedeno smanjenje ne bi smjelo prelaziti 50 %.

Ispitivane hemikalije s posebnim biološkim djelovanjem u slabim netoksičnim dozama (kao što su hormoni i mitogeni) i hemikalije koje pokazuju zasićenost toksikokinetičkih svojstava mogu se izuzeti iz kriterijuma u pogledu određivanja doza i trebale bi se procjenjivati od slučaja do slučaja.

Kako bi se dobile informacije o odgovoru na dozu, potpuno istraživanje trebalo bi uključivati negativnu kontrolnu grupu i minimalno tri visine doze pri čemu je svaka uglavnom dvostruko veća od prethodne, ali najviše četvorostruko. Ako ispitivana hemikalija u istraživanju za određivanje raspona ili na osnovu postojećih podataka ne izaziva toksičnost, najviša doza za jednu primjenu trebala bi biti 2 000 mg/kg tjelesne mase. Međutim, ako ispitivana hemikalija uzrokuje toksičnost, MTD bi trebao biti najviša primijenjena doza i poželjno je da se primijenjenim visinama doze obuhvati raspon od maksimalne doze do doze koja izaziva malu toksičnost ili ne izaziva toksičnost. Ako je toksičnost ciljnog tkiva (tj. testisa) zapažena pri svim ispitanim visinama doza, preporučuje se dalje istraživanje pri netoksičnim dozama. Za istraživanja čiji je cilj potpunije opisati kvantitativne informacije o odgovoru na dozu mogu biti potrebne dodatne grupe koje primaju dozu. Za određene vrste ispitivanih hemikalija (npr. za

farmaceutske proizvode namijenjene ljudima) obuhvaćene posebnim zahtjevima ta se ograničenja mogu razlikovati. Ako ispitivana hemikalija uzrokuje toksičnost, trebala bi se odabrati granična doza i dvije manje doze (kako je prethodno opisano). Granična doza za period primjene od 14 dana ili više iznosi 1 000 mg/kg tjelesne mase dnevno, a za perioda primjene kraća od 14 dana granična doza iznosi 2 000 mg/kg tjelesne mase dnevno.

Primjena doza

Pri planiranju testa u obzir bi trebalo uzeti očekivani način izlaganja ljudi. Stoga se, ako je to opravdano, mogu odabrati načini izlaganja kao što su unos s hranom, unos s vodom za piće, lokalna primjena potkožno, intravenozna primjena, oralna primjena (oralna intubacija), udisanje ili implantacija. U svakom bi slučaju odabrani put trebao biti takav da se osigura odgovarajuća izloženost ciljnog tkiva. Intraperitonealna injekcija obično se ne preporučuje, osim ako je naučno opravdana, jer obično nije fiziološki odgovarajući put izlaganja ljudi. Ako se ispitivana hemikalija dodaje hrani ili vodi za piće, posebno u slučaju primjene jedne doze, trebalo bi voditi računa o tome da se osigura dovoljno vrijeme od unosa hrane i vode do uzorkovanja kako bi se omogućilo otkrivanje efekata. Maksimalni volumen tečnosti koji se odjednom može primijeniti oralnom intubacijom ili injekcijom zavisi o veličini ispitne životinje. Taj volumen obično ne bi trebao biti veći od 1 ml/100 g tjelesne mase, osim u slučaju vodenih rastvora kod kojih je dopušteno upotrijebiti maksimalno 2 ml/100 g tjelesne mase. Primjene većih volumena od navedenog treba opravdati. Variranje ispitnih volumena treba svesti na minimum podešavanjem koncentracije kako bi se kod svih visina doza osigurao stalni volumen u odnosu na tjelesnu masu.

Zapažanja

Najmanje jednom dnevno treba sprovoditi opšta klinička zapažanja o ispitnim životinjama i zabilježiti kliničke znake, po mogućnosti svaki dan u isto vrijeme, vodeći računa o razdoblju najvećeg intenziteta očekivanih efekata nakon doziranja. Najmanje dvaput dnevno kod svih životinja treba provjeriti ima li slučajeva morbiditeta ili smrtnosti. Sve životinje trebalo bi izvagati na početku istraživanja, najmanje jednom nedeljno tokom istraživanja s ponovljenim dozama, i prilikom eutanazije. U istraživanjima koja traju najmanje nedelju dana trebalo bi najmanje jednom nedeljno mjeriti unos hrane. Ako se ispitivana hemikalija daje s vodom za piće, trebalo bi mjeriti unos vode pri svakoj promjeni vode i najmanje jednom nedeljno. Životinje koje pokazuju nesmrtonosne pokazatelje prekodnosne toksičnosti trebalo bi eutanazirati prije dovršetka perioda ispitivanja.

Hromosomska smješa

Odmah po eutanaziji životinje napravi se suspenzija polnih ćelija iz jednog ili oba testisa, koja se izlaže hipotoničkom rastvoru i fiksira primjenom utvrđenih protokola. Zatim se ćelije razmažu po mikroskopskom stakalcu i oboje. Sva bi stakalca trebalo kodirati tako da analitičar ne zna njihov identitet.

Analiza

Za svaku životinju treba pregledati najmanje 200 dobro raširenih metafaza. Ako je učestalost u prošlim negativnim kontrolama < 1 %, trebalo bi pregledati više od 200 ćelija po životinji kako bi se povećala statistička snaga. Trebale bi se upotrebljavati metode bojenja koje omogućuju utvrđivanje centrodnosa.

Aberacije hromozomskog i hromatidnog tipa trebalo bi zabilježiti odvojeno i klasifikovati prema podtipovima (lomovi, zamjene). Prekide bi trebalo zabilježiti, ali ne i uzimati u obzir, prilikom utvrđivanja indukuje li hemikalija znatna povećanja učestalosti ćelija s hromosomskim aberacijama. U pokolonama koji se primjenjuju u laboratoriji trebalo bi osigurati da analizu hromozomskih aberacija sprovode dobro osposobljeni analitičari. Uzimajući u obzir da postupci pripreme predmetnih stakalaca često za posljedicu imaju lom jednog dijela metafaza uz posljedični gubitak hromozoma, ćelije koje se pregledavaju trebale bi stoga sadržiti broj centromera koji nije manji od 2n± 2, pri čemu je n haploidan broj hromozoma za tu vrstu.

Iako je svrha ovog ispitivanja otkrivanje strukturnih hromozomskih aberacija, važno je zabilježiti učestalost poliploidnih ćelija i ćelija s endoredupliciranim hromosomima ako se uoče te pojave.

PODACI I IZVJEŠTAVANJE
Obrada rezultata

Podatke o pojedinačnim životinjama trebalo bi prikazati u tabličnom obliku. Za svaku životinju treba odrediti broj ćelija sa strukturnim hromosomskim aberacijama i broj hromozomskih aberacija po ćeliji. Aberacije hromatidnog i hromozomskog tipa, klasifikovane prema podtipovima (lomovi, zamjene), trebalo bi navesti odvojeno, s njihovim brojem i učestalošću za eksperimentne i kontrolne grupe. Prekidi se bilježe posebno. Iako se bilježi učestalost hromozomskih prekida, ona se uopšteno ne uključuje u analizu ukupne učestalosti strukturnih hromozomskih aberacija. Postotak poliploidnih ćelija i ćelija s endoredupliciranim hromosomima bilježi se ako su zapažene takve ćelije.

Treba izvijestiti o podacima o toksičnosti i kliničkim znacima.

Kriterijumi prihvatljivosti

Prihvatljivost ispitivanja utvrđuje se na osnovu sljedećih kriterijuma.

Istovremena negativna kontrola u skladu je s objavljenim normama za podatke o negativnim kontrolama iz prošlih istraživanja, kod kojih se obično očekuje > 0 % i ≤ 1,5 % ćelija s hromosomskim aberacijama, i podacima o prošlim kontrolama laboratorija, ako su dostupni.

Istovremene pozitivne kontrole indukuju odgovore koji su u skladu s objavljenim normama za podatke o prošlim pozitivnim kontrolama ili bazom podataka laboratorija o prošlim podacima o pozitivnoj kontroli, ako je dostupna, i dovode do statistički značajnog povećanja u upoređenju s negativnom kontrolom.

Analiziran je odgovarajući broj ćelija i doza.

Kriterijumi za izbor najviše doze.

Ako se posmatraju i mitoza i mejoza, odnos spermatogonijskih mitoza u odnosu na prvu i drugu mejotsku metafazu treba utvrditi kao mjerilo citotoksičnosti za sve tretirane životinje i životinje negativne kontrole, na ukupnom uzorku od 100 ćelija u fazi diobe po životinji. Ako se posmatra samo mitoza, potrebno je utvrditi mitotski indeks u barem 1 000 ćelija za svaku životinju.

Ocjenjivanje i tumačenje rezultata

Treba analizirati barem tri grupe tretirane dozom da bi se prikupili odgovarajući podaci za analizu doze i odgovora.

Pod uslovom da su ispunjeni svi kriterijumi prihvatljivosti, ispitivana hemikalija smatra se jasno pozitivnom:

- ako najmanje jedna od ispitnih doza pokazuje statistički značajno povećanje u poređjenju s istovremenom negativnom kontrolom,
- ako je u najmanje jednom vremenu uzorkovanja to povećanje povezano s dozom, te
- ako je bilo koji od rezultata van prihvatljivog raspona podataka o negativnim kontrolama ili distribucije podataka o prošlim negativnim kontrolama laboratorija (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji), ako su dostupni.

Tad se smatra da ispitivana hemikalija može indukovati hromozomske aberacije spermatogonijskih ćelija ispitnih životinja. Preporuke o najprikladnijim statističkim metodama dostupne su i u literature. Upotrijebljena statistička ispitivanja trebala bi kao eksperimentnu jedinicu uzimati životinju.

Pod uslovom da su ispunjeni svi kriterijumi prihvatljivosti, ispitivana hemikalija smatra se jasno negativnom:

- ako ni pri jednoj ispitnoj dozi nije zapaženo statistički značajno povećanje u odnosu na istovremenu negativnu kontrolu,
- ako ni u jednom eksperimentnom uslovu nema povećanja povezanog s dozom, te
- ako su svi rezultati unutar prihvatljivog raspona podataka o negativnim kontrolama ili podataka o prošlim negativnim kontrolama laboratorija (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji), ako su dostupni.

Tad se smatra da ispitivana hemikalija ne može indukovati hromozomske aberacije spermatogonijskih ćelija ispitnih životinja. Preporuke o najprikladnijim statističkim metodama dostupne su i u literaturi. Negativan rezultat ne isključuje mogućnost da hemikalija može indukovati hromozomske aberacije u kasnijim fazama razvoja koje se ne istražuju, ili genske mutacije.

Jasan pozitivan ili jasan negativan odgovor nije potrebno provjeriti.

Ako odgovor nije jasno negativan ili pozitivan i kako bi se pomoglo utvrditi biološku relevantnost rezultata (npr. slabo ili granično povećanje), podatke bi trebalo ocjenjivati na osnovu stručne procjene i/ili daljih istraživanja uz upotrebu postojećih eksperimentalnih podataka, kao što su razmatranja o tome je li pozitivan rezultat izvan prihvatljivog raspona podataka o negativnim kontrolama ili podataka laboratorija o prošlim negativnim kontrolama.

U rijetkim slučajevima, čak i nakon dodatnih istraživanja, skup podataka neće omogućiti donošenje zaključka o tome je li rezultat pozitivan ili negativan te će se stoga zaključiti da je dvosmislen.

Povećanje broja poliploidnih ćelija može značiti da ispitivana hemikalija može inhibirati mitotske procese i indukovati numeričke hromozomske aberacije. Povećanje broja ćelija s endoredupliciranim hromosomima može značiti da ispitivana hemikalija može inhibirati progresiju ćelijskog ciklusa, a to je drugačiji mehanizam indukovanja numeričkih hromozomskih promjena od inhibiranja mitotskih procesa. Stoga bi učestalost poliploidnih ćelija i ćelija s endoredupliciranim hromosomima trebalo zabilježiti odvojeno.

Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju trebalo bi sadržiti sljedeće informacije:

- Rezime.
- Ispitivana hemikalija:
- izvor, broj serije, rok upotrebe, ako su dostupni,
- stabilnost ispitivane hemikalije, ako je poznata,
- rastvorljivost i stabilnost ispitivane hemikalije u rastvaraču, ako su poznate,
- izmjerene vrijednosti za pH, osmolalnost i taloženje u medijumu za uzgoj kulture u koji je dodata ispitivana hemikalija, prema potrebi.

Supstanca s jednim sastojkom:

- fizički izgled, rastvorljivost u vodi i druga relevantna fizičko-hemijska svojstva,
- hemijske identifikacione oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.

Supstanci s više sastojaka, UVCB supstanci i smješe:

- opis (koliko je to moguće) hemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizičko -hemijskih svojstava sastojaka.

Priprema ispitivane hemikalije:

- obrazloženje za izbor nosača,
- rastvorljivost i stabilnost ispitivane hemikalije u rastvaraču/nosaču,
- priprema formulacija koje se unose s hranom, vodom za piće ili udisanjem,
- analitička određivanja formulacija (npr. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije ako se sprovode.

Ispitne životinje:

- vrsta/soj te obrazloženje njihove upotrebe,
- broj I starost životinja,
- porijeklo, uslovi smještaja, prehrana itd.,
- metoda jedinstvenog identificikovanja životinja,
- za kratkotrajna istraživanja: pojedinačna tjelesna masa životinja na početku i na kraju ispitivanja; za istraživanja duža od nedelju dana: pojedinačna tjelesna masa tokom istraživanja i unos hrane. Trebalo bi uključiti raspon tjelesne mase, srednju vrijednost i standardno odstepene za svaku grupu.

Ispitni uslovi:
- podaci o pozitivnim i negativnim kontrolama (nosač/rastvarač),
- podaci iz istraživanja o utvrđivanju raspona, ako je ssprovedeno,
- obrazloženje izbora visine doze,
- obrazloženje izbora načina primjene,
- pojedinosti o pripremi ispitivane hemikalije,
- pojedinosti o primjeni ispitivane hemikalije,
- obrazloženje za vrijeme usmrćivanja životinja,
- metode mjerenja toksičnosti životinje, uključujući, ako je dostupno, histopatološke ili hematološke analize i učestalost kojom su obavljeni posmatranje i vaganje životinje,
- metode kojima se provjerava je li ispitivana hemikalija dospjela u ciljno tkivo ili krvotok, ako se dobiju negativni rezultati,
- stvarna doza (mg/kg tjelesne mase/dan) izračunata na osnovu koncentracije ispitivane hemikalije u hrani/vodi za piće (ppm) i unosa hrane/vode, ako je primjenjivo,
- pojedinosti o kvaliteti hrane i vode,
- detaljan opis režima tretiranja i uzorkovanja te obrazloženje tih izbora,
- metoda eutanazije,
- metoda analgezije (ako se primjenjuje),
- postupci izdvajanja tkiva,
- naziv (identifikacijona oznaka) hemikalije za zaustavljanje metafaze, njena koncentracija i trajanje primjene,
- metode pripreme predmetnih stakalaca,
- kriterijumi za ocjenu aberacija,
- broj analiziranih ćelija po životinji,
- kriterijumi prema kojima se istraživanje smatra pozitivnim, negativnim ili dvosmislenim.

Rezultati:
- stanje životinje prije i tokom perioda ispitivanja, uključujući znake toksičnosti,
- mase tijela i organa prije usmrćivanja (ako se primjenjuje više tretiranja, mase tijela izmjerene tokom režima tretiranja),
- znaci toksičnosti,
- mitotski indeks,
- odnos spermatogonijskih mitotskih ćelija u odnosu na prvu i drugu mejotsku metafazu, ili drugi dokaz izloženosti ciljnom tkivu,
- vrsta i broj aberacija, navedeni za svaku životinju posebno,
- ukupan broj aberacija po grupi sa srednjim vrijednostima i standardnim odstepenima,
- broj ćelija s aberacijama po grupi sa srednjim vrijednostima i standardnim odstepenima,

- odnos doze i odgovora, ako je to moguće,
- primijenjene statističke analize i metode,
- podaci o istovremenim negativnim kontrolama,
- podaci o prošlim negativnim kontrolama, zajedno s rasponima, srednjim vrijednostima, standardnim devijacijama i intervalom pouzdanosti od 95 % (ako je dostupan) ili objavljeni podaci o prošlim negativnim kontrolama koji se upotrebljavaju za prihvatljivost rezultata ispitivanja,
- podaci o istovremenim pozitivnim kontrolama,
- promjene ploidije ako su zapažene, uključujući učestalost poliploidnih i/ili endoreduplicirani ćelija.

Rasprava o rezultatima

Zaključak.

B.24. SPOT TEST NA MIŠEVIMA

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

1.2. Definicije

Definicije su date u Opšti uvod.

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance su propisane.

1.4. Princip metode Ovo je in vivo ispitivanje na miševima prilikom kog se hemikalijama izlažu embrioni u razvoju. Ciljne ćelije u embrionima u razvoju su melanoblasti, dok su ciljni geni oni koji kontrolišu pigmentaciju dlake krzna. Embrioni u razvoju su heterozigotni kod niza ovih gena koji uslovljavaju boju krzna. Mutacija ili gubitak (zbog niza genetskih pojava) dominantnih alela takvog gena u melanoblastu ima za posljedicu ekspresiju recesivnog fenotipa u ćelijama koje potom nastaju, stvarajući mrlju drugačije boje na krznu dobijenog miša. Broj potomaka s mrljama, mutacijama, prebroji se i učestalost njihovog javljanja upoređuje se s onom koja se javlja među potomcima koji nastanu iz embriona tretiranih isključivo rastvaračem. Test mrlje u miša otkriva pretpostavljene somatske mutacije u fetalnim ćelijama.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta nijesu propisani.

1.6. Opis metode

1.6.1. Pripreme

Ispitivane supstance se rastvaraju ili suspenduju u izotoničnom rastvoru. Hemikalije koje su nerastvorljive u vodi rastvaraju se ili suspenduju u odgovarajućim vehikulumima. Vehikulum koji se koristi ne interferira sa ispitivanom hemikalijom, niti uzrokuje toksične efekte. Neophodna je primjena svježih preparata ispitivane hemikalije.

1.6.1.1. Eksperimentalne životinje

Miševi T soja (jednobojni bez uzorka, a/a; činčila, ružičaste oči, c^{ch} p/c^{ch} p; smeĐi, b/b; blage boje, kratke uši, d se/d se; šarene mrlje, s/s) pare se ili sa HT sojem (blijeda boja, jednobojni bez uzorka, kratki udovi, pa a bp/pa a bp; nejasno olovnosivi, ln fz/ln fz; sedefasti pe/pe) ili sa C57BL (jednobojni bez uzorka, a/a). Koriste se i ostali odgovarajući oblici ukrštanja, kao što su NMRI (jednobojni bez uzroka, a/a; albino, c/c) i DBA (jednobojni bez uzorka, a/a; smeĐi b/b; blage boje d/d) pod uslovom da se dobiju jednobojni potomci.

1.6.1.2. Broj i pol

Tretira se dovoljan broj gravidnih ženki kako bi se osigurao odgovarajući broj preživjelih potomaka za svaki dozni nivo koja se primjenjuje. Odgovarajuća veličina uzorka reguliše se zavisno od broja mrlja zapaženih kod tretiranih miševa i raspona kontrolnih podataka. Negativan rezultat prihvatljiv je samo kada je procjenjivanje ssprovedeno na najmanje 300 potomaka ženki tretiranih najvišom dozom.

1.6.1.3. Primjena pozitivnih i negativnih kontrola (kontrolnih uzoraka)

Neophodno je da postoje podaci o istovrijemenim kontrolama miševa koji su tretirani samo medijumumom (negativne kontrole). Mogu se sjediniti kontrolni podaci iz prethodnih istraživanja iste laboratorijae kako bi se povećala osjetljivost ispitivanja, pod uslovom da su navedena ispitivanja homogena. Podaci o pozitivnoj kontroli koji su nedavno dobijeni u istoj laboratorijai poslije tretmana hemikalijom koja je pokazala mutagenost ovim testom, su dostupni ukoliko se ne primjeti mutagenost ispitivane hemikalije.

1.6.1.4. Put primjene

Uobičajeni putevi primjene uključuju oralnu intubaciju ili intraperitonealno ubrizgavanje supstance gravidnim ženkama. Obavljanje tretmana inhalacijom ili drugim putevima primjene koristi se kada to odgovara.

1.6.1.5. Dozni nivoi

Primjenjuju se bar dva dozna nivoa, uključujući jednu kod koje se javljaju simptomi toksičnosti ili smanjenje veličine legla. Kod netoksičnih hemikalija izlažu se maksimalnoj mogućoj dozi.

1.6.2. Postupak

Obavlja se jedan tretman tokom osmog, devetog ili desetog dana trudnoće, pri čemu se kao prvi dan broji onaj dan kada je prvi put primjećen vaginalni "čep". Ovi dani odgovaraju vremenu od 7,25, 8,25 i 9,25 dana poslije začeća. Primjenjuju se i sukcesivni tretmani tokom navedenih dana.

1.6.2.1. Analiza

Potomci se šifriraju i posmatraju na postojanje mrlja između treće i četvrte nedelje poslije roĐenja. Razlikuju se tri kategorije mrlja:

a) bijele mrlje unutar 5 mm od središnje ventralne (trbušne) linije za koje se pretpostavlja da su posljedica ubijanja ćelija (u daljem tekstu: WMVS);

b) žute mrlje, nalik aguti boji, vezane uz područja grudi, genitalija, grla, područja pazuha i prepona i na sredini čela; za njih se pretpostavlja da su poslijedica pogrešne diferencijacije (u daljem tekstu: MDS);

v) pigmentne i bijele mrlje slučajno raspoređene po krznu za koje se pretpostavlja da su posljedica somatskih mutacija (u daljem tekstu: RS).

Vrednovanje se obavlja u sve tri kategorije, ali je samo posljednja, RS, od genetske važnosti. Poteškoće u razlikovanju MDS i RS rešavaju se fluorescentnom mikroskopijom uzoraka dlake.

Neophodno je zabilježiti očigledne makro morfološke abnormalnosti potomaka.

2. Podaci

Podaci se navode u obliku ukupnog broja vrednovanih potomaka i broja kod koga se pojavila jedna ili više mrlja za koje se pretpostavlja da su poslijedica somatske mutacije. Podaci o tretiranju uporeĐuju se sa podacima negativne kontrole primjenom odgovarajućih metoda. Podaci se prikazuju na osnovi pojedinih leglaa.

Izvještaj

3.1. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:

- sojevima upotrijebljenim za ukrštanje;
- broju gravidnih ženki u eksperimentalnim i kontrolnim grupama;
- prosječnoj veličini legla u eksperimentalnim i kontrolnim grupama prilikom okota i prestanka dojenja;
- nivoima doza ispitivane hemikalije;
- upotrijebljenom rastvaraču;
- danu gravidnosti na koji je tretman primjenjen;
- načinu primjene tretmana;
- ukupnom broju vrednovanih potomaka i broju sa WMVS, MDS i RS u eksperimentalnim i kontrolnim grupama;
- uočljivim morfološke abnormalnostima;
- odnosu doze/efekat kod RS-a kada je moguće;
- statističkoj procjeni;
- obrazloženju rezultata;

- tumačenju rezultata.

3.2. Procjena i tumačenje rezultata

Procjena i tumačenje rezultata dati su u Opšti uvod.

B.25. NASLEĐENA TRANSLOKACIJA KOD MIŠA

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

1.2. Definicije

Definicije su date u Opšti uvod.

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance nijesu propisane.

1.4. Princip metode

Ispitivanje nasljeĐene translokacije kod miša otkriva strukturne i numeričke hromozomske promjene u polnim ćelijama sisara koje se pojavljuju kod potomstva prve generacije. Vrste otkrivenih hromozomskih promjena obuhvataju recipročne translokacije i, ukoliko je uključeno potomstvo ženskog pola, gubitak hromozoma X. Kod nosilaca translokacija i XO-ženki javlja se smanjena plodnost koja se koristi za izbor F potomstva u svrhu citogenetske analize. Potpunu sterilnost izazivaju određene vrste translokacija (autozomni gen X (autozom) i c-t tip). Translokacije se citogenetski posmatraju u mejotskim ćelijama tokom dijakineze - metafaze 1 kod jedinki mužjaka, bilo F^1 mužjaka ili potomaka muškog pola F^1 ženki. XO-ženke citogenetski se identifikuju na osnovu postojanja samo 39 hromozoma tokom mitoza koštane srži.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta nijesu propisani.

1.6. Opis metode

1.6.1. Pripreme

Hemikalije koje se ispituju rastvaraju se u izotoničnom rastvoru. Ukoliko su hemikalije nerastvorljive, suspenduju se u odgovarajućim vehikulumima. Koriste se svježe pripremljeni rastvori ispitivane supstance. Ukoliko se zbog lakšeg doziranja koristi vehikulum, on ne interferira sa ispitivanim jedinjenjem, niti da uzrokuje toksične efekte.

1.6.1.1. Put primjene

Putevi primjene obično obuhvataju oralnu intubaciju ili intraperitonealne injekcije. Odgovaraju i drugi putevi primjene.

1.6.1.2. Eksperimentalne životinje

Zbog lakšeg razmnožavanja i citološke verifikacije, eksperimenti se obavljaju na miševima. Nije potreban nikakav specifični mišji soj. Prosječna veličina legla soja je veća od osam i relativno konstantna. Koriste se zdrave i polno zrele životinje.

1.6.1.3. Broj životinja

Potreban broj životinja zavisi od učestalosti spontanih translokacija i najnižeg stepena indukcije potrebne za pozitivan rezultat.

Ispitivanje se obavlja analizom muškog F_1 potomstva. Po svakoj doziranoj grupi ispitati najmanje
500 muških F_1 potomaka. Ukoliko je u ispitivanje uključeno i žensko F_1 potomstvo, potrebno je 300 mužjaka i 300 ženki.

1.6.1.4. Primjena pozitivnih i negativnih kontrola

Potrebni su odgovarajući kontrolni podaci dobijeni na osnovu istovremene kontrole i kontrole iz prošlih ispitivanja. Kad postoje prihvatljivi rezultati pozitivne kontrole iz nedavno izvedenih ispitivanja u istoj laboratorijai, upotrebljavaju se ovi rezultati umjesto istovremene pozitivne kontrole.

1.6.1.5. Dozni nivoi

Ispituje se jedna doza, obično najviša doza koja je u vezi sa izazivanjem minimalnih toksičnih efekata, ali bez uticaja na reproduktivno ponašanje ili preživljavanje. Kako bi se uspostavio odnos između doze i efekta, potrebne su i dve dodatne niže doze. Kod netoksičnih hemikalija vrši se izlaganje maksimalnoj mogućoj dozi.

1.6.2. Postupak

1.6.2.1. Tretiranje i parenje

Postoje dva plana tretiranja. Koristi se pojedinačna primjena ispitivane supstance. Ispitivana supstanca se primjenjuje sedam dana nedeljno tokom perioda od 35 dana. Broj parenja koji slijedi poslije tretmana određen je planom tretmana. Obezbijediti obavljanje uzorkovanja u svim tretiranim stadijumima polnih ćelija. Na kraju perioda parenja ženke se pojedinačno stavljaju u kaveze. Kada se ženke okote, bilježi se datum, veličina legla i pol potomstva. Svi muški potomci se odbijaju od sise, dok se svi ženski potomci odbacuju, osim ukoliko su obuhvaćeni ispitivanjem.

1.6.2.2. Ispitivanje heterozigotnosti kod translokacije

Koristi se jedna od dvije moguće metode:

a) Ispitivanje plodnosti F_1 potomstva i naknadna verifikacija mogućih nosilaca translokacije citogenetskom analizom;

b) Citogenetska analiza svih muških F_1 potomaka bez prethodne selekcije na osnovu ispitivanja plodnosti.

a) Ispitivanje plodnosti

Smanjena plodnost F_1 jedinki utvrđuje se praćenjem veličine legla i/ili analizom materičnog sadržaja ženskih ispitanika.

Utvrditi kriterijume za određivanje normalne i smanjene plodnosti za soj miševa koji se koristi.

Praćenje veličine legla: F_1 mužjaci, na kojima će biti izvedeno ispitivanje, pojedinačno se zatvaraju u kaveze zajedno sa ženkama iz istog eksperimenta ili iz kolonije. Kavezi se svakodnevno provjeravaju, počevši 18 dana nakon parenja. Prilikom okota bilježi se veličina legla i pol F_2 potomstva i legla se poslije toga odbacuju. Ukoliko se ispituje žensko F_1 potomstvo, F_2 potomstvo iz malih leglaa zadržava se zbog daljih ispitivanja. Ženski nosioci translokacija provjeravaju se citogenetskom analizom translokacije kod svakog od njihovih muških potomaka. XO-ženke prepoznaju se po promjeni odnosa meĐu polovima njihovog potomstva iz 1:1 u 1:2 u korist potomaka muškoga pola. U sekvencijalnom postupku normalne F_1 životinje eliminišu se iz daljeg ispitivanja ukoliko prvo F_2 leglo dostigne ili premaši unaprijed određenu normalnu vrijednost. U suprotnom, obavlja se posmatranje drugog ili trećeg F_2 legla.

F_1 životinje koje se ne klasifikuju kao normalne poslije praćenja maksimalno tri F_2 legla, ili se dalje ispituju analizom materičnog sadržaja ženskih ispitanika ili se direktno podvrgavaju citogenetskoj analizi.

Analiza materičnog sadržaja: do smanjenja veličine legla nosilaca translokacije dolazi zbog smrti embriona tako da visok broj mrtvih implantata upućuje na postojanje translokacije kod životinje koja se ispituje. Svaki F_1 mužjak na kojem se obavlja ispitivanje pari se sa dvije do tri ženke. Začeće se utvrđuje na osnovu svakodnevnih provjera na postojanje vaginalnih "čepova" u jutarnjim satima. Ženke se žrtvuju 14 do 16 dana kasnije i registruju se živi i mrtvi implantati u njihovim matericama.

b) Citogenetska analiza

Preparati sadržaja testisa pripremaju se tehnikom vazdušnog sušenja. Nosioci translokacija prepoznaju se po postojanju multivalentnih struktura pri dijakinezi - metafazi 1 u primarnim spermatocitima. Opažanje najmanje dvije ćelije sa multivalentnom asocijacijom dovoljan je dokaz da je ispitana životinja nosilac translokacije.

Ukoliko nije obavljena ni jedna selekcija tokom uzgoja, svi F_1 mužjaci se provjeravaju citogenetski. Mikroskopski otkriti postojanje najmanje 25 ćelija u metafazi 1 dijakineze po mužjaku. Obaviti pregled mitotskih metafaza u spermatogonijima ili koštanoj srži F_1 mužjaka s malim testisima i mejotskom razgradnjom prije dijakineze ili F_1 ženki za koje se sumnja da su XO. Postojanje neobično dugog i/ili kratkog hromozoma u svakoj od deset ćelija dokaz je posebne translokacije kod mužjaka koja izaziva sterilnost (c-t tip). Neke translokacije autozoma X koje uzrokuju sterilnost mužjaka prepoznaju se samo analizom koja primjenjuje pruganje mitotskih hromozoma.

Postojanje 39 hromozoma u svih 10 mitoza dokaz je postojanja XO stanja kod ženke.

2. Podaci

Podaci se navode tabelarno. Za svaki period parenja, poslije parenja roditelja, registruje se srednja veličina legla i odnos polova prilikom okota i prestanka dojenja.

Za procjenu plodnosti F_1 životinja navodi se srednja veličina legla svih normalnih parenja i pojedinačne veličine legla F_1 nosilaca translokacija. Za analizu materičnog sadržaja izvještava se o prosječnom broju živih i mrtvih implantata poslije normalnih parenja i o pojedinačnim brojevima živih i mrtvih implantata za svako parenje F_1 nosilaca translokacije.

Za citogenetsku analizu dijakineze-metafaze 1 bilježi se broj vrsta multivalentnih struktura i ukupan broj ćelija za svakog nosioca translokacije.

Za sterilne F_1 jedinke bilježi se ukupan broj parenja i trajanje perioda parenja. Navodi se masa testisa i detalji citogenetske analize.

Za XO ženke bilježi se srednja veličina legla, odnos polova F_1 potomstva i rezultati citogenetske analize.

Kad je moguće, F_1 nosioci translokacije biraju se na osnovu ispitivanja plodnosti i tabele obuhvataju podatke o tome koliki broj njih su potvrĐeni heterozigoti translokacije.

Navode se i podaci negativnih i pozitivnih kontrola ispitivanja.

3. Izvještaj

3.1. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:
- mišjem soju, starosti životinja, masi tretiranih životinja;
- broju životinja roditelja svakog pola u eksperimentalnim i kontrolnim grupama;
- uslovima ispitivanja, detaljan opis tretmana, nivoa doza, rastvarača, raspored parenja;
- broju i polu potomaka po svakoj ženki, broju i polu potomaka uzgojenih u svrhu analize translokacije;
- vremenu i kriterijumima analize translokacije;
- broju i detaljnom opisu nosilaca translokacije, uključujući podatke o parenju i podatke o materičnom sadržaju, u zavisnosti od konkretnog slučaja;
- citogenetskim pokolonama i detaljima mikroskopske analize, po mogućstvu uz slike;
- statističkoj procjeni;
- obrazloženju rezultata;
- tumačenje rezultata.

3.2. Procjena i tumačenje rezultata

Procjena i tumačenje rezultata dati su u Opšti uvod.

1. Metoda ispitivanja

Metoda ispitivanja subhronične oralne toksičnosti ponovljenih doza zasniva se na metodi OECD: TG 408 (1998).

1.1. Uvod

Prilikom vrednovanja i procjene toksičnih svojstava hemikalije subhronična oralna toksičnost određuje se primjenom ponovljenih doza, a nakon što su, na osnovu 28-dnevnih ispitivanja toksičnosti, primjenom akutne ili ponovljenih doza, dobijeni početni podaci o toksičnosti. Devedesetodnevno ispitivanje daje podatke o mogućim opasnostima po zdravlje koje će vjerovatno proizaći iz ponavljane dugotrajne izloženosti tokom perioda sazrijevanja poslije prestanka dojenja i perioda rasta, poprilično zahvatajući odraslo doba. Ispitivanje daje podatke o značajnijim toksičnim efektima, naznačava ciljne organe i mogućnost kumulacije, i obezbjeđuje procjenu nivoa ekspozicije pri kojem nisu primjećeni neželjeni efekti, a koji se primjenjuje prilikom izbora nivoa doze za hronična ispitivanja, kao i za utvrĐivanje kriterijuma sigurnosti kod izlaganja ljudi.

Metoda stavlja dodatni akcenat na neurološke krajnje tačke i ukazuje na imunološke i reproduktivne efekte. Potrebno je i pažljivo kliničkim praćenjem životinja, s ciljem prikupljanja što veće količine podataka. Ovo ispitivanje omogućava prepoznavanje hemikalija koje imaju potencijal uzrokovanja neurotoksičnih i imunoloških efekata, kao i efekata na reproduktivnim organima, što može opravdati dalja detaljna istraživanja.

1.2. Definicije

Doza je količina ispitivane supstance koja se primjenjuje, izražava se kao masa (g, mg) ili kao masa ispitivane supstance po jedinici tjelesne mase eksperimentalne životinje (npr. mg/kg) ili u obliku konstantnih koncentracija izlaganja putem ishrane (ppm).

Doziranje je opšti pojam koji obuhvata dozu, njenu učestalost i vremensko trajanje doziranja.

NOAEL je skraćenica za nivo pri kojem nisu primjećeni neželjeni efekti i predstavlja najviši nivo doze pri kojoj nisu primjećeni nikakvi štetni nalazi vezani za tretman.

1.3. Princip metode

Ispitivana supstanca primjenjuje se svakodnevno oralnim putem u rastućim dozama kod nekoliko grupa eksperimentalnih životinja i to po jedan dozni nivo po grupi tokom 90 dana. Tokom perioda primjene, životinje se posmatraju zbog uočavanja simptoma toksičnosti. Na životinjama koje uginu ili su žrtvovane tokom ispitivanja obavlja se postmortalni pregled, dok se, po završetku ispitivanja, preživjele životinje takoĐe žrtvuju i postmortalno pregledaju.

1.4. Opis metode

1.4.1. Priprema životinja

Prilikom ispitivanja koriste se zdrave životinje koje su se aklimatizovale na laboratorijaske uslove najmanje pet dana i nisu bile predmet prethodnih eksperimentalnih postupaka. Eksperimentalne životinje okarakterisati kao vrstu, soj, porijeklo, pol, tjelesnu masu i/ili starost. Životinje se slučajnim izborom dodjeljuju kontrolnim grupama i grupama koje se tretiraju. Kavezi su razmješteni na način kojim će mogući efekti koji proizlaze iz položaja kaveza biti svedeni na najmanju moguću mjeru. Svakoj životinji dodjeljuje se jedinstveni identifikacioni broj.

1.4.2. Priprema doza

Ispitivana supstanca daje se putem intubacione cijevi ili putem hrane ili vode za piće. Metoda oralne primjene zavisi od svrhe ispitivanja, kao i od fizičkih i hemijskih svojstava ispitivanog materijala.

Ispitivana supstanca se rastvara ili suspenduje u odgovarajućem vehikulumu. Uzeti u obzir primjenu vodenog rastvora/suspenzije, poslije čega se razmatra rastvor/emulzija u ulju (npr. kukuruzno ulje), a tek poslije toga moguće je rastvaranje u ostalim vehikulumima. Za sve vehikulume, osim vode, poznata su toksična svojstva. Utvrditi stabilnost ispitivane supstance u uslovima primjene.

1.4.3. Uslovi ispitivanja

1.4.3.1. Eksperimentalne životinje

Najpogodnija životinjska vrsta je pacov, iako se primjenjuju i ostale vrste glodara, na primjer miševi. Koriste se mlade zdrave odrasle životinje laboratorijaskih sojeva koji se obično upotrebljavaju. Biraju se ženke koje nisu ranije raĐale i koje nisu gravidne. Sa doziranjem započeti što je prije moguće nakon prestanka dojenja, a prije nego što životinje navrše devet nedjelja. Prilikom započinjanja ispitivanja, odstepene u tjelesnoj masi životinja koje se koriste je minimalno i ne odstupa više od ±20% prosječne tjelesne mase svakog pola. Kada se istraživanje obavlja kao preliminarno, prije dugotrajnog ispitivanja hronične toksičnosti, u oba ispitivanja upotrijebiti životinje koje su istog soja i istog porijekla.

1.4.3.2. Broj i pol

Prilikom ispitivanja svake doze upotrijebiti najmanje 20 životinja (deset ženki i deset mužjaka). Ukoliko se planira žrtvovanje u meĐuvremenu, broj se uvećava za broj životinja čije se žrtvovanje planira prije završetka ispitivanja. Na osnovu prethodnog znanja o hemikaliji ili bliskom analogu, razmotriti uključivanje dodatne prateće grupe od deset životinja (pet po polu) u kontrolnu grupu i grupu koja prima najvišu dozu, zbog praćenja reverzibilnosti ili postojanosti bilo kog od toksičnih efekata po isteku perioda tretiranja. Trajanje ovog perioda nakon tretiranja utvrđuje se u skladu sa zapaženim efektima.

1.4.3.3. Nivoi doziranja

Koristiti najmanje tri nivoa doze i istovremenu kontrolu, osim u slučajevima u kojima se obavlja ispitivanje granične doze (tačka 1.4.3.4. ove metode). Nivoi doze se baziraju na rezultatima ispitivanja s ponovljenim doziranjem ili rezultatima ispitivanja namijenjenog utvrĐivanju raspona. Uzimaju se u obzir svi postojeći toksikološki i toksikokinetički podaci koji postoje za ispitivanu supstancu ili materijal s njom u vezi. Najviša doza bira se sa ciljem da izazove toksičnost, ali ne i smrt ili ozbiljne tegobe, osim ukoliko nije ograničena fizičkim i hemijskim karakteristikama ili biološkim efektima ispitivane supstance. Opadajući niz doza bira se s ciljem da se dokažu bilo kakve reakcije povezane s doziranjem, kao i najviši nivo na kome nisu primjećeni neželjeni efekti (u daljem tekstu: NOAEL) pri najnižem nivou doze. Za uspostavljanje silaznih nivoa doza najčešće su optimalni dvostruki intervali, pa sve do četvorostrukih, dok je dodavanje četvrte eksperimentalne grupe preporučljivije od korišćenja vrlo velikih intervala između doziranja.

Kontrolna grupa je ona koja se ne tretira ili kontrolna grupa koja se tretira samo vehikulumom ukoliko se isti koristi prilikom davanja ispitivane supstance. Izuzev tretiranja ispitivanom supstancom, sa životinjama u kontrolnoj grupi postupa se na isti način kao i sa eksperimentalnim grupama. Ukoliko se koristi vehikulum, kontrolna grupa prima vehikulum u najvišoj zapremini koja se primjenjuje. Ukoliko se ispitivana supstanca daje zajedno sa hranom i uzrokuje smanjen unos hrane tada se, za razlikovanje smanjenog unosa uzrokovanog ukusom i onog usled toksikoloških promjena kod eksperimentalnog modela, koristi paralelno hranjena kontrolna grupa.

U obzir se uzimaju sljedeća svojstva vehikuluma i ostalih dodataka, u zavisnosti od slučaja: efekti na apsorpciju, raspoDijelu, metabolizam ili zadržavanje ispitivane supstance; efekta na hemijska svojstva ispitivane supstance koji mogu promjeniti njena toksična svojstva i efekti na potrošnju hrane i vode ili stanje uhranjenosti životinja.

1.4.3.4. Ispitivanje granične doze

Ukoliko zbog eksperimenta s jednim nivoom doze, koja je najmanje jednaka 1.000 mg/kg TM/dnevno, a koji se koristi u pokolonama opisanim za ovo ispitivanje, ne nastanu nikakvi primetni neželjeni efekti i ukoliko se toksičnost ne očekuje na osnovu podataka o strukturno sličnim supstancama, tada se ne smatra neophodnim cjelokupno ispitivanje koje primjenjuje tri nivoa doziranja. Ispitivanje granične doze nije primjenljivo u slučajevima kad izloženost ljudi ukazuje na potrebu za primjenom višeg nivoa doze.

1.5. Postupak

1.5.1. Primjena doza

Životinjama se ispitivana supstanca daje svakodnevno, sedam dana nedeljno tokom perioda od 90 dana. Bilo koji drugi režim doziranja, na primjer, pet dana nedeljno, potrebno je opravdati. Kada se ispitivana supstanca primjenjuje putem intubacione cijevi (prisilno hranjenje), istu dati u obliku jedne doze životinjama koje koriste želudačnu cijev ili odgovarajuću intubacionu kanilu. Maksimalna zapremina tečnosti koja se daje odjednom zavisi od veličine eksperimentalne životinje. Zapremina nije veća od 1ml/100g TM, osim u slučaju vodenih rastvora kada je moguće primjeniti 2 ml/100g TM. Izuzev u slučaju iritativnih ili korozivnih supstanci kod kojih se nepovoljni efekti obično pokazuju pri višim koncentracijama, varijabilnost eksperimentalne

zapremine se svodi na najmanju moguću mjeru prilagoĐavanjem koncentracije, a kako bi se obezbijedila konstantna zapremina pri svim nivoima doza.

Kod supstanci koje se primjenjuju putem hrane ili vode za piće važno je osigurati da količine ispitivane supstance o kojoj je riječ ne ometaju redovnu ishranu i ravnotežu vode. Kada se ispitivana supstanca daje putem hrane, primjenjuje se konstantna prehrambena koncentracija (ppm) ili konstantni dozni nivo u odnosu na tjelesnu masu životinje. Alternativa koja se koristi se naznačava. U slučaju supstance koja se daje prisilnim hranjenjem (intubacionom cijevi), dozu dati svaki dan u isto vrijeme i po potrebi prilagoditi kako bi se održala konstantna doza u odnosu na tjelesnu masu životinje. Kada se 90-dnevno ispitivanje koristi kao preliminarno ispitivanje dugotrajnog ispitivanja hronične toksičnosti, preporučljivo je u oba ispitivanja primjeniti sličan način ishrane.

1.5.2. Posmatranja

Praćenje traje najmanje 90 dana. Životinje u pratećoj grupi za koje se planiraju dodatna posmatranja, odgovarajuće vrijeme, drže se bez tretmana, kako bi se otkrila postojanost ili oporavak od toksičnih efekata.

Opšta klinička posmatranja obavljaju se najmanje jednom dnevno, najbolje u isto vrijeme svakog dana, uzimajući u obzir najznačajniji period očekivanih efekata nakon doziranja. Zabilježiti kliničko stanje životinja. Najmanje dvaput dnevno, obično početkom i krajem svakog dana, sve životinje se provjeravaju na simptome morbiditeta i mortaliteta.

Najmanje jednom prije prvog izlaganja (kako bi se omogućilo poređenje kod istih ispitanika) i jednom nedeljno nakon toga, obavlja se detaljno kliničko snimanje stanja svih životinja. Navedena posmatranja obaviti izvan kaveza u kojem životinja inače boravi, najbolje u standardnom očvrstenju i svaki put u slično vrijeme. Posmatranja se registruju, najbolje korišćenjem sistema vrednovanja, izričito definisanih od strane laboratorijae koja obavlja ispitivanje. Obezbijediti da su odstepena u uslovima posmatranja minimalna. Simptomi koji se bilježe obuhvataju, ali nisu ograničeni na, promjene na koži, krznu, očima, mukoznim membranama, pojavi sekreta ili ekskreta i autonomnu aktivnost (npr. suzenje, piloerekcija, veličina zenica, neobična respiratorna struktura). Registruju se i promjene u hodu, držanju i reakciji na manipulisanje, kao i postojanje kloničkih ili toničkih pokreta, šablone u ponašanju (npr. preterano negovanje poljašnosti, ponovljeno čvrstenje) ili neobično ponašanje (npr. samopovrijeĐivanje, hodanje unatrag)[1].

Oftalmološki pregled, korišćenjem oftalmoskopa ili podjednako odgovarajuće opreme, obaviti prije primjene ispitivane supstance i po završetku ispitivanja, najbolje kod svih životinja, ali najmanje u grupama koje primaju visoku dozu i kontrolnim grupama. Ukoliko se primjete promjene na očima, pregledati sve životinje.

Pri kraju perioda izlaganja, a u svakom slučaju ne ranije od jedanaeste nedelje, obavlja se ocjena senzorne reaktivnosti na podražaje različitih vrsta[1] (npr. zvučne, vizuelne i proprioceptivne podražaje) , ocjena jačine stiska i ocjena motorne aktivnosti.

Izostavljaju se funkcionalna posmatranja koja se obavljaju pri kraju ispitivanja kad postoje podaci o funkcionalnim posmatranjima iz drugih istraživanja, a dnevna klinička posmatranja nisu otkrila nikakve funkcionalne nedostatke.

Izuzetno, funkcionalna posmatranja se izostavljaju i kod grupa koje na drugi način pokazuju simptome toksičnosti do mjere koja bi znatno ometala obavljanje funkcionalnog ispitivanja.

1.5.2.1. Tjelesna masa i potrošnja hrane/vode

Sve životinje se mjere najmanje jednom nedeljno. Mjerenje potrošnje hrane obavljati najmanje jednom nedeljno. Ukoliko se ispitivana supstanca daje putem vode za piće, mjeri se i potrošnju vode, i to najmanje na nedeljnom nivou. Potrošnja vode se razmatra i u ispitivanjima koja se odnose na ishranu ili prisilno hranjenje tokom kojih dolazi do promjene u aktivnosti uzimanja tečnosti.

1.5.2.2. Hematologija i medicinska biohemija

Uzorke krvi uzeti s navedenog izvora i čuvati pod odgovarajućim uslovima, u zavisnosti od konkretnog slučaja. Na kraju perioda ispitivanja uzorci se prikupljaju neposredno prije ili u okviru postupka žrtvovanja životinja.

Na kraju perioda ispitivanja, i uvjek kada su u meĐuvremenu prikupljeni bilo kakvi uzorci krvi, obaviti sljedeća hematološka ispitivanja: hematokrit, koncentracija hemoglobina, broj eritrocita, ukupni i diferencijalni broj leukocita, broj trombocita i određivanje vremena/potencijala zgrušavanja krvi.

Medicinsko-biohemijska određivanja koja se izvode u cilju istraživanja značajnijih toksičnih efekata u tkivima, odnosno u cilju istraživanja efekata na bubrege i jetru, obaviti na uzorcima krvi svake životinje neposredno prije žrtvovanja ili u okviru postupka žrtvovanja životinja (osim kod životinja koje su umirale i/ili su žrtvovane). Slično hematološkim ispitivanjima, obavlja se uzorkovanje u meĐuvremenu i u svrhu medicinsko-biohemijskih ispitivanja. Hrana se uskraćuje životinjama tokom noći prije uzimanja uzoraka krvi. Određivanja u plazmi ili serumu obuhvataju: natrijum, kalijum, glukozu, ukupni holesterol, ureju, azot iz uree u krvi (u daljem tekstu: BUN), kreatinin, ukupne proteine i albumin i više od dva enzima indikatora hepatocelularnih efekata (poput alanin aminotransferaze, aspartat aminotransferaze, alkalne fosfataze, gama glutamil transpeptidaze i sorbitol dehidrogenaze). Obavljaju se i mjerenja dodatnih enzima (jetrenog ili drugog porijekla) i žučnih kiselina, a koji, pod određenim okolnostima, daju korisne podatke.

Opciono, tokom posljednje nedelje ispitivanja prikupljanjem zapremine urina u ograničenom vremenskom periodu obavljaju se sljedeća određivanja u okviru analize urina: izgled, volumen, osmolalnost ili specifična težina, pH, proteini, glukoza i krv/krvne ćelije. Razmotriti i ispitivanja serumskih markera opštih oštećenja tkiva. Ostala određivanja koja je potrebno obaviti, ukoliko su poznata svojstva ispitivane supstance ili postoji sumnja da utiču na srodne metaboličke profile, obuhvataju kalcijum, fosfor, vrijednost triglicerida na prazan želudac, specifične hormone, methemoglobin i holinesteraze. Navedeno je potrebno identifikovati kod hemikalija koje pripadaju određenim kategorijama ili u zavisnosti od slučaja.

Potreban je fleksibilan pristup u zavisnosti od životinjske vrste i primjećenih odnosno očekivanih efekata ispitivane supstance.

Ukoliko osnovni podaci ranijih studija ne odgovaraju, utvrĐuju se hematološki i kliničko biohemijski parametari prije početka doziranja. Ovi podaci ne utvrĐuju se prije tretmana .

1.5.2.3. Postmortalni pregled (postmortalni pregled)

Sve životinje obuhvaćene ispitivanjem podvrgavaju se detaljnom postmortalnom pregledu koji uključuje pažljiv pregled poljne površine tijela, svih tjelesnih otvora i kranijalne, torakalne i abdominalne šupljine i njihovih sadržaja. Sa jetre, bubrega, nadbubrežne žlijezde, testisa, epididimisa, uterusa, ovarijuma, grudne žlijezde, slezine, mozga i srca svake životinje (osim životinja koje su zatečene na samrti i/ili su interkurentno žrtvovane) odstraniti sva pripadajuća tkiva, zavisno od slučaja, i izmjeriti njihovu masu u vlažnom stanju što je prije moguće nakon disekcije kako bi se izbjeglo isušivanje.

U medijumumu za fiksaciju koji je najpogodniji s obzirom na vrstu tkiva i histopatološko ispitivanje koje slijedi sačuvati sljedeća tkiva: sve makro lezije, mozak (reprezentativna područja, uključujući veliki mozak, mali mozak i medulu/most), kičmenu moždinu (na tri nivoa: cervikalnoj regiji, sredini torakalne regije i lumbalnoj regiji), hipofizu, štitnu žlijezdu, paratiroidnu žlijezdu, grudnu žlijezdu, jednjak, pljuvačne žlijezde, želudac, tanko i debelo crijevo (uključujući Peyerove ploče), jetru, gušteraču, bubrege, nadbubrežne žlijezde, slezinu, srce, dušnik i pluća (očuvana naduvavanjem fiksirom i zatim uranjanjem), aortu, polne žlijezde, uterus, pomoćne polne organe, ženske mliječne žlijezde, prostatu, mokraćnu bešiku, žučnu bešiku (miš), limfne žlijezde (najbolje jedna limfna žlijezda koja pokriva put kojim se supstanca primjenjuje i druga koja je udaljena od puta kojim se supstanca primjenjuje kako bi se obuhvatili sistemski efekti), periferne
nerve (ishijatični ili tibijalni nerv) najbolje u blizini mišića, uzorak koštane srži (i/ili svježi aspirat koštane srži), kožu i oči (ukoliko su na njima primjećene promjene tokom oftalmoloških pregleda). Klinički i ostali nalazi ukazuju na potrebu ispitivanja dodatnih tkiva. Sačuvati i sve organe za koje postoji vjerovatnoća da su ciljni organi, a na osnovu poznatih svojstava ispitivane supstance.

1.5.2.4. Histopatologija

Obavlja se cjelovita histopatologije na sačuvanim organima i tkivima svih životinja u kontrolnim grupama i grupama koje su primale visoke doze. Navedenim ispitivanjima obuhvataju se životinje svih ostalih grupa doziranja, ukoliko su kod grupe koja je primala visoku dozu primjećene promjene vezane za tretman. Ispitati sve veće lezije.

Ako se koristi prateća grupa, histopatologija se obavlja na tkivima i organima na kojima je primjećeno ipoljavanje efekata u tretiranim grupama.

2. Podaci

Podaci se navode pojedinačno, tabelarno, tako što se navode: broj životinja na početku ispitivanja u svakoj ispitivanoj grupi, broj životinja koje su pronaĐene mrtve tokom ispitivanja ili su žrtvovane iz humanih razloga, kao i vrijeme svake smrti ili humanog žrtvovanja, broj životinja

kod kojih su se pojavili simptomi toksičnosti, opis primjećenih simptoma toksičnosti, uključujući vrijeme njihovog nastepena, trajanje i ozbiljnost svakog toksičnog efekta, broj životinja kod kojih su se javile lezije, vrsta lezija i procent životinja kod kojih se pojavila svaka vrsta lezija.

Numerički rezultati se procjenjuju pomoću odgovarajuće i opšteprihvaćene statističke metode. Statističke metode i podaci koji se analiziraju biraju se tokom osmišljavanja ispitivanja.

3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o: 1) Ispitivanoj supstanci:

- fizička svojstva, čistoća i fizička i hemijska svojstva; - podaci za identifikaciju; - vehikulum (ukoliko odgovara): razlozi za izbor vehikuluma, ukoliko nije reč o vodi. 2) Vrsti životinja koje se ispituju:
- upotrijebljena vrsta i soj; - broj, starost i pol životinja;
- porijeklo, uslovi smještaja, ishrana, itd.;
- pojedinačna tjelesna masa životinja na početku ispitivanja. 3) Uslovima ispitivanja:
- logička osnova za izbor nivoa doza;
- detalji o pripremanju ispitivane supstance/pripremanju hrane, postignuta koncentracija, stabilnost i homogenost preparata;
- detalji o načinu primjene ispitivane supstance na životinjama;
- stvarne doze (mg/kg TM/dnevno) i faktor preračunavanja koncentracije ispitivane supstance u hrani/vodi za piće (ppm) u stvarnu dozu, ukoliko je primjenjivo na konkretan slučaj;
- detalji o kvalitetu hrane i vode.

4) Rezultatima:

- tjelesna masa i promjene u tjelesnoj masi;
- potrošnja hrane i vode, ako je merodavno;
- podaci o toksičnoj reakciji po polu i nivou doze, uključujući simptome toksičnosti;
- priroda, ozbiljnost i trajanje kliničkih zapažanja (bilo u slučaju prolaznih, bilo neprolaznih efekata);
- rezultati oftalmološkog pregleda;
- ocjene senzorne aktivnosti, jačine stiska i motornih aktivnosti (kad je moguće);
- hematološka ispitivanja sa relevantnim osnovnim vrijednostima;
- medicinsko biohemijska ispitivanja sa relevantnim osnovnim vrijednostima;
- tjelesna masa po žrtvovanju, masa organa i odnos mase organa/TM; - obdukcioni nalazi;
- detaljan opis svih histopatoloških nalaza; - podaci o apsorpciji ukoliko postoje;
- statistička obrada rezultata, kada odgovara.

5) Obrazloženju rezultata. 6) Zaključcima.

B.27. SUBHRONIČNA ORALNA TOKSIČNOST PONOVLJENIH DOZA - STUDIJA ORALNE TOKSIČNOSTI NA NE-GLODARIMA, 90 DANA

1. Metoda ispitivanja

Metoda ispitivanja subhronične oralne toksičnosti ponovljenih doza zasniva se na metodi OECD: TG 409 (1998).

1.1. Uvod

Prilikom vrednovanja i ocjene toksičnih svojstava hemikalije određuju se subhronične oralne toksičnosti primjenom ponovljenih doza, a nakon što su, na osnovu 28-dnevnih ispitivanja toksičnosti, primjenom akutne ili ponovljenih doza, dobijeni početni podaci o toksičnosti. Devedesetodnevno ispitivanje daje podatke o mogućim opasnostima po zdravlje koje vjerovatno proizilaze iz ponavljane izloženosti tokom perioda ubrzanog rasta i ulaska u mlađe odraslo doba. Ispitivanje daje podatke o značajnijim toksičnim efektima, naznačava ciljne organe i mogućnost kumulacije, i pruža procjenu nivoa ekspozicije pri kome nisu opaženi neželjeni efekti, a koji se primjenjuje prilikom izbora nivoa doze za ispitivanja u kojima se primjenjuju hronične doze, kao i prilikom utvrĐivanja kriterijuma bezbijednosti kod izlaganja ljudi.

Eksperimentalna metoda omogućava prepoznavanje štetnih efekata koji se javljaju kod vrsta koje nisu glodari prilikom izlaganja hemikalijama. Ovu metodu koristiti isključivo:
- kad efekti primjećeni u drugim ispitivanjima ukazuju na potrebu za razjašnjenjem/ karakterizacijom kod druge vrste koja ne pripada rodu glodara ili
- kada toksikokinetička ispitivanja pokazuju da je korišćenje specifične vrste ne-glodara najrelevantniji izbor laboratorijaske životinje ili
- u slučajevima kad ostali specifični razlozi opravdavaju upotrebu određene vrste ne-glodara.

1.2. Definicije

Doza je količina ispitivane supstance koja se primjenjuje, izražava se kao masa (g, mg) ili kao masa ispitivane supstance po jedinici tjelesne mase eksperimentalne životinje (npr. mg/kg) ili u obliku konstantnih prehrambenih koncentracija (ppm).

Doziranje je opšti pojam koji obuhvata dozu, njenu učestalost i vremensko trajanje doziranja.

NOAEL je skraćenica za nivo na kojem nisu opaženi neželjeni efekti i predstavlja najviši nivo doze pri kojoj ne postoje nikakvi štetni nalazi vezani za tretman.

1.3. Princip metode

Ispitivana supstanca primjenjuje se dnevno oralnim putem i u progresivnim dozama kod nekoliko grupa eksperimentalnih životinja, i to jedan dozni nivo po grupi tokom 90 dana. Tokom perioda primjene životinje se posmatraju zbog uočavanja simptoma toksičnosti. Na životinjama koje uginu ili budu žrtvovane tokom ispitivanja obavlja se postmortalni pregled, dok se, po zaključenju ispitivanja, preživjele životinje takoĐe žrtvuju i postmortalno pregledaju.

1.4. Opis metode

1.4.1. Izbor životinjske vrste

Najčešće korišćena vrsta ne-glodara je pas koji je određene pasmine. Često se koristi bigl (kratkonogi pas zečar). Ostale vrste, poput svinja i patuljastih svinja takoĐe se koriste. Ne koriste se primati. Neophodno je koristiti mlade zdrave životinje. U slučaju pasa s doziranjem je najbolje započeti pri starosti od 4 do 6 mjeseci i ne kasnije od 9 mjeseci starosti. Kad se istraživanje obavlja kao preliminarno, prije dugotrajnog ispitivanja hronične toksičnosti, u oba ispitivanja upotrijebiti istu vrstu/pasminu životinja.

1.4.2. Priprema životinja

Prilikom ispitivanja koriste se zdrave mlade životinje koje su se aklimatizovale na laboratorijaske uslove i koje nisu bile predmet prethodnih eksperimentalnih postupaka. Trajanje aklimatizacije zavisi od odabrane eksperimentalne životinjske vrste i njenog porijekla. Preporučuje se aklimatizacija u trajanju od najmanje pet dana za pse ili svinje uzgojene u tu svrhu, a koje pripadaju koloniji životinja trajno smještenoj na lokaciji ispitivanja, i najmanje dvije nedelje za iste životinje ukoliko potiču iz poljašnjih izvora. Eksperimentalne životinje se označavaju s obzirom na njihovu vrstu, soj, porijeklo, pol, težinu i/ili starost. Životinje se nasumično dodjeljuju kontrolnim grupama i grupama koje se tretiraju. Kavezi su razmješteni na način kojim će mogući efekti koji proizlaze iz položaja kaveza biti svedeni na najmanju moguću mjeru. Svakoj životinji se dodjeljuje jedinstveni identifikacioni broj.

1.4.3. Priprema doza

Ispitivana supstanca se daje putem hrane ili vode za piće, prisilnim hranjenjem (putem intubacione cijevi) ili u obliku kapsula. Metoda oralne primjene zavisi od svrhe ispitivanja, kao i od fizičkih i hemijskih svojstava ispitivane supstance.

Ispitivana supstanca se rastvara ili suspenduje u odgovarajućem medijumumu. Uzeti u obzir primjenu vodenog rastvora/suspenzije, nakon čega se razmatraju rastvori/emulzije u ulju (npr. kukuruzno ulje), a tek nakon toga moguće rastvaranje u ostalim vehikulumima. Za sve vehikulume, osim vode, poznata su toksična svojstva. Utvrditi stabilnost ispitivane supstance u uslovima primjene.

1.5. Postupak

1.5.1. Broj i pol životinja

Prilikom ispitivanje svake doze upotrijebiti najmanje osam životinja (četiri ženke i četiri mužjaka). Ukoliko se u međuvremenu planira žrtvovanje, broj povećati za broj životinja čije se žrtvovanje planira prije zaključenja ispitivanja. Broj životinja na kraju ispitivanja odgovara za značajno vrednovanje toksičnih efekata. Na osnovu prethodnog znanja o supstanci ili njenom bliskom analogu, uzeti u obzir uključivanje dodatne prateće grupe od osam životinja (četiri po polu) u kontrolnu grupu i grupu koja prima najvišu dozu, a zbog praćenja prolaznosti (reverzibilnosti) ili postojanosti bilo kog od toksičnih efekata po isteku perioda tretiranja. Trajanje ovoga perioda nakon tretiranja utvrđuje se u skladu sa opaženim efektima.

1.5.2. Doziranje

Upotrebljava se najmanje tri nivoa doze i istovremena kontrola, osim u slučajevima kada se obavlja ispitivanje granične doze (tačka 1.5.3. ove metode). Nivoi doze mogu se zasnivati na rezultatima ispitivanja s ponovljenom dozom ili na rezultatima ispitivanja namijenjenog utvrđivanju raspona. Uzeti u obzir sve postojeće toksikološke i toksikokinetičke podatke koji postoje za ispitivano jedinjenje ili srodne materije. Osim ukoliko nije ograničena fizičkom i hemijskom prirodom ili biološkim efektima ispitivane supstance, najviša doza se bira sa ciljem da izazove toksičnost, ali ne smrt ili ozbiljne tegobe. Opadajući niz doza bira se s namjerom da

se dokažu bilo kakve reakcije povezane sa doziranjem, kao i nivoa pri kome se ne opažaju neželjeni efekti (NOAEL) pri najnižoj dozi. Dvostruki intervali, pa sve do četvorostrukih, najčešće su optimalni za uspostavljanje silaznih doza, dok je dodavanje četvrte eksperimentalne grupe često preporučljivije od korišćenja vrlo velikih intervala između doziranja.

Kontrolna grupa je ona koja se ne tretira ili kontrolna grupa koja se tretira samo vehikulumem ukoliko se isti koristi prilikom davanja ispitivane supstance. Izuzev načina tretiranja ispitivanom supstancom, sa životinjama u kontrolnoj grupi postupati na način kao i sa eksperimentalnim grupama. Ukoliko se koristi vehikulum, kontrolna grupa dobija vehikulum u najvišoj količini koja se primjenjuje. Ukoliko se ispitivana supstanca daje zajedno s hranom i uzrokuje smanjen unos hrane tada, u razlikovanju smanjenog unosa uzrokovanog ukusom ili toksikološkim promjenama kod eksperimentalnog modela, koristi paralelno hranjene kontrolne grupe.

Uzimaju se u obzir sljedeća svojstva vehikuluma i ostalih dodataka, u zavisnosti od slučaja: djelovanje na apsorpciju, raspoDijelu, metabolizam ili zadržavanje ispitivane supstance; dejstvo na hemijska svojstva ispitivane supstance koje mijenja njena toksična svojstva i djelovanje na potrošnju hrane i vode ili stanje uhranjenosti životinja.

1.5.3. Ispitivanje granične doze

Ukoliko prilikom ispitivanja sa jednim nivoom doze, koja je najmanje jednaka nivou od 1.000 mg/kg TM/dnevno, u eksperimentu u kome se koriste postupci opisani za ovo ispitivanje, ne nastanu nikakvi štetni efekti i ukoliko se toksičnost ne očekuje na osnovu podataka o strukturno srodnim supstancama, nije neophodno cjelokupno ispitivanje koje primjenjuje tri nivoa doziranja. Ispitivanje granične doze se ne primjenjuje samo u slučajevima kada izloženost ljudi ukazuje na potrebu za primjenom veće doze.

1.5.4. Primjena doza

Ispitivana supstanca se životinjama daje svakodnevno, sedam dana nedeljno tokom perioda od 90 dana. Bilo koji drugi režim doziranja, na primjer, pet dana nedeljno, opravdati. Kada se ispitivana supstanca primjenjuje putem intubacione cijevi (prisilno hranjenje), životinjama koje koriste želudačnu cijev ili odgovarajuću intubacionu kanilu, dati u obliku jedne doze. Maksimalna zapremina tečnosti koja se daje odjednom zavisi od veličine eksperimentalne životinje. Neophodno je držati zapreminu na najnižem mogućem nivou. Izuzev u slučaju iritabilnih ili korozivnih supstanci kod kojih se obično lošiji efekti pokazuju pri višim koncentracijama, varijabilnost eksperimentalne zapremine svesti na najmanju moguću mjeru prilagoĐavanjem koncentracije, a kako bi se obezbijedila konstantna zapremina pri svim nivoima doza.

Kod supstance koje se daju putem hrane ili vode za piće obezbijediti da količine ispitivane supstance o kojoj je riječ ne ometaju redovnu ishranu i ravnotežu vode. Kad se ispitivana supstanca primjenjuje hranom, primjeniti konstantnu prehrambenu koncentraciju (ppm) ili konstantnu dozu u odnosu na tjelesnu masu životinje. Alternativa koja se koristi se označava. U slučaju supstance koja se daje prisilnim hranjenjem (intubacionom cijevi) ili u obliku kapsula, dozu dati svaki dan u isto vrijeme i prilagoditi kako bi se održala konstantna doza u odnosu na tjelesnu masu životinje. Kad se 90-dnevno ispitivanje koristi kao preliminarno ispitivanje dugotrajnog ispitivanja hronične toksičnosti, u oba ispitivanja primjeniti sličan način ishrane.

1.5.5. Opažanja

Posmatranje traje najmanje 90 dana. Životinje u pratećoj grupi za koje se planiraju dodatna praćenja potrebno je, odgovarajuće vrijeme, držati bez tretmana, a kako bi se otkrila postojanost ili oporavak od toksičnih efekata.

Opšti klinički pregled obavljati najmanje jednom dnevno, najbolje u isto vrijeme svakog dana, uzimajući u obzir najznačajniji period u kome se očekuje pojava efekata nakon doziranja. Zabilježiti kliničko stanje životinja. Najmanje dvaput dnevno, obično početkom i krajem svakog dana, sve životinje se provjeravaju na simptome morbiditeta i mortaliteta.

Najmanje jednom prije prvog izlaganja (kako bi se omogućilo poređenje kod istih ispitanika) i jednom nedeljno nakon toga, vrši se detaljno kliničko praćenje stanja svih životinja. Navedena opažanja obaviti izvan kaveza u kojem životinja inače boravi, najbolje u standardnom očvrstenju i svaki put u slično vrijeme. Odstepena u uslovima posmatranja moraju biti minimalna. Simptomi toksičnosti se registruju, uključujući vrijeme njihovog nastepena, stepen i trajanje. Opažanja obuhvataju, ali ne i da budu ograničena na: promjene na koži, krznu, očima, mukoznim membranama, nastanak sekrecija i izlučevina i autonomnu aktivnost (npr. suzenje, piloerekcija - podizanje dlake, veličina zenica, neobična respiratorna struktura).

Registrovati i promjene u hodu, držanju i reakciji na manipulisanje, kao i postojanje kloničkih ili toničkih pokreta i šablona u ponašanju (npr. pretjerano negovanje poljašnosti, ponovljeno čvrstenje) ili neobično ponašanje.

Oftalmološki pregled, korišćenjem oftalmoskopa ili odgovarajuće opreme, obavlja se prije davanja ispitivane supstance i nakon završetka ispitivanja, najbolje kod svih životinja ili bar u grupama koje primaju visoku dozu i u kontrolnim grupama. Ukoliko se primjete promjene na očima, pregledati sve životinje.

1.5.5.1. Tjelesna masa i potrošnja hrane/vode

Sve životinje se mjere najmanje jednom nedeljno. Mjerenje potrošnje hrane obavlja se najmanje jednom nedeljno. Ukoliko se ispitivana supstanca daje zajedno sa vodom za piće, mjeri se i potrošnja vode, i to najmanje na nedeljnom nivou. Potrošnja vode se uzima u obzir i u ispitivanjima koja se odnose na ishranu ili prisilno hranjenje tokom kojih može doći do promjene u aktivnosti uzimanja tečnosti.

1.5.5.2. Hematologija i medicinska biohemija

Uzorke krvi uzeti sa navedenog mjesta i čuvati u odgovarajućim uslovima, u zavisnosti od konkretnog slučaja. Na kraju perioda ispitivanja uzorci se prikupljaju neposredno prije ili prilikom postupka žrtvovanja životinja.

Na početku ispitivanja, zatim u mjesečnim intervalima ili na sredini ispitivanja i na kraju ispitivanja, sprovodi se hematološko ispitivanje, uključujući, hematokrit, koncentraciju hemoglobina, broj eritrocita, ukupni i diferencijalni broj leukocita, broj trombocita i mjerenje potencijala zgrušavanja, poput vremena zgrušavanja, protrombinskog vremena ili tromboplastinskog vremena.

Određivanja iz područja medicinske biohemije s ciljem istraživanja značajnijih toksičnih efekata u tkivima, odnosno efekta na bubrege i jetru, obaviti na uzorcima krvi dobijenim od svake životinje na početku, zatim u mjesečnim intervalima ili na sredini ispitivanja i na kraju ispitivanja. Područja ispitivanja koja se uzimaju u obzir obuhvataju ravnotežu elektrolita, metabolizam ugljenih hidrata i funkciju jetre i bubrega. Na izbor specifičnih ispitivanja utiču zapažanja o načinu djelovanja ispitivane supstance. Preporučuje se gladovanje kod životinja prije uzimanja uzoraka krvi tokom vremenskog perioda koje odgovara pojedinoj životinjskoj vrsti. Preporučena određivanja obuhvataju utvrĐivanje: nivoa kalcijuma, fosfora, hlorida, natrijuma, kalijuma, vrijednosti glukoze na prazan želudac, alanin aminotransferaze, aspartat aminotransferaze, ornitin dekarboksilaze, gama glutamil transpeptidaze, azota iz uree, albumina, kreatinina u krvi i mjerenje ukupnog bilirubina i ukupnih proteina u serumu.

Analize mokraće izvesti najmanje na početku, zatim na sredini i na kraju ispitivanja, prikupljanjem zapremine mokraće u odgovarajućem vremenskom periodu. Analiza mokraće obuhvata izgled, volumen, osmolalnost i specifičnu težinu, pH, proteine, glukozu i krv/krvne ćelije. Primjenjuju se i dodatni parametri u slučajevima kad se proširuje ispitivanje primjećenih efekata.

Razmotriti i ispitivanja namijenjena istraživanju serumskih markera opštih tkivnih oštećenja. Ostala opažanja koja su potrebna zbog donošenja odgovarajuće toksikološke ocjene obuhvataju: analizu lipida, hormona, acido-bazne ravnoteže, methemoglobina i inhibicije holinesteraze. Koristiti analize medicinske biohemije kada je potrebno proširiti ispitivanje zapaženih efekata. Navedene efekte identifikovati kod hemikalija koje pripadaju određenim kategorijama opasnosti ili u zavisnosti od konkretnog slučaja.

Potreban je fleksibilan pristup, u zavisnosti od životinjske vrste i zapaženih odnosno očekivanih efekata ispitivane supstance.

1.5.5.3. Postmortalni pregled (makro-nekropsija)

Sve životinje obuhvaćene ispitivanjem podvrgavaju se detaljnom postmortalnom pregledu koji uključuje pažljiv pregled poljnje površine tijela, svih tjelesnih otvora i kranijalne, torakalne i abdominalne šupljine i njihovih sadržaja. Sa jetre sa žučnom kesicom, bubrega, nadbubrežne žlijezde, testisa, epididimisa, ovarijuma, uterusa, štitne žlijezde (sa paratiroidnim žlijezdama), grudne žlijezde, slezine, mozga i srca svake životinje (osim životinja koje su zatečene na umiranju i/ili su žrtvovane) potrebno je odstraniti sva pripadajuća tkiva, u zavisnosti od slučaja, izmjeriti njihovu težinu u vlažnom stanju što je pre moguće nakon disekcije kako bi se izbjeglo isušivanje. U medijumumu fiksacije koji je najprikladniji s obzirom na vrstu tkiva i histopatološko ispitivanje koje slijedi potrebno je sačuvati sljedeća tkiva: sve makro lezije, mozak (reprezentativna područja, uključujući veliki mozak, mali mozak i medulu/most), kičmenu moždinu (na tri nivoa: cervikalnoj regiji, sredini torakalne regije i lumbalnoj regiji), hipofizu, oči, štitnu žlijezdu, paratiroidnu žlijezdu, grudnu žlijezdu, jednjak, pljuvačne žlijezde, želudac, tanko i debelo crijevo (uključujući Peyerove ploče), jetra, žučnu kesu, pankreas, bubrege, nadbubrežne žlijezde, slezinu, srce, dušnik i pluća, aortu, polne žlijezde, uterus, pomoćne polne organe, ženske mliječne žlijezde, prostatu, mokraćnu bešiku, limfne žlijezde (najbolje jedna limfna žlijezda koja pokriva put primjene supstance i druga koja je udaljena od puta kojim se supstanca primjenjuje kako bi se njome obuhvatili sistemski efekti), periferne živce (ishijatični ili tibijalni živac) najbolje u blizini mišića, uzorak koštane srži (i/ili svježi aspirat koštane srži) i

kožu. Klinički i ostali nalazi mogu da ukažu na potrebu ispitivanja dodatnih tkiva. Sačuvati i sve organe za koje postoji vjerovatnoća da su ciljni organi, a na osnovu poznatih svojstava ispitivane supstance.

1.5.5.4. Histopatologija

Obaviti cjelovitu histopatologiju na sačuvanim organima i tkivima, bar svih životinja u kontrolnim grupama i grupama koje su primale visoke doze. Navedenim ispitivanjima obuhvataju se životinje svih ostalih grupa doziranja, a ukoliko kod grupe koja je primala visoku dozu budu primjećene promjene vezane za tretman. Ispituju se sve makro-lezije.

Ako se koristi prateća grupa, histopatologija se obavlja na tkivima i organima za koja je zaključeno da se na njima pokazuju efekti u tretiranim grupama.

2. Podaci

Navesti podatke koji se odnose na pojedinačne životinje. Podaci se navode tabelarno i prikazuju: broj životinja na početku ispitivanja u svakoj eksperimentalnoj grupi, broj životinja koje su pronaĐene mrtve tokom ispitivanja ili su žrtvovane iz humanih razloga, kao i vrijeme svake smrti ili humanog žrtvovanja, broj životinja kod kojih su se pojavili simptomi toksičnosti, opis zapaženih simptoma toksičnosti, uključujući vrijeme njihovog nastepena, trajanje i ozbiljnost svakog toksičnog efekta, broj životinja kod kojih su se javile lezije, vrsta lezija i procenat životinja kod kojih se pojavila svaka pojedina vrsta lezija.

Numerički rezultati se procjenjuju pomoću odgovarajuće i opšteprihvaćene statističke metode. Statističke metode i podaci koji se analiziraju biraju se tokom osmišljavanja ispitivanja.

3.Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o: 1) Ispitivanoj supstanci:
- fizička svojstva, čistoća i fizička i hemijska svojstva; - podaci za identifikaciju; - vehikulum (ukoliko odgovara): razlozi za izbor vehikuluma, ukoliko nije reč o vodi. 2) Eksperimentalnoj životinjskoj vrsti:
- upotrijebljena vrsta i soj;
- broj, starost i pol životinja;
- porijeklo, uslovi smještaja, ishrana, itd.;
- pojedinačna tjelesna masa životinja na početku ispitivanja. 3) Uslovima ispitivanja:
- logička osnova za izbor nivoa doze;
- detalji o pripremanju ispitivane supstance/pripremanju hrane, postignuta koncentracija, stabilnost i homogenost preparata;
- detalji o načinu primjene ispitivane supstance na životinjama;
- stvarne doze (mg/kg TM/dnevno) i faktor preračunavanja koncentracije ispitivane supstance u hrani/vodi za piće (ppm) u stvarnu dozu, ukoliko je primjenjivo na konkretan slučaj;
- detalji o kvalitetu hrane i vode.

4) Rezultatima:
- tjelesna masa i promjene u tjelesnoj masi;
- potrošnja hrane i vode, ako je bitno;

- podaci o toksičnom efektu po polu i nivou doze, uključujući simptome toksičnosti;
- svojstva, tačnost i trajanje kliničkih posmatranja (bilo u slučaju reverzibilnih, bilo ireverzibilnih efekata);
- oftalmološki pregled;
- hematološka ispitivanja s relevantnim osnovnim vrijednostima;
- medicinsko-biohemijska ispitivanja sa relevantnim osnovnim vrijednostima;
- tjelesna masa po žrtvovanju, težine organa i odnosi težine organa/TM; - obdukcioni nalazi;
- detaljan opis svih histopatoloških nalaza; - podaci o apsorpciji ukoliko postoje; - statistička obrada rezultata, kada odgovara.

5) Obrazloženju rezultata. 6) Zaključcima.

B.28. SUBHRONIČNA DERMALNA TOKSIČNOST - STUDIJA PONOVLJENIH DERMALNIH DOZA NA GLODARIMA, 90 DANA

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

1.2. Definicije

Definicije su date u Opšti uvod.

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance nijesu propisane.

1.4. Princip metode

Ispitivana supstanca se svakodnevno i u progresivnim dozama nanosi na kožu nekoliko grupa eksperimentalnih životinja i to jedna doza po grupi tokom 90 dana. Tokom perioda primjene životinje se svakodnevno posmatraju zbog uočavanja simptoma toksičnosti. Na životinjama koje uginu tokom ispitivanja obavlja se postmortalni pregled, dok se, po zaključenju ispitivanja, preživjele životinje takođe žrtvuju i postmortalno pregledaju.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta nijesu propisani.

1.6. Opis metode

1.6.1. Priprema

Životinje se drže u uslovima eksperimentalnog smještaja i ishrane tokom najmanje pet dana prije ispitivanja. Prije ispitivanja, zdrave i mlade životinje se slučajnim izborom biraju i dodjeljuju tretiranim i kontrolnim grupama. S leđnog dijela trupa eksperimentalnih životinja neposredno prije ispitivanja ošiša se krzno. Moguće je brijanje, ali se obavlja oko 24 sata prije ispitivanja. Šišanje ili brijanje se ponavlja svake nedelje. Prilikom šišanja ili brijanja krzna ne oštetiti kožu.

Za primjenu supstance koja se ispituje ukloniti krzno s najmanje 10% površine tijela. Prilikom odlučivanja o veličini površine tijela sa koje se ukljanja krzno i o dimenzijama prekrivanja supstancom koja se ispituje uzima se u obzir tjelesna masa životinje. Kad se ispituju čvrste supstance, koje se i pulverizuju, supstancu koja se ispituje navlažiti vodom ili odgovarajućim vehikulumem, kako bi se obezbijedio kvalitetan kontakt s kožom. Tečne supstance koje se ispituju se koriste nerazblažene. Primjenjuje se režim svakodnevne primjene tokom perioda od pet do sedam dana nedeljno.

1.6.2. Uslovi ispitivanja

1.6.2.1. Eksperimentalne životinje

Upotrebljavaju se odrasli pacovi, zečevi ili zamorci. Upotrijebljavaju se i ostale životinjske vrste, s tim da je njihova primjena bude opravdana. Prilikom započinjanja ispitivanja raspon odstepena u tjelesnoj masi je ± 20% prosječne tjelesne mase. Kada se ispitivanje subhronične dermalne toksičnosti obavlja kao preliminarno, prije dugotrajnog ispitivanja, u oba ispitivanja upotrijebiti životinje iste vrste i istog soja.

1.6.2.2. Broj i pol

Prilikom ispitivanja svakog nivoa doze upotrijebiti najmanje 20 životinja (deset ženki i deset mužjaka) zdrave kože. Biraju se ženke koje nisu ranije raĐale i koje nisu gravidne. Ukoliko se u meĐuvremenu planira žrtvovanje, broj se povečava za broj životinja čije se žrtvovanje planira prije zaključenja ispitivanja. Uključuje se i prateća grupa od 20 životinja (10 po polu) kod kojih se primjenjuje visok dozni nivo tokom 90 dana i prati prolaznost (reverzibilnost), postojanost ili odložena pojava toksičnih efekata tokom perioda od 28 dana po isteku perioda tretiranja.
1.6.2.3. Dozni nivoi

Upotrebljava se najmanje tri nivoa doze na kontrolnom uzorku i uzorku namjenjenom kontroli vehikuluma, ukoliko se primjenjuje vehikulum. Vrijeme izlaganja je najmanje šest sati dnevno. Eksperimentalna supstanca se primjenjuje u isto vrijeme svakog dana, a količina supstance koja se primjenjuje periodično se prilagoĐava (nedeljno ili dvonedeljno) s ciljem održavanja konstantnog nivoa doze s obzirom na tjelesnu masu životinje. Izuzev tretiranja ispitivanom supstancom, sa životinjama u kontrolnoj grupi postupa se na isti način kao s ispitanicima u eksperimentalnim grupama. Kada se zbog lakšeg doziranja koristi vehikulum, kontrolna grupa namijenjena kontroli vehikuluma dozira se na isti način kao i tretirane grupe i prima količinu vehikuluma jednaku onoj koju prima grupa s najvišim nivoom doze. Najviši dozni nivo dovedi do toksičnih efekata, dok smrtnih poslijedica ne bude ili je njihov broj zanemarljiv. Najniži dozni nivo ne proizvodi bilo kakve dokaze toksičnosti. U situacijama kad postoji primjenjiva procjena nivoa izloženosti ljudi ispitivanoj supstanci, najniži dozni nivo prekoračuje navedeni nivo. U idealnom slučaju, srednji dozni nivo dovedi do minimalnih vidljivih toksičnih efekata. Ukoliko se koristi više od jedne srednje doze, dozni nivoi je raspoređen na način koji za poslijedicu ima gradaciju toksičnih efekata. U nižim srednjim grupama, kao i u kontrolnim grupama, incidenca smrtnih poslijedica je niska, kako bi se omogućila pravilna procjena rezultata.

Ukoliko primjena supstance koja se ispituje za poslijedicu ima ozbiljnu iritaciju kože, smanjiti koncentraciju, što dovodi do smanjenja ili nejavljanja ostalih toksičnih efekata pri najvišem nivou

doze. Ukoliko je koža teško oštećena ispitivanje se prekida organizuje se novo ispitivanje uz korišćenje nižih koncentracija.

1.6.2.4. Ispitivanje granične doze

Ukoliko prilikom preliminarnog ispitivanja sa nivoom doze od 1.000 mg/kg ili višom dozom koja je povezana s mogućom izloženosti ljudi kada je ista poznata, ne nastanu nikakvi toksični efekti, dalje ispitivanje se ne smatra neophodnim.

1.6.2.5. Period posmatranja

Eksperimentalne životinje se svakodnevno posmatraju da bi se uočili simptomi toksičnosti. Zabilježiti vrijeme smrti i vrijeme u koje su se pojavili ili nestali simptomi toksičnosti.

1.6.3. Postupak

Životinje se pojedinačno smještaju u kaveze. U idealnom slučaju životinje se ispitivanom supstancom tretiraju sedam dana nedeljno, tokom perioda od 90 dana.

Životinje u bilo kojoj pratećoj grupi, za koje je planirano naknadno posmatranje nakon završetka ispitivanja, drže se bez tretmana narednih 28 dana kako bi se otkrio oporavak od ili postojanost toksičnih efekata. Vrijeme izlaganja je šest sati dnevno.

Ispitivana supstanca se ravnodnosno nanosi na područje čija veličina iznosi oko 10% ukupne površine tijela. Kad su u pitanju visoko toksične supstance, površinsko područje koje se prekriva je manje, ali se što više navedenog područja prekriva što tanjim i ravnodnosnijim slojem. Tokom izlaganja ispitivana supstanca se održava u kontaktu s kožom pomoću poroznog zavoja od gaze i samoljepljive trake koja ne nadražuje kožu. Područje kože na kojem se ispitivanje obavlja je dodatno prekriveno, kako bi se sačuvao povoj i ispitivana supstanca i kako bi se obezbijedilo da životinje ne mogu da progutaju ispitivanu supstancu. Dijelimično imobilisati životinje kako bi se spriječilo gutanje ispitivane supstance, ali ne i potpuna imobilizacija.

Po isteku perioda izlaganja ukloniti ostatke ispitivane supstance korišćenjem vode ili neke druge odgovarajuće metode čišćenja kože.

Sve životinje se svakodnevno prate i biljleže se simptomi toksičnosti, uključujući vrijeme njihovog nastepena, stepen i trajanje. Opažanja tokom boravka životinja u kavezima obuhvataju: promjene na koži i krznu, očima, mukoznim membranama, kao i praćenje respiratornog, cirkulatornog, autonomnog i centralnog nervnog sistema i somatomotorne aktivnosti i obrazaca ponašanja. Mjeriti konzumiranje hrane i tjelesnu masu životinja na nedeljnom nivou. Posmatrati životinje kako bi se obezbijedilo da ne dođe do gubitka životinja zbog kanibalizma, autolize tkiva ili pogrešnog smještanja. Po završetku ispitivanja na svim preživjelim ispitanicima u ne-pratećim tretiranim grupama obavlja se postmortalni pregled. Životinje na samrti ukloniti i obdukovati. Na svim životinjama, uključujući kontrolne, obavljaju se sljedeća ispitivanja:

a) Oftalmološki pregled, korišćenjem oftalmoskopa ili podjednako pogodne opreme obaviti pregled prije izlaganja ispitivanoj supstanci i po završetku ispitivanja, najbolje kod svih životinja,

ali bar u grupama koje primaju visoku dozu i kontrolnim grupama. Ukoliko se zapaze promjene na očima, pregledati sve životinje.
b) Hematološka ispitivanja, koja uključuju hematokrit, koncentraciju hemoglobina, broj eritrocita, ukupni i diferencijalni broj leukocita i procjenu potencijala zgrušavanja, kao što je vrijeme zgrušavanja, protrombinsko vrijeme ili tromboplastinsko vrijeme ili broja trombocita obaviti na kraju perioda ispitivanja.
c) Određivanja u oblasti medicinske biohemije obaviti na kraju perioda ispitivanja. Oblasti koje se smatraju odgovarajućim za sva ispitivanja obuhvataju ravnotežu elektrolita, metabolizam ugljenih hidrata i funkciju jetre i bubrega. Na izbor specifičnih ispitivanja utiču opažanja o načinu djelovanja supstance. Utvrditi nivo kalcijuma, fosfora, hlorida, natrijuma, kalijuma, glukoze na prazan želudac (uz primjenu perioda gladovanja koje je odgovarajuće za određenu životinjsku vrstu), serumske glutamat piruvat transaminaze[XL], serumske glutamat oksaloacetat transaminaze ornitin dekarboksilaze, gama glutamil transpeptidaze, azota iz uree, albumina, kreatinina u krvi, ukupnog bilirubina i ukupnih proteina u serumu. Ostali nalazi koji mogu biti potrebni zbog odgovarajuće toksikološke procjene obuhvataju: analizu lipida, hormona, acidnobazne ravnoteže, methemoglobina i aktivnosti holinesteraze. Može se primjeniti dodatna medicinska biohemija kada je to potrebno zbog proširivanja istraživanja zapaženih efekata.
d) Pregled urina nije dio uobičajene prakse, nego se traži tek onda kada za to postoji indikacija na osnovu očekivane ili zapažene toksičnosti.

Ukoliko osnovni podaci prethodnih istraživanja ne odgovaraju, razmotriti da li je neophodno da se prije početka doziranja utvrde parametri hematologije i kliničke biohemije.

1.6.3.1. Postmortalni pregled (makro-nekropsija)

Sve životinje obuhvaćene ispitivanjem podvrgavaju se detaljnom postmortalnom pregledu koji uključuje pregled poljne površine tijela, svih tjelesnih otvora i kranijalne, torakalne i abdominalne šupljine i njihovih sadržaja. Jetra, bubrezi, nadbubrežne žlijezde i testisi se izmjerei što je prije moguće nakon disekcije kako bi se izbjeglo isušivanje.

U odgovarajućem medijumumu zbog mogućeg kasnijeg histopatološkog ispitivanja sačuvati sljedeće organe i tkiva: sve makro lezije, mozak-uključujući djelove medule/ponsa, kore malog mozga i moždane kore, hipofizu, štitnu/štitastu žlijezdu i tkivo grudne žlijezde, (dušnik), pluća, srce, aortu, pljuvačne žlijezde, jetru, slezinu, bubrege, nadbubrežne žlijezde, pankreas, polne žlijezde, uterus, pomoćne polne organe, žučnu kesu (ukoliko postoji), jednjak, želudac, duodenum, tanko crijevo, slijepo crijevo, debelo crijevo, mokraćnu bešiku, reprezentativni limfni čvor (ženska mlečna žlijezda), (muskulaturu bedra), periferni živac, (oči), (grudnu kost s koštanom srži), (bedrenu kost - uključujući površinu zgloba), (kičmenu moždinu na tri nivoacervikalni, srednjetorakalni i lumbalni) i (eksorbitalne suzne žlijezde). Tkiva navedena u zagradama pregledaju se samo ukoliko na to ukazuju simptomi toksičnosti ili ako su u pitanju ciljni organi.

1.6.3.2. Histopatološki pregled

a) Detaljnu histopatologiju obaviti na normalnoj i tretiranoj koži i na organima i tkivima životinja u kontrolnim grupama i grupama koje su tretirane visokim dozama. b) Predledati sve makro-lezije.

v) Ciljni organi u grupama koje su primale ostale doze se pregledaju.
g) Kada se koriste pacovi, pluća životinja u grupama tretiranim niskim i srednjim dozama se podvrgavaju histopatološkom pregledu zbog pronalaženja dokaza o infekciji, s obzirom da se time dolazi do pravilne ocjene zdravstvenog stanja životinja. Dalji histopatološki pregledi ne obavljaju se rutinski na životinjama u navedenim grupama, ali se uvjek sprovode na organima na kojima postoje dokazi lezija u visoko doziranoj grupi.
d) Ako se koristi prateća grupa, histopatologija se obavlja na tkivima i organima za koje je utvrĐeno da se na njima pokazuju efekti u ostalim tretiranim grupama.

2. Podaci

Podaci se navode tabelarno i prikazuju: broj životinja na početku ispitivanja u svakoj eksperimentalnoj grupi, broj životinja kod kojih su se pojavile lezije, vrstu lezija i procenat životinja kod kojih se pojavila svaka pojedina vrsta lezija.

Rezultati se procjenjuju pomoću odgovarajuće statističke metode i primjenjuje se bilo koja priznata statistička metoda.

3. Izvještaj

2.1. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:
- životinjskoj vrsti, soju, porijeklu, uslovima okoline, ishrani;
- uslovima ispitivanja;
- nivoima doza (uključujući vehikulum ukoliko se koristi) i koncentracije;
- toksičnom efektu prema polu i dozi;
- nivou na kome nisu opaženi bilo kakvi efekti, kada je to moguće;
- vremenu smrti tokom ispitivanja ili podatke da li su životinje preživjele do usmrćenja; - opisu toksičnih i ostalih efekata;
- vremenu zapažanja svakog patološkog znaka i njegov kasniji tok;
- hrani i tjelesnoj masi;
- oftalmološkim nalazima;
- primjenjenim hematološkim ispitivanjima i svim rezultatima;
- primjenjenim ispitivanjima medicinske biohemije i svim rezultatima (uključujući rezultate svakog pregleda mokraće); - nalazima obdukcije;
- detaljnom opisu svih histopatoloških nalaza;
- statističkoj obradi rezultata kada je moguće; - obrazloženju rezultata; - tumačenju rezultata.

3.2. Procjena i tumačenje rezultata

Procjena i tumačenje rezultata dati su u Opšti uvod.

B.29 SUBHRONIČNA INHALACIONA TOKSIČNOST - STUDIJA PONOVLJENIH INHALACIONIH DOZA NA GLODARIMA, 90 DANA

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

1.2. Definicije

Definicije su date u Opšti uvod.

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance nijesu propisane.

1.4. Princip metode

Nekoliko grupa eksperimentalnih životinja izlaže se određeno vrijeme svakodnevno supstanci koja se ispituje u rastućim koncentracijama, pri čemu se na jednu grupu primjenjuje jedna koncentracija u trajanju od 90 dana. Kada se koristi pomoćno sredstvo da bi se dobile odgovarajuće koncentracije ispitivane supstance u atmosferi, koristi se i kontrolna grupa. Za vrijeme primjene, životinje se svakodnevno posmatraju zbog otkrivanja znakova toksičnosti. Životinje koje za vrijeme ispitivanja uginu postmortalno se pregledaju, a po završetku ispitivanja i preživjele životinje se postmortalno pregledaju.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta nijesu propisani.

1.6. Opis metode 1.6.1. Pripreme

Životinje se drže i hrane pod eksperimentalnim uslovima najmanje pet dana prije ispitivanja. Prije ispitivanja, zdrave mlade životinje se nasumice izdvajaju i dodjeljuju grupama koje se tretiraju i kontrolnim grupama. Ispitivanoj supstanci dodaje se pomoćno sredstvo da bi se pripremile odgovarajuće koncentracije supstance u atmosferi. Ako se pomoćno sredstvo ili drugi dodaci koriste za olakšavanje doziranja potrebno je znati da ne proizvode toksične efekte. Ukoliko odgovara, koriste se podaci iz ranije studije.

1.6.2. Uslovi ispitivanja

1.6.2.1. Eksperimentalne životinje

Ukoliko ne postoje kontraindikacije, koriste se pacovi. Uzimaju se laboratorijaske vrste mladih zdravih životinja koje se uobičajeno koriste. Na početku studije, raspon promjena u tjelesnoj masi korišćenih životinja ne prelazi ± 20% odgovarajuće srednje vrijednosti. Ako se vodi studija subhronične inhalacije kao uvod u dugoročnu studiju, u obije studije koriste se iste vrste.

1.6.2.2. Broj i pol Za svaku koncentraciju izlaganja koristi se najmanje 20 životinja (10 ženki i 10 mužjaka). Uzimaju se ženke koje nisu ranije raĐale i koje nisu gravidne. Ako se planiraju žrtvovanja u toku eksperimenta, broj se povećava za broj životinja koje su planirane za žrtvovanje prije završetka studije. Prateća grupa od 20 životinja (10 životinja po polu) izlaže se u trajanju od deset dana visokoj koncentraciji i posmatra,

kako bi se registrovala reverzibilnost, postojanost ili zakašnjela pojava toksičnih efekata 28 dana po završetku tretmana.

1.6.2.3. Koncentracije

Ako se koristi pomoćno sredstvo, koriste se najmanje tri koncentracije, s kontrolom ili kontrolom pomoćnog sredstva (koje odgovara koncentraciji pomoćnog sredstva na najvišem nivou). Osim tretmana eksperimentalnom supstancom, prema životinjama u kontrolnoj grupi postupa se na isti način kao s onima u eksperimentalnoj grupi. Najviše koncentracije pokazuju toksične efekte, ali ni jedan smrtni slučaj ili samo nekoliko smrtnih slučajeva. Ako postoji primjenjiva procjena izloženosti ljudi, najniži nivo primjenjen na životinjama prekoračuje tu vrijednost. U idealnom slučaju, srednja koncentracija proizvodi minimalno primjetne toksične efekte. Ako se koristi više od jedne srednje koncentracije, njihove vrijednosti su dovoljno različite da se postigne gradacija toksičnih efekata. U grupama kod kojih su primjenjene niske ili srednje koncentracije, kao i kontrolnim grupama, učestalost smrtnih slučajeva kod životinja je niska, kako bi procjena rezultata imala smisla.

1.6.2.4. Vrijeme izlaganja

Dnevno vrijeme izlaganja je šest sati nakon izjednačavanja koncentracija u komorama, ali se određuju i drugi vremenski intervali kada postoje posebni zahtjevi.

1.6.2.5. Oprema

Životinje se podvrgavaju ispitivanju u inhalacionoj opremi koja je dizajnirana tako da održava konstantni protok vazduha s najmanje 12 potpunih izmjena u jednom satu, kako bi se obezbijedila odgovarajuća koncentracija kiseonika i ravnodnosno raspoređena atmosfera ekspozicije. Tamo gdje se koristi komora, njen dizajn je prostran da minimalizuje prenaseljenost životinja i maksimalizuje njihovu izloženost ispitivanoj supstanci udisanjem. Kao opšte pravilo koje obezbjeđuje stabilnost atmosfere u komori, koristi se mjera, prema kojoj ukupna zapremina eksperimentalnih životinja ne prelazi 5% zapremine komore. Koriste se i različiti tipovi komora koji omogućavaju izloženost samo oro-nazalnih otvora, glave ili čitavog tijela, pri čemu prve dvije smanjuju preuzimanje ispitivane supstance drugim putevima.

1.6.2.6. Vrijeme posmatranja

Eksperimentalne životinje posmatraju se svakog dana tokom perioda tretiranja kao i za vrijeme oporavka kako bi se uočili znaci toksičnosti. Registrovati vrijeme kad se jave ili nestanu prvi znaci trovanja, kao i vrijeme smrti.

1.6.3. Postupak

Životinje se izlažu ispitivanoj supstanci svakog dana, pet do sedam dana nedeljno, u periodu od 90 dana. Životinje iz pratećih grupa koje su predviđene za kasnija posmatranja, drže se još 20 dana bez tretmana, kako bi se utvrdila postojanost toksičnih efekata ili oporavak od istih. Temperatura na kojoj se obavlja ispitivanje se održava na 22°C ± 3°C. U idealnim uslovima, relativna vlažnost je između 30% i 70%, ali u nekim slučajevima (npr. ispitivanja aerosola) to nije izvodljivo. Za vrijeme izlaganja, životinjama se ne daje voda i hrana.

Tokom eksperimenta koristi se dinamički inhalacioni sistem s odgovarajućim sistemom analitičke kontrole koncentracije. Kako bi se uspostavile odgovarajuće koncentracije preporučuje se obavljanje probnog ispitivanja. Podesiti protok vazduha tako da se obezbijedi homogenost uslova u komori. Sistem omogućava da se stabilni uslovi izlaganja postižu što je moguće brže.

Obavljaju se mjerenja i prate sljedeći parametri: a) brzina protoka vazduha (neprekidno);
b) koncentracija ispitivane supstance mjerena u području udisanja. Za vrijeme izlaganja u toku jednog dana koncentracija ispitivane supstance ne sme da varira više od ± 15% od srednje vrijednosti. Kod prašine i aerosola, možda nije moguće postići taj nivo kontrole pa se toleriše širi opseg vrijednosti. Za vrijeme trajanja čitavog eksperimenta, koncentracije iz dana u dan moraju da se drže konstantnim koliko god je izvodljivo. Za vrijeme razvoja sistema vrše se analize veličina čestica da bi se utvrdila stabilnost koncentracija aerosola. Tokom izlaganja, analize se obavljaju u vremenskim intervalima u kojima je to neophodno za određivanje konzistencije raspodjele veličina čestica; c) temperatura i vlažnost;
d) za vrijeme i nakon izlaganja, opažanja se sistematično registruju; za svaku životinju vodi se poseban zapisnik.
Životinje se posmatraju svakodnevno, a znaci toksičnosti se evidentiraju, uključujući vrijeme njihovog prvog javljanja, stepen i trajanje. Registruju se promjene na koži i krznu, očima, sluznicama, respiratornom, cirkulatornom, autonomnom i centralnom nervnom sistemu, kao i somatomotorna aktivnost i način ponašanja. Jednom nedeljno mjere se tjelesna masa životinja i unos hrane. Pratiti životinje da bi se izbjegao njihov gubitak zbog kanibalizma, autolize tkiva ili drugo. Na kraju perioda izlaganja obavlja se postmortalni pregled svih preživjelih životinja. Životinje koje su na samrti izdvajaju se i postmortalno pregledaju, kad se primjeti da su jako slabe. Na svim životinjama, uključujući i one iz kontrolne grupe, rade se sljedeća ispitivanja:
a) oftalmološki pregled uz korišćenje oftalmoskopa ili sličnog odgovarajućeg instrumenta vrši se prije izlaganja ispitivanoj supstanci i na kraju studije, obično na svim životinjama ili bar na onima koje su bile izložene visokoj dozi i životinjama u kontrolnim grupama. Ako se otkriju promjene na očima, pregledati sve životinje;
b) hematološke analize, uključujući hematokrit, koncentraciju hemoglobina, broj eritrocita, ukupan i diferencijalni broj leukocita i potencijal zgrušavanja krvi kao što je: vrijeme zgrušavanja, protrombinsko vrijeme, tromboplastinsko vrijeme ili broj trombocita, vrše se na kraju perioda
ispitivanja;
c) medicinsko biohemijska određivanja u krvi obavljaju se na kraju perioda ispitivanja. Područja ispitivanja koja se smatraju važnim za sve studije su: ravnoteža elektrolita, metabolizam ugljenih hidrata, funkcija jetre i bubrega. Na izbor specifičnih ispitivanja utiču posmatranja mehanizma djelovanja supstance. Predložena određivanja su: kalcijum, fosfor, hlorid, natrijum, kalijum, glukoza u uslovima gladovanja (s vremenom gladovanja koje je odgovarajuće za vrstu), serumska glutamat piruvat transaminaza, serumska glutamat oksaloacetat transaminaza, ornitin deksarboksilaza, gama glutamil transpeptidaza, azot u ureji, albumin, kreatinin u krvi, ukupni bilirubin i mjerenja ukupnih proteina u serumu. Druga određivanja koja su potrebna za adekvatnu toksikološku procjenu obuhvataju: analize lipida, hormona, acidobaznu ravnotežu, methemoglobin i aktivnost holinesteraze. Dodatne biohemijske analize uključuju se kada je potrebno proširiti ispitivanje posmatranih efekata;
d) analiza urina nije rutinski potrebna, samo ako postoji indikacija zasnovana na očekivanoj ili primjećenoj toksičnosti.

Ako su osnovni podaci iz ranije studije nedovoljni, razmatra se određivanje hematoloških i medicinsko biohemijskih parametara pre početka doziranja.

1.6.3.1. Postmortalni pregled

Sve životinje podvrgavaju se detaljnom postmortalnom pregledu koji obuhvata pregled poljne površine tijela, svih otvora, lobanjske, grudne i trbušne šupljine i njihovih sadržaja. Odmah nakon sekcije, još mokri, mjere se sljedeći organi: jetra, bubrezi, žlijezde i testisi. Mjerenje se sprovodi što prije nakon sekcije, da se organi ne bi osušili. U prikladnom medijumumu za eventualni budući histopatološki pregled čuvaju se sljedeći organi i tkiva: sve velike lezije, pluća - koja se vade intaktna, mjere se i tretiraju odgovarajućim fiksativom kako bi se očuvale sve strukture organa (perfuzija s fiksativom smatra se efikasnom procedurom), nazofaringealno tkivo, mozak - uključujući dijlove moždine/pons, kore malog mozga (cerebelarni korteks) i moždane kore (cerebralni korteks), hipofizno, tiroidno/paratiroidni i bilo koje timusno tkivo, dušnik, pluća, srce, aorta, pljuvačne žlijezde, jetra, slezina, bubrezi, nadbubrežne žlijezde, gušterača, gonade, materica (pripadajući genitalni organi), (koža), žučna kesica (ako postoji), jednjak, želudac, dvanaestopalačno crijevo, tanko crijevo, slijepo crijevo, debelo crijevo, rektum, mokraćna bešika, limfni čvorovi (ženske mliječne žlijezde), (bedrena muskulatura), periferni živci, (oči), grudna kost sa koštanom srži (femur, uključujući zglobne površine) i (kičmena moždina u tri nivoa - cervikalni, srednjetorakalni i lumbalni). Tkiva navedena u zagradama pregledaju se samo ako postoje znaci toksičnosti ili ako se radi o ciljnom organu.

1.6.3.2. Histopatološka ispitivanja

a) Kompletna histopatološka posmatranja obavljaju se na respiratornom traktu i drugim organima i tkivima svih životinja u kontrolnim grupama i grupama koje su bile izložene visokim koncentracijama.
b) Sve velike lezije se pregledaju.
v) Pregledaju se ciljni organi u grupama koji su podvrgnuti drugim koncentracijama.
g) Histopatološki se pregledaju i pluća životinja koje su podvrgnute niskim i srednjim koncentracijama, jer se na taj način objektivno utvrđuje zdravstveno stanje životinja. Dalji histopatološki pregledi rutinski se ne obavljaju na životinjama u tim grupama, ali se uvjek obavljaju na organima na kojima su vidljive lezije u grupi podvrgnutoj visokoj koncentraciji.
d) Kad se koristi prateća grupa, histopatološki se obraĐuju tkiva i organi koji pokazuju iste efekte kao i kod životinja iz drugih ispitanih grupa.

2. Podaci

Podaci se navode tabelarno, gde se za svaku ispitivanu grupu životinja navodi broj životinja na početku eksperimenta, broj životinja s lezijama, vrste lezija i procenat životinja kod kojih su pronaĐene lezije. Rezultati se procjenjuju odgovarajućom statističkom metodom. Koristiti se bilo koja usvojena statistička metoda.

3. Izvještaj

3.1. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:

- vrsti, varijetetu, izvoru, uslovima okoline, ishrane;
- eksperimentalnim uslovima: opis aparature za izlaganje, uključujući dizajn, tip, dimenzije, izvor vazduha, sistem za raspršivanje aerosola, metoda kondicioniranja vazduha, obrada iskorišćenog vazduha i način čuvanja životinja u komori. Potrebno je opisati i aparaturu za mjerenje temperature, vlažnosti i kada odgovara, stabilnost koncentracija aerosola ili veličina čestica; - izlaganju ispitivanoj supstanci koji se prikazuju tabelarno zajedno sa srednjim vrijednostima i merom odstepena (npr. standardna devijacija) i moraju da obuhvate:
    a) brzinu protoka vazduha kroz inhalacionu opremu;
    b) temperaturu i vlažnost vazduha;
    c) nominalnu koncentraciju (ukupan sadržaj ispitivane supstance koja se uvodi kroz inhalacionu opremu, podijeljena sa zapreminom vazduha); d) prirodu pomoćnog sredstva, ako se koristilo;
    e) tačne koncentracije supstance u zoni udisanja;
    f) srednje veličine čestica (kada je potrebno);
- toksičnim efektima po polu i koncentraciji;
- nivou bez efekta ako je moguće;
- vremenu smrti u toku eksperimenta ili da li su životinje preživjele do kraja eksperimenta;
- opisu toksičnih ili drugih efekata;
- vremenu posmatranja bilo kakvih abnormalnosti i njihov kasniji tok;
- hranjenju i tjelesnoj masi;
- oftalmološkim nalazima;

- hematološkim ispitivanjima koja su primjenjena i nalazima;
- medicinsko-biohemijskim ispitivanjima i nalazima (uključivši nalaze analize urina); - nalazima obdukcije;
- detaljnom opisu svih histopatoloških nalaza;
- statističkoj obradi rezultata gde je moguće; - obrazloženju rezultata; - tumačenju rezultata.

3.2. Procjena i tumačenje rezultata

Procjena i tumačenje rezultata je data u Opšti uvod.

B.30. ISPITIVANJE HRONIČNE TOKSIČNOSTI

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

1.2. Definicije

Definicije su date u Opšti uvod.

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance nijesu propisane.

1.4. Princip metode

Ispitivana supstance se primjenjuje sedam dana nedeljno, odgovarajućim putem, kod nekoliko grupa eksperimentalnih životinja, jedna doza po grupi, kroz duži period njihovog životnog vijeka. Za vrijeme i nakon izloženosti ispitivanoj supstanci, eksperimentalne životinje se posmatraju svakodnevno, kako bi se otkrili znaci toksičnosti.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta nijesu propisani.

1.6. Opis metode

1.6.1. Pripreme

Životinje se drže pod eksperimentalnim uslovima čuvanja i hranjenja najmanje pet dana prije ispitivanja. Prije ispitivanja slučajnim izborom zdrave mlade životinje se svrstavaju u tretirane i kontrolne grupe.

1.6.2. Uslovi ispitivanja

1.6.2.1. Eksperimentalne životinje

Preporučena vrsta je pacov. Mogu se koristiti i druge vrste (glodara ili drugih životinja), na osnovu rezultata prethodnih studija. Ispitivanju se podvrgavaju zdravi mladi primjerci životinja onih laboratorijaskih vrsta koje se najčešće koriste u ovakvim eksperimentima, a primjena doze započinje u što kraćem vremenskom roku nakon odbijanja od sise.

Na početku studije varijacije u tjelesnoj masi korišćenih životinja ne prelaze ± 20% srednje vrijednosti. Ako se izvodi subhronična oralna studija kao uvod u dugoročnu studiju, u obije studije koriste se iste vrste i varijeteti.

1.6.2.2. Broj i pol

Za svaki dozni nivo i istovremenu kontrolnu grupu koristi se najmanje 40 životinja (20 ženki i 20 mužjaka). Uzimaju se ženke koje nikad nisu rađale i koje nisu gravidne. Ako se planiraju žrtvovanja u toku eksperimenta, broj se povećava za broj životinja koje su planirane za žrtvovanje prije završetka studije.

Za vrste koje ne pripadaju glodarima prihvatljiv je manji broj životinja, ali najmanje četiri životinje po polu po grupi.

1.6.2.3. Dozni nivoi i učestalost izlaganja

Koriste se najmanje tri nivoa doze ispitivane supstance zajedno s istovremenom kontrolnom grupom. Najviša doza pokazuje toksične efekte, ali bez velikog broja smrtnih slučajeva. Najniža doza ne izaziva i pokazuje toksičnost.

Srednja doza utvrđuje se u rasponu između visokih i niskih doza.

Kod izbora nivoa doza uzimaju se u obzir podaci iz prethodnih ispitivanja i studija toksičnosti.

Životinje se obično svakodnevno izlažu ispitivanoj supstanci. Ako se hemikalija daje u vodi za piće ili se umiješa u hranu, uvjek je na rapolaganju.

1.6.2.4. Kontrole

Istovrijemeno se koristi kontrolna grupa koje je u svakom pogledu identična eksperimentalnim grupama, osim izloženosti ispitivanoj supstanci.

U posebnim okolnostima, kao što su inhalacione studije koje obuhvataju aerosole ili korišćenje emulgatora čija biološka aktivnost nije okarakterisana u oralnim studijama, istovrijemeno se koristi i negativna kontrolna grupa. Negativna kontrolna grupa tretira se na isti način kao i eksperimentalne grupe, samo što se životinje ne izlažu ispitivanoj supstanci niti bilo kom pomoćnom sredstvu.

1.6.2.5. Put primjene

Dva glavna puta primjene su oralni i inhalacioni. Izbor puta primjene zavisi od fizičkih i hemijskih karakteristika ispitivane supstance i od mogućeg puta unosa kod ljudi.

Korišćenje dermalnog puta predstavlja praktični problem. O hroničnoj sistemskoj toksičnosti koja proizlazi iz perkutane apsorpcije izvodi se zaključak iz rezultata drugog oralnog ispitivanja i znanja o stepenu perkutane apsorpcije dobijenom iz prethodnih ispitivanja perkutane toksičnosti.

1.6.2.6. Studije sa peroralnim putem primjene

Kad se ispitivana supstanca apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta i ako je to put unosa kojim mogu biti izloženi ljudi, predlaže se peroralni put primjene, osim ako postoje kontraindikacije.

Životinje dobijaju ispitivanu supstancu u hrani, rastvorenu u vodi za piće ili im se daje u kapsulama.

Idealno je dnevno doziranje tokom sedam dana nedeljno, jer primjena određene doze na bazi pet dana nedeljno omogućava oporavak ili povlačenje toksičnosti u periodu u kojem se ne primjenjuje ispitivana supstanca i time da utiče na rezultat i kasniju procjenu. Sa stanovišta prakse, doziranje na bazi pet dana nedeljno smatra se prihvatljivim.

1.6.2.7. Studije sa inhalacionim putem primjene

Kako studije sa inhalacionim putem primjene predstavljaju tehnički problem koji je složeniji od drugih puteva primjene, ovdje se detaljnije navodi taj način primjene. Intratrahealno ulivanje je dobra alternativa u specifičnim situacijama.

Dugoročno izlaganje obično se planira prema projektovanoj izloženosti ljudi. Životinje se dnevno izlažu šest sati nakon izjednačenja koncentracija u komori, pet dana u nedjelji (isprekidana izloženost) ili, pogodnoj ambijentalnoj izloženosti, 22 do 24 sata izloženosti dnevno tokom

sedam dana nedeljno (neprekidna izloženost) sa jednim satom za hranjenje životinja u slično vrijeme svakog dana i za održavanje komore. U oba slučaja životinje se izlažu fiksnim koncentracijama ispitivane supstance. Najveća razlika između isprekidane i neprekidne izloženosti je što u prvom slučaju postoji period od 17 do 18 sati tokom koga se životinje mogu oporaviti od efekata svakodnevne izloženosti, sa čak i dužim vremenom oporavka tokom vikenda.

Izbor isprekidane ili neprekidne izloženosti zavisi od ciljeva studije i od izloženosti ljudi koja će se simulirati. Razmotriti određene tehničke teškoće. Na primjer, prednosti neprekidne izloženosti koja simulira uslove životne sredine se poništavaju potrebom davanja vode i hranjenja za vrijeme izloženosti i potrebom za složenijim (i pouzdanim) tehnikama za stvaranje i posmatranje aerosola i pare.

1.6.2.8. Komore za izlaganje

Životinje se podvrgavaju ispitivanju u inhalacionim komorama dizajniranim tako da održavaju dinamičan protok vazduha s najmanje 12 izmjena vazduha u jednom satu, kako bi se obezbijedila odgovarajuća koncentracija kiseonika i ravnodnosno raspoređena atmosfera. Kontrolne komore i komore za izlaganje su jednake u konstrukciji i dizajnirane tako da obezbjeđuju uslove izlaganja koji su uporedivi u svim pogledima, izuzev izloženosti ispitivanoj supstanci. Slabi negativni pritisak u komori se održava za sprečavanje ispuštanja ispitivane supstance u okolno područje. Komore smanjuju prenaseljenost eksperimentalnih životinja. Kao opšte pravilo koje obezbjeđuje stabilnost atmosfere u komori, koristi se mjera prema kojoj zapremina eksperimentalnih životinja ne prelazi 5% zapremine komore.

Obavljaju se mjerenja i prate sljedeći parametri:
a) Protok vazduha: brzina protoka vazduha se prati neprekidno;
b) Koncentracija: u periodu dnevnog izlaganja koncentracija ispitivane supstance ne varira više od ± 15% od srednje vrijednosti;
v) Temperatura i vlaga: za glodare se temperatura održava na 22°C ± 2°C, a vlaga u komori na 30% do 70%, osim ako se koristi voda za suspendovanje ispitivane supstance u atmosferu komore. Temperatura i vlaga prate se neprekidno;
g) Mjerenja veličine čestica: raspodjela veličine čestica određuje se u atmosferi komore koje sadrže tečne ili čvrste aerosole. Čestice aerosola su takve veličine da ih eksperimentalne životinje udišu. Uzorci vazduha komore uzimaju se u zoni disanja životinja. Uzorak vazduha je tipičan predstavnik raspodjele čestica kojima su životinje izložene i obuhvata, na gravimetrijskoj bazi, sav suspendovani aerosol, čak i ako se mnogo aerosola ne može udisati. Za vrijeme razvoja generišućeg sistema često se obavljaju analize veličine čestica da bi se obezbijedila stabilnost aerosola, a nakon toga se analize veličine čestice obavljaju onoliko često koliko zahtijeva vrijeme izlaganja, da bi se pravilno odredila konzistencija raspodjele čestica kojima su životinje bile izložene.

1.6.2.9. Trajanje ispitivanja

Period davanja je najmanje 12 mjeseci.

1.6.3. Postupak

1.6.3.1. Posmatranja

Pažljivo kliničko ispitivanje se obavlja najmanje jednom dnevno. Dodatna posmatranja obavljaju se svakodnevno uz preduzimanje odgovarajućih mjera kako bi se gubitak životinja za vrijeme izvoĐenja studije sveo na minimum, na primjer postmortalni pregled ili zaleĐavanje onih životinja koje se pronaĐu mrtve i izolacija ili žrtvovanje slabih životinja ili životinja na samrti. Obavljaju se pažljiva posmatranja da bi se otkrio početak i napredovanje toksičnih efekata, kao i da bi se sveo na minimum gubitak zbog bolesti, autolize ili kanibalizma.

Klinički znaci, uključujući neurološke promjene i promjene na očima, bilježe se za sve životinje. Bilježe se i vrijeme početka i napredovanje toksičnih efekata, uključujući sumnjive tumore.

Tjelesne mase bilježe se pojedinačno za sve životinje jednom nedeljno u prvih 13 nedjelja perioda ispitivanja, a nakon toga najmanje jednom svake četiri nedelje. Uzimanje hrane određuje se nedeljno za vrijeme prvih 13 nedjelja studije, a potom u intervalima od oko tri mjeseca, osim ako zdravstveno stanje ili promjene u tjelesnoj masi ne diktiraju drugačije.

1.6.3.2. Hematološki pregled

Hematološki pregled (npr. sadržaj hemoglobina; ukupna zapremina krvnih ćelija; ukupan broj eritrocita, ukupan broj leukocita, trombocita ili mjerenja drugih parametara koagulacije) obavlja se nakon tri mjeseca, nakon šest mjeseci, a nakon toga u intervalima od oko šest mjeseci i po završetku ispitivanja iz uzoraka krvi svih životinja koje nisu glodari i uzoraka krvi 10 pacova po polu svih grupa. Uzorci su od istih pacova u svakom intervalu. Uzimaju se i uzorci od životinja koje nisu glodari.

Ako klinička posmatranja daju nagovještaj pogoršanja zdravlja životinja za vrijeme studije, od životinja kod kojih se naslućuje pogoršanje zdravlja, uzimaju se uzorci krvi i radi se diferencijalna krvna slika.

Diferencijalna krvna slika radi se kod životinja iz grupe koja je podvrgnuta najvišoj dozi i kod kontrolne grupe. Diferencijalna krvna slika radi se kod životinja koje su podvrgnute nešto manjoj dozi samo ako postoji velika razlika između grupe sa najvišom dozom i kontrolne grupe ili ako je indikovana na osnovu patoloških nalaza.

1.6.3.3. Analiza mokraće

Za analizu se uzimaju uzorci mokraće od životinja koje nisu glodari i od 10 pacova po polu, ako je moguće od istih pacova u jednakim intervalima u kojima se obavljaju i hematološke analize. Kod pojedinačnih životinja ili na zbirnim ("pool") uzorcima po polu i po grupi za glodare određuju se:
- izgled: zapremina i gustina za pojedinačne životinje;
- proteini, glukoza, ketoni, skriveno krvarenje (semikvantitativno); - mikroskopski pregled sedimenta (semikvantitativno); - medicinska biohemija.

U intervalima od oko šest mjeseci i na kraju ispitivanja, uzimaju se uzorci krvi za medicinskobiohemijska mjerenja od svih životinja koje nisu glodari i 10 pacova po polu svih grupa, po mogućnosti od istih pacova u svakom intervalu. Uzorci za preliminarna ispitivanja uzimaju se od životinja koje nisu glodari. U plazmi tih uzoraka određuju se:

- koncentracija ukupnih proteina;

- koncentracija albumina;
-ispitivanja funkcije jetre (kao što je aktivnost alkalne fosfataze, glutaminske piruvat transaminaze, aktivnost glutaminske oksaloacetatne transaminaze), gama glutamil transpeptidaze, ornitin dekarboksilaze;
- metabolizam ugljenih hidrata, kao što je glukoza u krvi nakon gladovanja; - ispitivanja funkcije bubrega kao što je azot iz uree u krvi.

1.6.3.4. Postmortalni pregled

Postmortalni pregled se obavlja na svim životinjama, uključujući one koje su uginule za vrijeme eksperimenta ili su žrtvovane jer su bile na samrti. Prije žrtvovanja od svih životinja uzimaju se uzorci krvi za diferencijalnu krvnu sliku. Čuvaju se sve vidljive lezije, tumori ili lezije za koje se sumnja da su tumori. Dovesti u vezu opažene promjene s mikroskopskim nalazima.

Svi organi i tkiva čuvaju se za histopatološke preglede. Ovo se obično odnosi na sljedeće organe i tkiva: mozak (medula i pons, cerebelarni korteks, cerebralni korteks), hipofiza, štitna žlijezda (uključujući paratioroidnu žlijezdu), timus, pluća (uključujući traheju), srce, aorta, pljuvačne žlijezde, jetra, slezina, bubrezi, nadbubrežne žlijezde, jednjak, želudac, duodenum, tanko crijevo, slijepo crijevo, debelo crijevo, rektum, materica, mokraćna bešika, limfni čvorovi, pankreas, polne žlijezde[IX], ostali genitalni organi, kod ženki mliječne žlijezde, koža, muskulatura, periferni živci, kičmena moždina (cervikalna, torakalna, lumbalna), grudna kost s koštanom srži (uključujući zglobove) i oči. Za odgovarajući histopatološki pregled važno je naduvavanje pluća i mokraćne bešike sa fiksativom na optimalan način da se sačuvaju ta tkiva, kao i naduvavanje pluća kod inhalacionih studija. U posebnim studijama, kao što su inhalacione studije, pregleda se cjelokupan respiratorni trakt, uključujući nos, ždrijelo i grkljan.

Ako su obavljeni drugi klinički pregledi, dobijeni rezultati su na rapolaganju prije mikroskopskog pregleda, jer to može biti smjernica za patologa.

1.6.3.5. Histopatologija

Sve vidljive promjene, naročito tumori i druge lezije nastale u bilo kom organu, mikroskopski se pregledaju, na sljedeći način:
a) Mikroskopski pregled svih sačuvanih organa i tkiva s kompletnim opisom svih lezija naĐenih:
    1) kod svih životinja koje su uginule ili su žrtvovane za vrijeme studije;
    2) u svim grupama koje su dobijale visoku dozu i u kontrolnoj grupi;
b) Organi ili tkiva kod kojih su pronaĐene abnormalnosti uzrokovane ili vjerovatno uzrokovane ispitivanom supstancom ispituju se i kod životinja iz grupa sa nižom dozom;
c) Ako rezultat ispitivanja dokaže bitno skraćenje normalnog životnog vijeka životinje ili efekte koji utiču na toksičnu reakciju, naredni niži dozni nivo ispituje se na način koji je gore opisan;
d) Za ispravnu procjenu značaja promjena koje su primjećene kod tretiranih životinja neophodni su podaci o nastanku lezija do kojih obično dolazi kod vrste životinja koje se koriste, pod istim laboratorijaskim uslovima, tj. istorijski kontrolni podaci.

2. Podaci

Podaci se navode tabelarno, gdje se za svaku ispitivanu grupu životinja navodi broj životinja na početku eksperimenta, broj životinja sa lezijama i procenat životinja sa svakom vrstom lezije.

Svi dobijeni rezultati analiziraju se odgovarajućom statističkom metodom. Koristi se bilo koja usvojena statistička metoda.

3. Izvještaj

3.1. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:
- vrsti, varijetetu, izvoru, uslovima sredine, ishrane;
- eksperimentalnim uslovima: aparaturi za izlaganje ispitivanoj supstanci uključujući dizajn, vrstu, dimenzije aparature, kao i izvor vazduha, sistem za proizvodnju čestica i aerosola, metoda za kondicioniranje vazduha, obrada iskorišćenog vazduha i metoda čuvanja životinja u komori. Opisati opremu za mjerenje temperature, vlage i, gdje je moguće, stabilnost koncentracije aerosola ili veličinu čestice;
- izlaganju ispitivanoj supstanci: ovi podaci se prikazuju tabelarno sa srednjim vrijednostima i mjerama varijabilnosti (npr. standardna devijacija) i obuhvataju podatke o: a) brzini protoka vazduha kroz opremu za inhalaciju;

b) temperaturi i vlažnosti vazduha;

v) nominalnoj koncentraciji (ukupnom sadržaju ispitivane supstance koja se uvodi u opremu za inhalaciju, podijeljenim sa zapreminom vazduha); g) prirodi pomoćnog sredstva, ako je korišćen;

d) stvarnim koncentracijama supstance u zoni udisanja;

c) srednjoj veličini čestica (gdje je potrebno),
- visini doze (uključujući i pomoćno sredstvo, ako se koristilo) i koncentracije;
- toksičnoj reakciji po polu i dozi;
- nivou bez efekta;
- vremenu smrti za vrijeme studije ili da li su životinje preživjele do kraja eksperimenta;
- opis toksičnih i drugih efekata;
- vremenu kada je primjećen svaki znak abnormalnosti i njegov kasniji tok; - hrani i tjelesnoj masi;
- oftalmološkim nalazima;
- hematološkim ispitivanja i svim rezultatima;
- medicinsko biohemijskim ispitivanjima i svim rezultatima (uključujući rezultate analize urina);
- nalazima obdukcije;
- detaljan opis svih histopatoloških nalaza;
- statističkoj procjeni rezultata, gdje je moguće;
- obrazloženju rezultata;

- tumačenju rezultata.

3.2. Procjena i tumačenje rezultata

Procjena i tumačenje rezultata dati su u Opšti uvod.

1. Metoda ispitivanja

Metoda ispitivanje toksičnosti po renatalni rasti razvoj odgovaraju metodi OECD: TG 414 (2001).

1.1. Uvod

Ova metoda za ispitivanje toksičnosti po rast i razvoj namijenjena je za dobijanje opštih podataka o efektima prenatalnog izlaganja na gravidne eksperimentalne životinje i na organizam tokom rasta i razvoja u materici. Obuhvata procjenu efekata na majku, kao i smrt, strukturalne abnormalnosti ili izmjenjen rast ploda. Funkcionalni nedostaci, iako čine važan dio rasta i razvoja, nisu sastavni dio ove metode ispitivanja. Oni se ispituju u posebnoj studiji ili kao dodatak ovaj studiji, korišćenjem metode ispitivanja neurotoksičnosti po rast i razvoj. Podatke o ispitivanju funkcionalnih nedostataka i drugih efekata nakon roĐenja, potražiti u odgovarajućem ispitivanju reproduktivne toksičnosti na dvije generacije i ispitivanju neurotoksičnosti po rast i razvoj.

Ova metoda ispitivanja zahtijeva specifično prilagoĐavanje u pojedinačnim slučajevima na osnovu specifičnog znanja o npr. fizičkim i hemijskim ili toksikološkim svojstvima ispitivane supstance. Takvo prilagoĐavanje je prihvatljivo ako naučni dokazi pokazuju da će se prilagoĐavanjem dobiti bolji kvalitet podataka. U takvom slučaju, ovi naučni dokazi se pažljivo dokumentuju u izvještaju o ispitivanju.

1.2. Definicije

Toksikologija rasta i razvoja je studija o štetnim efektima na organizam tokom rasta i razvoja koji se javljaju kao poslijedica izlaganja prije začeća, tokom prenatalnog rasta i razvoja ili postnatalno do vremena polnog sazrijevanja, najveće manifestacije toksičnosti po rast i razvoj obuhvataju: 1) smrt organizma, 2) strukturalne abnormalnosti, 3) izmjenjeni rast, 4) funkcionalne nedostatke. Toksikologija rasta i razvoja se ranije nazivala teratologija.

Štetni efekat je svaka promjena polaznog stanja povezana sa tretmanom koja umanjuje sposobnost organizma da preživi, reprodukuje se ili prilagodi životnoj sredini, u najširem smislu, toksikologija rasta i razvoja obuhvata svaki efekat koji remeti normalan razvoj zametka i prije i nakon roĐenja.

Izmjenjen rast je promjena mase ili veličine organa ili organizma potomaka.

Alteracije (anomalije) su strukturne promjene u rastu i razvoju koje obuhvataju i malformacije i varijacije .

Malformacija/veća abnormalnost je strukturna promjena koja se smatra štetnom za životinju (može biti i smrtonosna) i obično je rijetka.

Varijacija/manja abnormalnost je strukturna promjena za koju se smatra da ima mali ili nikakav štetan efekt na životinju; može biti prolazna i pojavljuje relativno često u kontrolnoj populaciji. Zametak je zbir derivata oploĐenog jajašca u bilo kojoj fazi rasta i razvoja od oplodnje do roĐenja, uključujući ekstraembrionalne membrane, kao i embrion ili plod.

Implantacija (nidacija) je pripajanje blastocista na epitelni sloj materice, uključujući njegovu pjenetraciju kroz epitel materice i usaĐivanje u endometrijum.

Embrion je rana ili razvojna faza bilo kog organizma, naročito proizvoda oploĐenja jajašca koji se razvija nakon pojave dugačke ose i do pojave svih većih struktura.

Embriotoksičnost je štetnost za normalnu strukturu, razvoj, rast i/ili sposobnost preživljavanja embriona.

Plod je neroĐeni potomak u periodu nakon embrionalnog.

Fetotoksičnost je štetnost za normalnu strukturu, razvoj, rast i/ili sposobnost preživljavanja ploda.

Pobačaj je prijevremeno izbacivanje proizvoda začeća iz materice: embriona ili ploda koji nije sposoban za preživljavanje.

Resorpcija je zametak koji, nakon implantacije u matericu, kasnije umre i resorbuje se ili je resorbovan.

Rana resorpcija je dokaz o implantaciji bez prepoznatljivog embriona/ploda.

Kasna resorpcija je mrtvi embrion ili plod sa poljnjim degenerativnim promjenama.

NOAEL je skraćenica za najviši nivo doze ili izlaganja, kod koga nisu primjećeni štetni efekti povezani sa tretmanom.

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance nijesu propisane.

1.4. Princip metode

Obično se ispitivana supstanca daje gravidnim životinjama najmanje od implantacije do jednog dana prije dana planiranog žrtvovanja, koji je što bliži normalnom danu poroĐaja bez opasnosti od gubitka podataka koji proizlaze iz preranog poroĐaja. Eksperimentalna metoda nije namijenjena samo za ispitivanje perioda organogeneze (tj. 5-15 dana kod glodara i 6-18 dana kod zečeva), nego i za ispitivanje efekata od preimplantacije, ako odgovara, tokom čitavog perioda gestacije do dana prije carskog reza. Malo prije carskog reza ženke se žrtvuju, pregleda se sadržaj materice, a plodovi se procjenjuju prema poljnim vidljivim anomalijama, kao i prema promjenama na mekim tkivima i kosturu.

1.5. Opis metode

1.5.1. Izbor životinjske vrste

Preporučuje se da se ispitivanje obavlja na najrelevantnijim vrstama i da se koriste laboratorijaske vrste i varijeteti koji se obično koriste kod ispitivanja toksičnosti po prenatalni rast i razvoj.

Preporučena vrsta glodara je pacov, a preporučena vrsta koja ne pripada glodarima je kunić.

Kada se koriste životinje drugih vrsta treba navesti razlog za ovo korišćenje.

1.5.2. Uslovi smještaja i ishrana

Temperatura eksperimentalne sobe gdje se drže životinje je 22°C (± 3°C) za glodare, a 18°C (± 3°C) za kuniće. Relativna vlažnost vazduha iznosi najmanje 30% ali ne više od 70% osim kad se prostorije čiste. Vlažnost vazduha se održava između 50% i 60%. Osvetljenje je vještačko i to u intervalima 12 sati svijetla i 12 sati mraka. Za hranjenje se primjenjuju ustaljene laboratorijaske dijete sa neograničenim količinama vode za piće. Postupak parenja se izvodi u kavezima koji su odgovarajući za tu svrhu. Parene životinje se drže pojedinačno u kavezu, ali je prihvatljivo i čuvanje u malim grupama.

1.5.3. Priprema životinja

Koriste se zdrave životinje koje su se tokom najmanje pet dana privikle na laboratorijaske uslove i koje ranije nisu bile podvrgnute eksperimentalnim pokolonama. Eksperimentalne životinje se označavaju prema vrsti, varijetetu, izvoru, polu, tjelesnoj masi i/ili starosti. Životinje svih eksperimentalnih grupa su jednake tjelesne mase i starosti, koliko god je izvodljivo. Za svaki dozni nivo koriste se mlade odrasle ženke koje nisu ranije rađale. Ženke se pare s mužjacima iste vrste i varijeteta, a parenje između brata i sestre se izbjegava. Za glodare je nulti dan gestacije dan kad se uoči vaginalni čep i/ili sperma. Za kuniće je nulti dan obično dan koitusa ili veštačke oplodnje, ukoliko se koristi ova tehnika. Parene ženke dodjeljuju se slučajnim izborom kontrolnim grupama ili grupama koje se tretiraju. Kavezi su postavljeni tako da se pojava mogućih efekata zbog položaja kaveza svede na minimum. Svakoj životinji se dodjeljuje jedinstveni identifikacioni broj. Parene ženke se slučajnim izborom dodjeljuju kontrolnim grupama ili grupama koje se tretiraju, a ako su se ženke parile u gomili, životinje iz svake gomile podjednako se raspodjeljuju po grupama. Ženke koje je oplodio isti mužjak se raspodjeljuju po grupama.

1.6. Postupak

1.6.1. Broj i pol životinja

Svaka tretirana i kontrolna grupa sadrži dovoljan broj ženki, tako da se na postmortalnom pregledu nađe oko 20 ženki sa implantima. Grupe sa manje od 16 životinja sa implantima su neodgovarajuće. Studija se ne odbacuje obavezno zbog mortaliteta majki, ako se obezbijedi da mortalitet ne prelazi približno 10%.

1.6.2. Priprema doza

Ako se za lakše doziranje koristi pomoćno sredstvo ili drugi aditiv, uzimaju se u obzir sljedeće karakteristike: efekti na apsorpciju, raspodijelu, metabolizam i zadržavanje ili izlučivanje ispitivane supstance; efekti na hemijska svojstva ispitivane supstance koji mijenjaju njene toksikološke karakteristike; efekti na potrošnju hrane ili vode ili ishranjenost životinja. Pomoćno sredstvo nije toksično po rast i razvoj, niti ima efekte na reprodukciju.

1.6.3. Doziranje

Ispitivana supstanca daje se svakodnevno od implantacije (npr. peti dan nakon parenja) do dana prije planiranog carskog reza. Ako preliminarne studije, kada su dostupne, ne upućuju na

visoku opasnost od preimplantacionog gubitka, tretman se može produžiti toliko da obuhvati čitav period gestacije, od parenja do dana prije planiranog žrtvovanja. Dobro je poznato da neodgovarajuća manipulacija ili stres tokom trudnoće uzrokuju prenatalni gubitak. Radi čuvanja od prenatalnog gubitka zbog faktora koji nisu u vezi sa tretmanom, izbjegavati nepotrebnu manipulaciju skotnim životinjama, kao i stres zbog poljašnjih faktora kao što je buka.

Koriste se najmanje tri nivoa doze i istovremena kontrola. Zdrave životinje dodjeljuju se kontrolnim grupama i grupama koje se tretiraju slučajnim izborom. Dozni nivoi se dovoljno razlikuju kako bi proizvele gradaciju toksičnih efekta. Osim ako ne postoji ograničenje zbog fizičke/hemijske prirode ili bioloških svojstava ispitivane supstance, najviša doza se određuje s ciljem da izazove određenu toksičnost po rast i razvoj i/ili po majku (klinički znaci ili smanjenje tjelesne mase), ali ne smrt ili tešku patnju. Najmanje jedan srednji dozni nivo proizvodi minimalne primjetne toksične efekte. Najniži dozni nivo ne izaziva nikakav dokaz toksičnosti niti po majku niti po rast i razvoj. Opadajući niz nivoa doza bira se u cilju dokazivanja neke reakcije koja je zavisna od doziranja i nivoa pri kome nije opažen štetni efekat (NOAEL). Za određivanje opadajućih nivoa doza obično su optimalni dvostruki do četvorostruki intervali, a često se preporučuje četvrta eksperimentalna grupa umjesto primjene vrlo velikih intervala između doza (npr. više od faktora 10). Iako je cilj utvrĐivanje NOAEL-a majke, prihvatiti i studije koje ne utvrĐuju ovaj nivo[1].

Dozni nivoi biraju se uzimajući u obzir sve postojeće podatke o toksičnosti, kao i dodatne podatke o metabolizmu i toksikokinetici ispitivane supstance ili srodnih materijala. Ovi podaci pomažu i kod dokazivanja adekvatnosti režima doziranja.

Koriste se i istovremenu kontrolnu grupu. Ova grupa je prividno tretirana kontrolna grupa ili kontrolna grupa za pomoćno sredstvo, ako se ono koristi prilikom primjene ispitivane supstance. Svim grupama daje se ista zapremina ili ispitivane supstance ili pomoćnog sredstva. Sa životinjama u kontrolnim grupama postupa se na isti način kao sa onima u eksperimentalnim grupama. Kontrolne grupe pomoćnog sredstva dobiju pomoćnu materiju u najvećoj količini koja se koristi (kao kod grupa koje se tretiraju najnižim koncentracijama).

1.6.4. Ispitivanje granične doze

Ako ispitivanje na jednom nivou doze od najmanje 1.000 mg/kg TM/dan primjenjene oralno uz korišćenje postupaka opisanih u ovoj studiji ne proizvede primjetnu toksičnost kod gravidnih životinja ili kod njihovog potomstva i ako se efekat na osnovu postojećih podataka (npr. iz jedinjenja koja su strukturno i/ili metabolički slična) ne očekuje, ne treba potpuna studija uz korišćenje tri nivoa doze. Očekivana izloženost ljudi ukazuje na potrebu da se u ispitivanju granične doze koristi viša oralna doza. Za druge vrste primjene, kao što su inhalacija ili dermalna primjena, fizička i hemijska svojstva ispitivane supstance često indijuje i ograniči nivo izlaganja koji se maksimalno postiže (na primjer dermalna aplikacija ne uzrokuje izraženu lokalnu toksičnost).

1.6.5. Primjena doza

Ispitivana supstanca ili pomoćno sredstvo obično se daje oralno intubacijom. Ako se koristi drugi put primjene, lice koja obavlja ispitivanje obrazlaže svoj izbor i vjerovatno su neophodne

odgovarajuće izmjene[2]. Ispitivana supstanca se primjenjuje u približno isto vrijeme svakog dana.

Doza za pojedinačne životinje se zasniva na nakondnjoj određenoj individualnoj tjelesnoj masi. Oprez kod prilagoĐavanja doze tokom posljednjeg trimestra trudnoće. Prilikom izbora doze koriste se postojeći podaci kako bi se spriječila prekomerna toksičnost po majku. Ako se registruje prekomerna toksičnost kod tretiranih (gravidnih) ženki, te životinje se humano žrtvuju. Ako nekoliko gravidnih životinja pokaže znake prekodnosne toksičnosti, razmotriti završetak (žrtvovanje) te dozne grupe. Ako se supstanca primjenjuje oralnom sondom, životinjama se daje u jednoj dozi upotrebom želudačne cijevi ili odgovarajuće intubacione kanile. Maksimalna zapremina tečnosti koju je dozvoljeno dati odjednom zavisi od veličine eksperimentalne životinje. Zapremina nije veća od 1 ml/100 g TM, osim u slučaju vodenih rastvora gdje se koristi 2 ml/100 g TM. Ako se kao pomoćno sredstvo koristi kukuruzno ulje zapremina nije veća od 0,4 ml/100 g TM. Varijabilnost u zapremini koja se ispituje svodi se na minimum prilagoĐavanjem koncentracija kako bi se obezbijedila stalna zapremina kod svih doznih nivoa.

1.6.6. Posmatranje (gravidnih) ženki

Klinička posmatranja obavljaju se i bilježe najmanje jednom dnevno, u isto vrijeme svakog dana, uzimajući u obzir glavni period tokom koga se javljaju predviĐeni efekti nakon primjene doze. Bilježe se stanja životinja, uključujući smrtnost, stanje pred smrt, bitne promjene ponašanja i svi znaci očigledne toksičnosti.

1.6.7. Tjelesna masa i potrošnja hrane

Životinje se mjere: nultog dana gestacije i najkasnije trećeg dana gestacije ako je parenje životinje nabavio poljni uzgajivač; prvog dana doziranja; najmanje svaka tri dana tokom perioda doziranja i na dan planiranog žrtvovanja.

Potrošnja hrane bilježi se svaka tri dana i podudara se sa danima određivanja tjelesne mase.

1.6.8. Postmortalni pregled

Ženke se žrtvuju jedan dan prije očekivanog dana poroĐaja. Ženke koje pokazuju znake pobačaja ili prijevremenog poroĐaja se žrtvuju i podvrgavaju detaljnom makroskopskom pregledu prije planiranog žrtvovanja.

Za vrijeme žrtvovanja ili u slučaju smrti tokom studije, ženka se makroskopski pregleda u cilju otkrivanja bilo koje strukturalne abnormalnosti ili patološke promjene. Procjena ženki za vrijeme carskog reza i kasnija analiza ploda obavlja se obično bez poznavanja podataka o tretiranoj grupi kako bi se greške svele na minimum.

1.6.9. Pregled sadržaja materice

Odmah po žrtvovanju ili što prije nakon smrti, uzimaju se materice i provjerava stanje trudnoće životinja. Materice koje nisu gravidne dalje se pregledaju (npr. bojenjem amonijum sulfidom za

glodare i Salewski bojenjem ili odgovarajućom alternativnom metodom za kuniće) kako bi se potvrdilo da ne postoji trudnoća.

Izmjeriti masu gravidne materice sa cerviksom. Kod životinja koje su nađene mrtve tokom studije ne mjere se mase gravidnih materica.

Za gravidne životinje određuje se broj žutih tijela.

Sadržaji materica pregledaju se kako bi se utvrdio broj smrti embriona ili ploda i plodova koji su sposobni za život. Opisati stepen resorpcije kako bi se procijenilo relativno vrijeme smrti zametka (tačka 1.2. ove metode).

1.6.10. Pregled ploda

Određuje se pol i tjelesna masa svakog ploda. Svaki plod se pregleda kako bi se utvrdile poljašnje promjene .

Plodovi se pregledaju na izmjene kostura i mekih tkiva (npr. varijacije i malformacije ili anomalije) . Kategorizacija fetalnih promjena nije obavezna. Ako se obavi kategorizacija, navesti kriterijume za određivanje svake kategorije. Obratiti pažnju na reproduktivni trakt koji se pregleda na znake izmjenjenog rasta i razvoja.

Za glodare, oko jedne polovine svakog okota priprema se i pregleda promjene na kosturu. Preostale životinje iz okota pripremaju se i pregledaju na promjene u mekim tkivima korišćenjem prihvaćenih ili odgovarajućih metoda serijske sekcije ili pažljive tehnike seciranja.

Kod životinja koje nisu glodari, npr. zečeva, svi plodovi se pregledaju na promjene u mekim tkivima i kosturu. Tijela tih plodova procjenjuju se pažljivim seciranjem i traženjem promjena na mekim tkivima, što može da obuhvati postupke za dalju procjenu interne kardijalne strukture . Glave jedne polovine plodova pregledane na taj način ukloniti i obraditi za procjenu promjena na mekim tkivima (uključujući oči, mozak, nazalne šupljine i jezik) korišćenjem standardnih metoda serijske sekcije ili neke podjednako osjetljive metode. Tijela tih plodova i preostali nedirnuti plodovi obrađuju se i pregledaju na promjene na kosturu, koristeći iste metode kao što je opisano za glodare.

2. Podaci

2.1. Obrada rezultata

Podaci se navode pojedinačno za ženke, kao i za njihove potomke i prikazuju tabelarno. Podaci se navode za svaku eksperimentalnu grupu i generaciju i to: broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje su nađene mrtve za vrijeme ispitivanja ili su žrtvovane iz humanih razloga, vrijeme svake smrti ili humanog žrtvovanja, broj gravidnih ženki, broj životinja koje pokazuju znake toksičnosti, opis znakova uočene toksičnosti, uključujući vrijeme pojave, trajanja i težine svakog toksičnog efekta, vrste primjećenih pojava koje embriona/ploda i sve relevantne podatke o okotu.

Numerički podaci se procjenjuju odgovarajućom statističkom metodom, uz uzimanje okota kao jedinice za analizu podataka. Koristi se opšteprihvaćena statistička metoda. Statističke metode birati prilikom planiranja ispitivanja i one se obrazlažu. U izvještaju o ispitivanju navode se i podaci o životinjama koje nisu preživjele do planiranog žrtvovanja. Ako je relevantno ovi podaci se mogu uključiti u srednje vrijednosti za grupe. Relevantnost podataka dobijenih od takvih životinja, pa i uključivanje ili isključenje iz srednjih vrijednosti grupe, opravdava se i procjenjuje na individualnoj osnovi.

2.2. Procjena rezultata

Nalazi ispitivanja toksičnosti po prenatalni rast i razvoj procjenjuju se u smislu primjećenih efekata. Procjena obuhvata:

- rezultate ispitivanja majke i embriona/ploda, uključujući procjenu odnosa ili njihovo odsustvo, između izlaganja životinja ispitivanoj supstanci i učestalosti i ozbiljnosti svih nalaza;
- kriterijume korišćene za kategorizaciju poljnog izgleda ploda, promjena mekog tkiva i kostura, ako je obavljena kategorizacija;
- kad odgovara, kontrolne podatke iz ranije studije kako bi se poboljšalo tumačenje rezultata ispitivanja;
- numeričke vrijednosti korišćene za iizračunavanje svih procenata ili indeksa;
- odgovarajuću statističku analizu nalaza ispitivanja, gdje odgovara, koja obuhvata podatke o metodi analize, tako da nezavisni analitičar/statističar reevaluira i rekonstruiše analizu.

U svakoj studiji koja pokazuje odsustvo bilo kakvih toksičnih efekata razmotriti dalja istraživanja kako bi se utvrdila apsorpcija i biorapoloživost ispitivane supstance.

2.3. Tumačenje rezultata

Ispitivanje toksičnosti po prenatalni rast i razvoj daje podatke o efektima ponavljanog izlaganja supstanci tokom graviditeta na ženke i na intrauterini razvoj njihovih potomaka. Rezultati ispitivanja tumače se u vezi sa nalazima iz subhronične, reproduktivne, toksikokinetičke i drugih studija. Kako je naglasak stavljen i na opštu toksičnost u smislu toksičnosti po majku i na pokazatelje toksičnosti po rast i razvoj, rezultati ispitivanja dozvoljavaju u određenoj mjeri razlikovanje između efekata na rast i razvoj do kojih dolazi u odsustvu opšte toksičnosti i onih efekata koji su indukovani samo pri nivoima koji su toksični i za gravidne životinje .

3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) Ispitivanoj supstanci:

- fizička svojstva i, gdje je neophodno, fizička i hemijska svojstva; - identifikacija uključujući CAS broj ako je poznat/utvrĐen; - čistoću. 2) Pomoćnom sredstvu (ako se koristi):
- opravdanje za izbor pomoćnog sredstva, ako se ne radi o vodi. 3) Eksperimentalnim životinjama:
- korišćena vrsta i varijetet;
- broj i starost životinja;
- izvor, uslovi smještaja, dijeta itd;

- individualne tjelesne mase životinja na početku ispitivanja. 4) Eksperimentalnim uslovima:
- obrazloženje za izbor nivoa doze;
- pojedinosti o formulaciji ispitivane supstance/priprema hrane, postignuta koncentracija, stabilnost i homogenost preparata;
- pojedinosti o primjeni ispitivane supstance;
- konverzija koncentracije ispitivane supstance u hrani/vodi za piće (ppm) do stvarne doze (mg/kg TM/dan), ako je primjenjivo;

- uslovi životne sredine;
- podaci o kvalitetu hrane i vode. 5) Rezultatima: - podaci o toksičnoj reakciji kod majke, uključuju, ali nisu ograničeni na:

a)broj životinja na početku ispitivanja, broj preživjelih životinja, broj gravidnih ženki i broj pobačaja i broj životinja koje su se prijevremeno okotile;

b) datum smrti tokom studije ili da li su životinje preživjele do žrtvovanja;

- podatke o životinjama koje nisu preživjele do planiranog žrtvovanja, ali ih ne uključivati u statističko poređenje između grupa;
- datum uočavanja svakog abnormalnog kliničkog znaka i kasniji tok;
- tjelesna masa, promjene tjelesne mase i masa gravidne materice, uključujući, po

izboru, promjenu tjelesne mase korigovane za težinu gravidne materice;
- potrošnja hrane i, ako je mjerena, potrošnja vode;
- nalazi obdukcije, uključujući težinu materice;
- NOAEL vrijednosti za efekte na majku i rast i razvoj. 6) Krajnjim pokazateljima efekta na rast i razvoj po dozi za okot sa implantima, uključujući:
- broj žutih tijela;
- broj implantacija, broj i procenat živih i mrtvih plodova i resorpcija; - broj i procenat pred- i postimplantacionih gubitaka. 7) Krajnjim pokazateljima efekta na rast i razvoj po dozi za okote sa živim plodovima, uključujući:
- broj i procenat živih potomaka;
- odnos polova;
- tjelesna masa, najbolje po polu i sa kombinovanim polovima;
- malformacije poljnog izgleda, mekih tkiva i kostura i druge relevantne promjene;
- kriterijumi za kategorizaciju, ako odgovara;
- ukupan broj i procenat plodova i okota sa poljašnjim promjenama, promjenama mekog tkiva ili kostura, kao i vrsta i incidenca individualnih anomalija i drugih relevantnih promjena.

8) Obrazloženju rezultata.

9) Zaključcima.

B.32. ISPITIVANJE KARCINOGENOSTI

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

1.2. Definicije

Definicije su date u Opšti uvod.

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance nijesu propisane.

1.4. Princip metode

Ispitivana supstanca primjenjuje se odgovarajućim putem sedam dana nedeljno kod nekoliko grupa eksperimentalnih životinja, jedna doza po grupi, tokom većeg dijla njihovog životnog vijeka. Za vrijeme i nakon izlaganja ispitivanoj supstanci eksperimentalne životinje se svakodnevno posmatraju kako bi se otkrili znaci toksičnosti, naročito razvoj tumora.

Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta nijesu propisani.

1.5. Opis metode

Eksperimentalne životinje drže se pod eksperimentalnim uslovima čuvanja i hranjenja najmanje pet dana prije ispitivanja. Zdrave mlade životinje prije ispitivanja se slučajnim izborom raspoređuju u tretirane i kontrolne grupe.

1.5.1. Pripreme

1.5.1.1. Eksperimentalne životinje

Na osnovu rezultata prethodnih studija koriste se različite vrste životinja (glodari ili drugi). Ispitivanju se podvrgavaju zdravi mladi primjerci životinja laboratorijaskih vrsta koje se najčešće koriste u ovakvim eksperimentima, a davanje doze započinje u što kraćem vremenskom roku nakon odbijanja od sise.

Varijacije u tjelesnoj masi korišćenih životinja na početku studije nisu veće od ± 20% srednje vrijednosti. Ako se izvodi subhronična oralna studija kao uvod u dugoročnu studiju u obije studije koristiti iste vrste i sojeve životinja.

1.5.1.2. Broj i pol

Za glodare koristi se najmanje 100 životinja (50 ženki i 50 mužjaka) za svaki dozni nivo i istovremenu kontrolnu grupu. Uzimaju se ženke koje nisu ranije rađale i koje nisu gravidne. Ako se planiraju žrtvovanja u toku eksperimenta broj životinja se povećava za broj životinja koje su planirane za žrtvovanje prije završetka ispitivanja.

1.5.1.3. Dozni nivoi i učestalost izlaganja

Koriste se najmanje tri doze ispitivane supstance uz istovremenu kontrolu. Najviša doza pokazuje znake minimalne toksičnosti, kao što je blago smanjenje dobijanja na tjelesnoj masi (manje od 10%), bez bitne promjene normalnog životnog vijeka zbog efekata, osim kad se radi o tumorima.

Najniža doza ne utiče na normalni rast, razvoj i dužinu života životinja niti da da bilo kakvu naznaku toksičnosti. Najniža doza nije niža od 10% od visoke doze.

Srednja doza utvrđuje se u sredini raspona između visokih i niskih doza.

Kod izbora visine doza uzeti u obzir i podatke iz prethodnih ispitivanja toksičnosti i studija. Životinje se svakodnevno izlažu ispitivanoj supstanci. Ako se hemikalija daje u vodi za piće ili se umiješa u hranu, neprekidno je na rapolaganju.

1.5.1.4. Kontrole

Istovrijemeno se koristi kontrolna grupa koja je u svakom pogledu ista kao eksperimentalne grupe, osim izlaganja ispitivanoj supstanci.

U posebnim okolnostima kao što su inhalacione studije koje uključuju aerosole ili korišćenje emulgatora čija biološka aktivnost nije okarakterisana u oralnim studijama, istovremeno se koristi i dodatna kontrolna grupa koja se ne izlaže pomoćnom sredstvu.

1.6.1.5. Put primjene

Tri glavna puta primjene su: peroralni, dermalni i inhalacioni. Izbor puta primjene zavisi od fizičkih i hemijskih karakteristika ispitivane supstance i mogućeg puta izlaganja kod ljudi.

1.6.1.6. Studije sa peroralnim putem primjene

Kad se ispitivana supstanca apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta i ako je to put kojim ljudi mogu biti izloženi, predlaže se peroralni način primjene, osim ako postoje kontraindikacije. Životinje dobijaju ispitivanu supstancu u hrani, rastvorenu u vodi za piće ili im se daje u kapsulama.

Idealno je dnevno doziranje tokom sedam dana nedeljno, jer primjena doze na bazi pet dana nedeljno može da omogući oporavak ili povlačenje toksičnosti u periodu u kome se ne primjenjuje ispitivana supstanca i time da utiče na rezultat i kasniju procjenu. Doziranje na bazi pet dana nedeljno smatra se prihvatljivim.

1.6.1.7. Studije sa dermalnim putem primjene

Kutano izlaganje premazivanjem kože može se izabrati da simulira glavni put izlaganja ljudi i kao sistem-model za izazivanje lezija na koži.

1.6.1.8. Studije sa inhalacionim putem primjene

Kako studije sa inhalacionim putem primjene predstavljaju tehnički problem koji je složeniji od drugih načina primjene, ovdje se detaljnije navodi taj način davanja. Dobra alternativa u specifičnim slučajevima može biti intratrahealno ukapavanje.

Dugotrajna izlaganja se osmišljavaju po projektovanoj izloženosti ljudi, pa se životinje dnevno izlažu šest sati nakon izjednačenja koncentracija u komori, pet dana u nedelji (isprekidana izloženost) ili, kod eventualne ambijentalne izloženosti, 22 do 24 sata izloženosti tokom sedam dana nedeljno (neprekidna izloženost) sa oko jednim satom dnevno za hranjenje životinja u slično vrijeme i za održavanje komore. U oba slučaja životinje se izlažu fiksnim koncentracijama ispitivane supstance.

Glavna razlika između isprekidane i neprekidne izloženosti je u tome što u prvom slučaju postoji period od 17 do 18 sati tokom koga se životinje oporavljaju od efekata pojedinačne dnevne izloženosti, sa čak i dužim vremenom oporavka tokom vikenda.

Izbor isprekidane ili neprekidne izloženosti zavisi od ciljeva ispitivanja i od simulirane izloženosti ljudi. Razmotriti i određene tehničke probleme. Na primjer, prednosti neprekidne izloženosti za simuliranje uslova životne sredine Dijeluju suprotno zbog potrebe davanja vode i hranjenja za vrijeme izloženosti i potrebe za složenijim (i pouzdanim) tehnikama za stvaranje i praćenje aerosola i pare.

1.6.1.9. Komore za izlaganje

Životinje se podvrgavaju ispitivanju u inhalacionim komorama dizajniranim tako da održavaju dinamičan protok vazduha s najmanje 12 izmjena vazduha u jednom satu kako bi se obezbijedio odgovarajući sadržaj kiseonika i ravnodnosno raspoređena atmosfera. Kontrolne komore i komore za izlaganje su jednake u konstrukciji i dizajnirane tako da obezbjeđuju uslove izlaganja koji su uporedivi u svim pogledima, izuzev izloženosti ispitivanoj supstanci. U komori se održava blagi negativni pritisak zbog sprječavanja ispuštanja ispitivane supstance u očvrstenje. Komore smanjuju na minimum prenaseljenost eksperimentalnih životinja. Kako bi se obezbijedila stabilnost atmosfere u komori, pravilo je da ukupna "zapremina" eksperimentalnih životinja ne prelazi 5% zapremine komore.

Obavljaju se mjerenja i pratei sljedeći parametri:

a) Protok vazduha: brzina protoka vazduha kroz komoru se neprestano prati;
b) Koncentracija: u periodu dnevnog izlaganja koncentracija ispitivane supstance ne varira za više od ± 15% od srednje vrijednosti. Tokom cijelog ispitivanja koncentracije iz dana u dan se održavaju što je moguće stalnijim;
c) Temperatura i vlaga: za glodare se temperatura održavana 22°C ± 2°C, a vlaga u komori na 30% do 70%, osim ako se koristi voda za suspendovanje ispitivane supstance u atmosferu komore. Temperatura i vlažnost se neprestano prate;
d) Mjerenja veličine čestica: raspodjela veličine čestica određuje se u atmosferi komore koja sadrži tečne ili čvrste aerosole. Čestice aerosola su takve veličine da ih eksperimentalne životinje udišu. Uzorci atmosfere komore uzimaju se u zoni disanja životinja. Uzorak vazduha je reprezentativan za raspoDijelu čestica kojima su životinje izložene i obuhvata, na gravimetrijskoj bazi, sav suspendovani aerosol, čak i ako se ne udiše mnogo aerosola. Za vrijeme razvoja generišućeg sistema, obavljaju se analize veličine čestica, kako bi se

obezbijedila stabilnost aerosola, a nakon toga onoliko često koliko je potrebno tokom izlaganja, kako bi se pravilno odredila raspodjela čestica kojima su životinje bile izložene.

1.6.1.10. Trajanje ispitivanja

Trajanje ispitivanja karcinogenosti obuhvata veći dio životnog vijeka eksperimentalnih životinja. Ispitivanje se završava nakon 18 mjeseci za miševe i hrčke, a nakon 24 mjeseca za pacove. Za određene vrste životinja s dužim životnim vijekom i/ili niskom stopom spontane pojave tumora ispitivanje treba završiti nakon 24 mjeseca za miševe i hrčke, a nakon 30 mjeseci za pacove. Alternativno je prihvatljiv završetak takve produžene studije kada broj preživjelih životinja s najnižom dozom ili kontrolna grupa dostigne 25%. Kod završetka ispitivanja u kome je vidljiva razlika između polova, svaki pol mora posebno da se razmatra. Ako zbog vidljive toksičnosti prijevremeno ugine samo grupa izložena visokoj dozi, to nije razlog za završetak ispitivanja, pod uslovom da toksične manifestacije ne uzrokuju probleme u ostalim grupama. Kako bi se prihvatio negativan rezultat, najviše 10% životinja od bilo koje grupe gubi zbog autolize, kanibalizma ili problema usled manipulacije, a preživljavanje u svim grupama je veće od 50% nakon 18 mjeseci za miševe i hrčke, a nakon 24 mjeseca za pacove.

1.6.2. Postupak

1.6.2.1. Posmatranja

Dnevna posmatranja životinja u kavezu obuhvataju promjene na koži i krznu, očima i sluznicama, kao i respiratornom, cirkulatornom sistemu i autonomnom i centralnom nervnom sistemu, somatomotornu aktivnost i model ponašanja.

Posmatrati životinje kako bi se obezbijedilo, koliko je moguće, da se životinje ne izgube iz studije zbog kanibalizma, aotolize tkiva ili stavljanja na pogrešno mjesto. Kada se primjete životinje na samrti, izolovati ih i obdukovati.

Klinički znaci i mortalitet se zabilježe za sve životinje. Obratiti pažnju na razvoj tumora: zabilježiti vrijeme pojave; lokaciju, dimenzije, izgled i rast svakog golim okom vidljivog tumora ili tumora koji se palpira.

Mjerenja potrošnje hrane (i vode, ako se ispitivana supstanca daje u vodi za piće) obavljaju se jednom nedeljno tokom prvih 13 nedjelja ispitivanja, a potom u intervalima od oko tri mjeseca, osim ako zdravstveno stanje ili promjene tjelesne mase ne zahtijevaju drugačije.

Tjelesna masa se bilježi pojedinačno za sve životinje jednom nedeljno tokom prvih 13 nedjelja ispitivanja, a nakon toga najmanje na svake četiri nedelje.

1.6.2.2. Klinička ispitivanja

1.6.2.2.1. Hematologija

Ako se posmatranjem životinja u kavezima primjeti pogoršanje zdravlja tokom studije, za sve životinje kod kojih je primjećeno pogoršanje uraditi diferencijalna krvna slika.

Nakon 12 mjeseci, 18 mjeseci prije žrtvovanja, od životinja se uzima uzorak krvi. Diferencijalna krvna slika radi se u uzorcima životinja iz grupe kojoj je davana visoka doza i životinja u kontrolnim grupama. Ako ti podaci, naročito oni dobijeni prije žrtvovanja ili podaci patološkog pregleda, ukažu na potrebu izrade diferencijalne krvne slike, ista se radi i u grupi s narednom nižom dozom.

1.6.2.2.2. Postmortalni pregled

Postmortalni pregled se izvodi na svim životinjama, uključujući one koje su uginule za vrijeme eksperimenta ili su žrtvovane jer su nađene na samrti. Čuvaju se sve vidljive lezije, tumori ili lezije za koje se sumnja da su tumori.

U odgovarajućem medijumumu za eventualni kasniji histopatološki pregled čuvaju se sljedeći organi i tkiva: mozak (uključujući djelove produžene moždine/ponsa, kore malog mozga, kore velikog mozga), hipofiza, tiroidna/paratiroidna žlijezda, timusna tkiva, dušnik i pluća, srce, aorta, pljuvačne žlijezde, jetra, slezina, bubrezi, nadbubrežne žlijezde, gušterača, polne žlijezde, materica, ostali genitalni organi, koža, jednjak, želudac, dvanaestopalačno crijevo, tanko crijevo, slijepo crijevo, debelo crijevo, rektum, mokraćna bešika, reprezentativan limfni čvor, ženske mliječne žlijezde, muskulatura bedra, periferni živci, grudna kost sa kostnom srži, femur (uključujući zglob), kičmena moždina na tri nivoa (cervikalna, srednje-torakalna i lumbalna) i oči.

Inflacija (naduvavanje) pluća i mokraćne bešike s fiksativom je optimalan način da se sačuvaju ta tkiva. Inflacija pluća kod inhalacionih studija je suštinska za odgovarajući histopatološki pregled. Kod inhalacionih studija čuva se čitav respiratorni trakt, uključujući nosnu šupljinu, ždrijelo i grkljan.

1.6.2.2.3. Histopatologija

a) Kompletna histopatološka ispitivanja obavljaju se na organima i tkivima svih životinja koje su uginule ili su žrtvovane tokom ispitivanja i u kontrolnoj grupi i grupi kojoj je davana visoka doza.
b) U svim grupama mikroskopski se pregledaju svi tumori vidljivi golim okom ili lezije za koje se sumnja da bi mogli biti tumori.
c) Ako postoji značajna razlika u incidenci neoplastičkih lezija u grupi kojoj je davana visoka doza i u kontrolnoj grupi, histopatološki pregledi na tim organima ili tkivima izvode se i u drugim grupama.
d) Ako je preživljavanje u grupi kojoj je davana visoka doza bitno manje nego u kontrolnoj grupi, obavlja se kompletno ispitivanje grupe naredne niže doze.
e) Ako u grupi kojoj je davana visoka doza postoji dokaz o izazivanju toksičnih ili drugih efekata koji su mogli uticati na neoplastičnu reakciju, obavlja se kompletno ispitivanje životinja u grupi s narednom nižom dozom.

2. Podaci

Podaci se navode tabelarno, gdje se za svaku ispitivanu grupu životinja navodi: broj životinja na početku eksperimenta, broj životinja s tumorima otkrivenim tokom eksperimenta, vrijeme otkrivanja i broj životinja kod kojih je nađen tumor nakon žrtvovanja. Svi dobijeni rezultati

analiziraju se odgovarajućom statističkom metodom. Koristi se bilo koja usvojena statistička metoda.

3. Izvještaj

3.1. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:
1) Vrsti, soju, izvoru, uslovima sredine, ishrani;
2) Eksperimentalnim uslovima: opis aparature za izlaganje (uključujući dizajn, vrstu, dimenzije aparature, kao i izvor vazduha, sistem za generisanje partikulata i aerosola, metoda za kondicioniranje vazduha, obrada iskorišćenog vazduha i metoda čuvanja životinja u eksperimentalnoj komori, ako se koristi. Opisati opremu za mjerenje temperature, vlažnosti i, kada odgovara, stabilnost koncentracije aerosola ili veličinu čestica). 3) Izlaganju:
- ovi podaci se prikazuju tabelarno sa srednjim vrijednostima i mjerom varijabilnosti (npr. standardna devijacija) i obuhvataju podatke o:
    a) brzini protoka vazduha kroz opremu za inhalaciju;
    b) temperaturi i vlažnosti vazduha;
    c) nominalnoj koncentraciji (ukupnom sadržaju ispitivane supstance koja se uvodi kroz opremu za inhalaciju, podijeljenom sa zapreminom vazduha); d) prirodi pomoćnog sredstva, ako je korišćeno;
    e) koncentraciji supstance u zoni udisanja;
    f) srednjoj veličini čestica (gdje je potrebno),
- nivoima doze (uključujući pomoćno sredstvo, ako je korišćeno) i koncentracije; - o incidencama tumora po polu, dozi i vrsti tumora;
- vremenu smrti tokom ispitivanja ili da li su životinje preživjele do žrtvovanja;
- o toksičnom odgovoru po polu i dozi;
- opis toksičnih ili drugih efekata;
- vremenu kada je primjećen svaki znak abnormalnosti i njenom kasnijem toku; - hrani i tjelesnoj masi;
- izvedenim hematološkim ispitivanjima i svim rezultatima istih;
- nalazima obdukcije;
- detaljan opis svih histopatoloških nalaza;
- statističkoj obradi rezultata s opisom korišćene metode.
4) Obrazloženju rezultata.

5) Tumačenju rezultata.

3.2. Procjena i tumačenje rezultata

Procjena i tumačenje rezultata je data u Opšti uvod.

B.33. KOMBINOVANO ISPITIVANJE HRONIČNE TOKSIČNOSTI/KARCINOGENOSTI

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

1.2. Definicije

Definicije su date u Opšti uvod.

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance nijesu propisane.

1.4. Princip metode

Cilj kombinovanog ispitivanja hronične toksičnosti karcinogenosti je određivanje hroničnih i karcinogenih efekata supstance kod sisara nakon produžene izloženosti. U tu svrhu u ispitivanje karcinogenosti dodatno uključiti najmanje jednu prateću grupu i kontrolnu prateću grupu. Doza koja se koristi kod prateće grupe sa visokom dozom je veća od one koja se koristi kod grupe sa visokom dozom u ispitivanju karcinogenosti. Životinje se u ispitivanju karcinogenosti pregledaju kako bi se uočila opšta toksičnost, kao i karcinogeni odgovor. Životinje iz tretirane prateće grupe pregledaju se na opštu toksičnost.

Ispitivanom supstancom više grupa eksperimentalnih životinja tretira se sedam dana nedeljno, odgovarajućim putem, jednom dozom po grupi i to tokom najvećeg dijela njihovog života. Za vrijeme i nakon izlaganja ispitivanoj supstanci, eksperimentalne životinje se svakodnevno posmatraju radi otkrivanja znakova toksičnosti i razvoja tumora.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta nijesu propisani.

1.6. Opis metode

Životinje se drže pod eksperimentalnim uslovima smještaja i ishrane najmanje pet dana prije ispitivanja. Prije ispitivanja zdrave mlade životinje se slučajnim izborom dodjeljuju grupama za tretiranje i kontrolnim grupama.

1.6.1. Pripreme

1.6.1.1. Eksperimentalne životinje

Najpogodnija vrsta je pacov. Na osnovu rezultata prethodnih ispitivanja koriste se i druge vrste (glodarske ili ne). Koristiti mlade i zdrave životinje uobičajeno korišćenih laboratorijaskih linija. Sa doziranjem se počinje što je moguće prije odbijanja od sise.

Na početku ispitivanja varijacija u tjelesnoj masi životinja nije veća od ±20% srednje vrijednosti. Kada se prije dugoročnog ispitivanja izvodi ispitivanje subhronične oralne toksičnosti u oba ispitivanja se koriste iste vrste i sojevi/linije životinja.

Broj i pol

Za glodare koristiti najmanje 100 životinja (50 ženki i 50 mužjaka) za svaki dozni nivo i istovremenu kontrolnu grupu. Koriste se ženke koje nisu ranije rađale i koje nisu gravidne. Ukoliko se planira žrtvovanje u toku ispitivanja, povećati broj životinja za onoliko koliko će biti žrtvovano prije završetka ispitivanja.

Tretirana prateća grupa ili grupe za određivanje patologije različite od tumora obuhvataju po 20 životinja svakog pola, dok kontrolna prateća grupa obuhvata po 10 životinja svakog pola.

1.6.1.2. Dozni nivoi i učestalost izlaganja

U svrhu ispitivanja karcinogenosti koristiti najmanje tri nivoa doza pored istovremene kontrolne grupe. Najveći dozni nivo izaziva znake minimalne toksičnosti, kao što je malo usporenje dobijanja na tjelesnoj masi (manje od 10%), a da se pri tome normalni životni vijek ne menja bitno usled uzroka koji su drugačiji od pojave tumora.

Najmanji dozni nivo ne remeti normalni rast, razvoj i životni vijek životinje, niti stvara ikakve naznake toksičnosti. Ovaj nivo nije niži od 10% visoke doze.

Srednju dozu ustanoviti na oko polovine raspona između visoke i niske doze.

Dozni nivoi se biraju uzimajući u obzir podatke iz prethodnih ispitivanja i studija toksičnosti.

U svrhu ispitivanja hronične toksičnosti u ispitivanje se uključuju dodatne prateće grupe - tretirane i istovremena kontrolna grupa. Visoka doza kod tretiranih pratećih životinja izazova definitivne znake toksičnosti.

Učestalost izlaganja je svakodnevno. Ako se hemikalija daje u vodi za piće ili je umiješana u hranu, voda i hrana su stalno dostupne životinjama.

1.6.1.4. Kontrole

Koristi se istovremena grupa koja je u svakom pogledu identična tretiranim grupama, osim po izlaganju ispitivanoj supstanci.

U posebnim okolnostima, kao što je ispitivanje inhalacione toksičnosti koja uključuje aerosole ili upotreba emulgatora bez okarakterisanog biološkog dejstva u studijama oralne toksičnosti koristiti dodatnu kontrolnu grupu koja nije izložena rastvaraču.

1.6.1.5. Put primjene

Tri glavna puta primjene su: peroralni, dermalni i inhalacioni. Izbor puta primjene zavisi od fizičkih i hemijskih karakteristika ispitivane supstance i od mogućeg puta izlaganja kod ljudi.

1.6.1.6. Ispitivanja peroralno

Kada se ispitivana supstanca apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta, a to je i put unosa kojim su izloženi ljudi, ukoliko ne postoje kontraindikacije primjeniti peroralni put primjene. Životinje

ispitivanu supstancu dobijaju putem hrane, rastvorenu u vodi za piće ili u obliku kapsule. U idealnom slučaju koristi se dnevno doziranje sedam dana u nedelji, jer doziranje na bazi pet dana nedeljno omogućava oporavak ili povlačenje toksičnosti u periodu bez doziranja, što utiče na rezultat i procjenu. Na osnovu razmatranja praktičnosti, doziranje na bazi pet dana nedeljno je prihvatljivo.

1.6.1.7. Ispitivanja dermalnim putem primjene

Za simulaciju u slučaju kada je glavni put izloženosti ljudi preko kože i kao model za izazivanje povreda kože, bira se izlaganje premazivanjem kože.

1.6.1.8. Ispitivanja inhalacionim putem primjene

Ispitivanja inhalacionim putem primjene predstavljaju složeniji tehnički problem od drugih puteva primjene, te se iz tog razloga daju detaljnija uputstva o tom načinu. U posebnim slučajevima intratrahijalna instilcija predstavlja opravdanu alternativu.

Dugotrajna izlaganja se planiraju prema projektovanom izlaganju ljudi tako što se nakon uravnoteženja koncentracija u komori životinje dnevno izlažu po šest sati, pet dana u nedelji (povremeno izlaganje) ili, u odnosu na moguće izlaganje u životnoj sredini, 22 do 24 sata dnevno sedam dana nedeljno (neprekidno izlaganje), sa jednim satom dnevno (u približno isto vrijeme) za hranjenje životinja i za održavanje komora. U oba slučaja životinje su izložene fiksnim koncentracijama ispitivane supstance. Glavna razlika između povremenog i neprekidnog izlaganja je da u prvom slučaju postoji period od 17 do 18 sati tokom kog se životinje oporavljaju od efekta dnevnog izlaganja, uz još duži period oporavka tokom vikenda.

Izbor povremenog ili neprekidnog izlaganja zavisi od ciljeva ispitivanja i od simuliranog izlaganja ljudi. U obzir se uzimaju i određene tehničke poteškoće. Na primjer, prednosti neprekidnog izlaganja za simulaciju uslova životne sredine su smanjene zbog potrebe pojenja i hranjenja za vrijeme izlaganja i zbog potrebe za komplikovanijim (i pouzdanijim) tehnikama produkcije aerosola i para, kao i zbog praćenja.

1.6.1.9. Komore za inhalaciono izlaganje

Životinje se ispituju u komorama za inhalaciono izlaganje koje su projektovane da podržavaju dinamički protok od najmanje 12 promjena vazduha na sat kako bi se obezbijedio adekvatan sadržaj kiseonika i ravnodnosno raspoređena atmosfera izlaganja. Kontrolne komore i komore za izlaganje su identične konstrukcije i dizajna, kako bi se obezbijedili uslovi izlaganja koji se u svim aspektima upoređuju, osim u pogledu izlaganja ispitivanim supstancama. U unutrašnjosti komore održava se negativni pritisak zbog sprječavanja ispuštanja ispitivane supstance u okolni prostor. Komore su takve da se gomilanje eksperimentalnih životinja svede na minimum. Opšte je pravilo da, zbog stabilnosti atmosfere u komori, ukupna zapremina životinja ne prelazi 5% zapremine komore.

Mjere se i prate sljedeći parametri:
a) Protok vazduha: protok vazduha kroz komoru se neprekidno kontroliše;

b) Koncentracija: tokom dnevne izloženosti koncentracija ne odstupa više od ± 15% od srednje vrijednosti. Za vrijeme ukupnog trajanja ispitivanja, koncentracije iz dana u dan održavati što je moguće stabilnijim;

v) Temperatura i vlažnost: za glodare temperaturu održavati na 22°C ± 2°C, a vlažnost u komori na 30% do 70%, osim u slučaju kada se upotrebljava voda za suspendovanje ispitivane supstance u atmosferu komore. Neprekidno se prati temperatura i vlažnost;

g) Mjerenja veličine čestica: raspodjela veličine čestica se odredi u atmosferi komore kada ona uključuje tečne ili čvrste aerosole. Čestice aerosola su veličine koju eksperimentalna životinja udiše. Uzorci atmosfere iz komora se uzimaju u zoni udisanja. Uzorak vazduha je reprezentativan za raspoDijelu čestica kojima su životinje izložene i pruža gravimetrijski podatak o ukupnom aerosolu, čak i onda kada se veći dio aerosola ne udiše. Analize veličine čestica se obavljaju često tokom razvijanja generatorskog sistema kako bi se obezbijedila stabilnost aerosola, a potom onoliko često koliko je potrebno da se adekvatno utvrdi konzistencija raspodjele čestica kojima su životinje izložene.

1.6.1.10. Trajanje ispitivanja

Trajanje dijela ispitivanja karcinogenosti podrazumjeva najveći dio normalnog životnog vijeka eksperimentalnih životinja. Završetak ispitivanja u slučaju miševa i hrčaka je u 18 mjeseci starosti, a za pacove 24 mjeseca. Kod određenih sojeva životinja koje imaju duži životni vijek i/ili nižu stopu spontane pojave tumora, završetak ispitivanja je 24 mjeseca za miševe i hrčke, a 30 mjeseci za pacove. Alternativno se prihvata završetak takvog produženog ispitivanja kada broj preživjelih u grupi sa najnižom dozom ili kontrolnoj grupi dostigne 25%. Ako se prilikom završetka ispitivanja uoče znatne razlike među polovima, svaki pol odvojeno razmatrati. Kad zbog očigledne toksičnosti prije vremena ugine samo grupa koja je primala visoku dozu, ispitivanje ne prekidati ukoliko toksičnost ne uzrokuje probleme u drugim grupama. Da bi se prihvatio negativni rezultat ispitivanja, ne smije biti izgubljeno više od 10% životinja u svakoj grupi zbog autolize, kanibalizma ili postepena, a preživljavanje kod svih grupa nije manje od 50% nakon 18 mjeseci za miševe i hrčke, a nakon 24 mjeseca za pacove.

Prateće grupe od 20 doziranih životinja po polu i 10 priključenih kontrolnih životinja po polu koje se koriste za ispitivanje hronične toksičnosti na ispitivanju se zadržavaju najmanje 12 mjeseci. Te životinje se žrtvuju zbog ispitivanja patologije koja je u vezi sa ispitivanom supstancom, a koja nije dodatno zakomplikovana gerontološkim promjenama.

1.6.2. Postupak

1.6.2.1. Posmatranja

Životinje u kavezima svakodnevno se posmatraju u pogledu promjena na koži i krznu, očima i sluznicama, kao i disajnom, cirkulatornom, autonomnom i centralnom nervnom sistemu, promjena somatomotornih aktivnosti i modela ponašanja.

Na životinjama u ispitivanim pratećim grupama u odgovarajućim intervalima obavljati kliničke preglede.

Redovno posmatranje životinja se obavlja zbog obezbijeĐivanja, koliko je moguće, da ne doĐe do gubitka ispitivanih životinja zbog kanibalizma, autolize tkiva ili greškom. Životinje na samrti

odmah odvojiti i izvršiti obdukciju. Za sve životinje zabilježiti kliničke znake, uključujući i neurološke i promjene na oku i uginuća. Posebna pažnja se posvećuje razvoju tumora: vremenu nastanka, mjestu, dimenzijama, izgledu i progresiji svakog vidljivog i opipljivog tumora. Zabilježiti i vrijeme nastanka i progresiju toksičnih efekata.

Nedeljno se mjeri potrošnja hrane (i vode, kad se ispitivana supstanca daje putem vode za piće) tokom prvih 13 nedjelja ispitivanja, a nakon toga u intervalima od oko tri mjeseca, osim ako zdravstveno stanje ili promjene tjelesne mase ne zahtijevaju drugačije.

Tjelesna masa se bilježi individualno za sve životinje, jednom nedeljno tokom prvih 13 nedjelja perioda ispitivanja, a nakon toga najmanje jednom u svake četiri nedelje.

1.6.2.2. Klinički pregledi

1.6.2.2.1. Hematologija

Hematološki pregled (tj. sadržaj hemoglobina, ukupna zapremina ćelija, ukupan broj crvenih krvnih ćelija, ukupan broj bijelih krvnih ćelija, krvnih pločica ili drugi parametri koagulabilnosti) obavljati poslije tri mjeseca, poslije šest mjeseci, a nakon toga u intervalima od oko šest mjeseci i na završetku ispitivanja na uzorcima krvi uzetih od 10 pacova po pola iz svih grupa. Ako je moguće, u svakom intervalu se uzimaju uzorci od istih pacova.

Ukoliko se tokom posmatranja utvrdi pogoršanje zdravstvenog stanja životinja, uraditi diferencijalnu krvnu sliku odgovarajućih životinja.

Diferencijalna krvna slika vrši se na uzorcima životinja iz grupe s najvećom dozom i kontrolne grupe. Diferencijalna krvna slika vrši se na sljedećoj nižoj grupi/grupama samo ako se utvrde značajne razlike između najviše grupe i kontrole ili ako je indikovano zbog patoloških nalaza.

1.6.2.2.2. Analiza mokraće

Za analizu se uzimaju uzorci mokraće od 10 pacova svakog pola iz svih grupa, ako je moguće od istih pacova, u istim intervalima kao i hematološki pregledi.

Za svaku pojedinu životinju ili na "pool" uzorku po polu po grupi glodara određuje se:

- izgled: zapremina i gustina po pojedinoj životinji; - proteini, glukoza, keton, okultna krv (semi-kvantitativno); - mikroskopski pregled sedimenata (semi-kvantitativno).

1.6.2.2.3. Medicinska biohemija

U intervalima od oko šest mjeseci i na završetku ispitivanja uzimaju se uzorci krvi od svih životinja koje nisu glodari za biohemijska mjerenja i 10 uzoraka od pacova po polu iz svih grupa, ako je moguće uvjek od istih životinja. Uzeti prethodne uzorke od životinja koje nisu glodari. U plazmi ovih uzoraka određuje se:

- koncentracija ukupnih proteina;
- koncentracija albumina;

- ispitivanja funkcije jetre (kao što su aktivnost alkalne fosfataze, aktivnost glutmat piruvat transaminaz[l] i aktivnost glutamat oksaloacetat transaminaze), gama glutamil transpeptidaza, ornitin dekarboksilaza;
- metabolizam ugljenih hidrata, kao što je glukoza u krvi nakon gladovanja;
- ispitivanja funkcije bubrega kao što je azot u ureji u krvi (u daljem tekstu: BUN).

1.6.2.2.4. Postmortalni pregled

Kompletnu obdukciju izvesti na svim životinjama, uključujući i one koje su uginule tokom ispitivanja ili koje su žrtvovane jer su nađene na samrti. Prije žrtvovanja od svih životinja uzeti uzorke krvi za različite analize. Svi vidljivi tumori i ozlede za koje se sumnja da su tumori se čuvaju. Preduzeti sve mjere za povezivanje uočenih promjena s mikroskopskim nalazima.

Svi organi i tkiva se čuvaju za histopatološke preglede. To podrazumjeva slijedeće organe i tkiva: mozak (medula/pons, kora malog mozga, kora velikog mozga); hipofiza, tiroidea (uključujući paratiroideu), timus, pluća (uključujući traheju), srce, aortu, pljuvačne žlijezde, jetru, slezinu, bubrege, nadbubrežne žlijezde, jednjak, želudac, duodenum, jejenum, ileum, slijepo crijevo, kolon, rektum, mokraćna bešika, limfni čvorovi, pankreas, polne žlijezde, pomoćni genitalni organi; ženska mliječna žlijezda, koža, muskulatura, periferni živci, kičma (cervikalna, torakalna, lumbalna), sternum sa koštanom srži i femur (sa zglobom) i oči.

Iako inflaciaja (naduvavanje) pluća i mokraćne bešike pomoću fiksativa predstavlja optimalni način za konzerviranje tih tkiva, u ispitivanjima inhalacione toksičnosti naduvavanje pluća je neophodno za odgovarajući histopatološki pregled. Kod specifičnih ispitivanja, kao što su ispitivanja inhalacione toksičnosti, pregledati cio respiratorni trakt, uključujući i nos, ždrijelo i grkljan.

Ukoliko se obavljaju druga klinička ispitivanja, dobijeni podaci su dostupni prije mikroskopskog pregleda, jer patologu daju značajne smjernice.

1.6.2.2.5. Histopatologija

Za dio ispitivanja hronične toksičnosti:

Detaljno pregledati sve sačuvane organe svih životinja iz prateće grupe visoke doze i iz kontrolne grupe. Ako se patološki nalaz uzorka iz prateće grupe visoke doze povezuje s ispitivanom supstancom, ciljni organi svih životinja iz ostalih tretiranih pratećih grupa na kraju ispitivanja se podvrgavaju potpunom i detaljnom histološkom pregledu, kao i oni iz pogođenih grupa iz dijela ispitivanja karcinogenosti.

Za dio ispitivanja karcinogenosti:
a) Na organima i tkivima svih životinja koje su uginule ili bile žrtvovane tokom ispitivanja, kao i svih životinja iz kontrolne grupe i grupe visoke doze obaviti potpuni histopatološki pregled;
b) Svi tumori vidljivi golim okom ili promjene za koje se sumnja da su tumori nađene kod svih grupa i na bilo kom organu se pregledaju mikroskopski;
c) Ukoliko postoji značajna razlika u učestalosti pojave neoplastičnih promjena kod grupe visokog doznog nivoa i kontrolne grupe, obaviti histopatološki pregled na određenom organu ili tkivu u drugim grupama;

d) Ako je preživljavanje kod grupe visokog doznog nivoa znatno manje nego u kontrolnoj grupi, detaljno pregledati sljedeću grupu sa nižim nivoom doze;

e) Ako kod grupe visokog doznog nivoa postoji dokaz o uzrokovanju toksičnosti ili o drugim efektima koji mogu da utiču na neoplastičnu reakciju, detaljno pregledati grupu sljedećeg nižeg doznog nivoa.

2. Podaci

Podaci se ne vode tabelarno i za svaku ispitivanu grupu navodi se: broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja kod kojih su se pojavili tumori ili toksični efekti utvrĐenih tokom ispitivanja, vrijeme otkrivanja i broj životinja kod kojih su tumori ustanovljeni po žrtvovanju. Rezultati se procjenjuju odgovarajućom statističkom metodom. Primjenjuje se bilo koja priznata statistička metoda.

3. Izvještaj

3.1. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) Vrsti, soju, izvoru, uslovima sredine, ishrani.
2) Uslovima ispitivanja: opis aparature za inhalaciono izlaganje (uključujući dizajn, tip, dimenzije, izvor vazduha, sistem generisanja čestica i aerosola, način klimatizovanja vazduha, tretman iskorišćenog vazduha i metoda smještaja životinja u eksperimentalnim komorama, ako se primjenjuju. Opisati uređaj za mjerenje temperature, vlažnosti i, kada odgovara, stabilnosti koncentracije aerosola i veličine čestica). 3) Izlaganju:

- ovi podaci se navode u obliku tabele u kojoj se prikazuju srednje vrijednosti i mjera odstepena (tj. standardna devijacija) i uključuju:
    a) podatke o protoku vazduha kroz opremu za inhalaciju;
    b) temperaturu i vlažnost vazduha;
    c) nominalne koncentracije (ukupna količine ispitivane supstance dodate u opremu za inhalaciju, podijeljena sa zapreminom vazduha);
    d) d) prirodu rastvarača, ako je korišćen;
    e) koncentraciju u zoni udisanja;
    f) srednju veličina čestica (gdje je primjenljivo);
- doznim nivoima (uključujući rastvarač, ako se koristi) i koncentracije;
- učestalosti pojave tumora po polu, dozi i tipu tumora;
- vremenu smrti tokom ispitivanja ili da li su životinje preživjele do kraja, uključujući prateću grupu;
- toksičnoj reakciji po polu i dozi;
- opis toksičnih ili drugih efekata;
- vremenu uočavanja svakog znaka abnormalnosti i njen dalji tok;
- oftalmološkim nalazima;
- hrani i tjelesnoj masi;
- primjenjenim hematološkim ispitivanjima i svim rezultatima;
- primjenjenim medicinsko-biohemijskim ispitivanjima i svim rezultatima (uključujući i analizu urina);
- obdukcionim nalazima;

- detaljan opis svih histopatoloških nalaza;
- statističkoj obradi rezultata sa opisom primjenjenih metoda. 4) Obrazloženju rezultata. 5) Tumačenju rezultata.

3.2. Procjena i tumačenje rezultata

Procjena i tumačenje rezultata dati su u Opšti uvod.

B.34. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI PO REPRODUKCIJU NA JEDNOJ GENERACIJI

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

1.2. Definicije

Definicije su date u Opšti uvod.

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance nijesu propisane.

1.4. Princip metode

Ispitivana supstanca primjenjuje se u rastućim dozama u grupama mužjaka i ženki. Mužjacima se daje supstanca tokom rasta i tokom najmanje jednog spermatogenog ciklusa (oko 56 dana kod miša, a 70 dana kod pacova) kako bi se izazvali štetni efekti supstance koja se ispituje na spermatogenezu.

Ženke roditeljske (P) generacije dozirati tokom najmanje dva kompletna ciklusa "estrusa" kako bi se izazvali štetni efekti ispitivane supstance po "estrus". Nakon toga se životinje pare. Ispitivana supstanca se primjenjuje kod oba pola tokom perioda parenja, a nakon toga samo ženkama tokom graviditeta i tokom perioda dojenja.

Za primjenu inhalacionim putem metoda zahtijeva modifikaciju.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta nijesu propisani.

1.6. Opis metode

1.6.1. Pripreme

Prije ispitivanja zdrave mlade životinje se slučajnim izborom raspoređuju u tretirane i kontrolne grupe. Životinje se drže u uslovima eksperimentalnog smještaja i ishrane najmanje pet dana prije ispitivanja.

Preporučuje se da se ispitivana supstanca daje u hrani ili vodi za piće. Prihvataju se i drugi putevi primjene. Tokom odgovarajućeg eksperimentalnog perioda svim životinjama se daje supstancu na isti način. Ako se upotrebljava rastvarač ili aditivi da bi se olakšalo doziranje, oni ne izazivaju toksični efekat.

Doziranje je sedam dana nedeljno.

1.6.1.1. Eksperimentalne životinje

1.6.1.1.1. Izbor vrste

Preporučene vrste su pacovi ili miševi. Koriste se zdrave životinje koje ranije nisu bile podvrgnute ispitivanjima. Ne koristiti sojeve za koje se zna da su slabo plodni. Eksperimentalne životinje okarakterisati po vrsti, soju, polu, tjelesnoj masi i/ili starosti.

Za adekvatnu procjenu plodnosti posmatrati i mužjake i ženke. Kada ispitivanje započne nijedna eksperimentalna životinja, bilo iz tretirane ili iz kontrolne grupe, nisu u fazi sisanja.

1.6.1.2. Broj i pol

Svaka eksperimentalna i kontrolna grupa ima dovoljan broj životinja kako bi se dobilo oko 20 gravidnih ženki neposredno prije ili blizu okota.

Cilj je da se proizvede dovoljno trudnoća i potomstva kako bi se obezbijedila svrsishodna procj ena potencijala supstance da utiče na plodnost, graviditet i majčinsko ponašanje u P generaciji životinja, i odojčad, rast i razvoj F_1 potomaka od začeća do odbijanja od sise.

1.6.1.3. Uslovi ispitivanja

Obezbjediti slobodan pristup hrani i vodi. Uoči koćenja, gravidne ženke smještiti u posebne kaveze za koćenje ili uzgoj i dati im materijal za gnežĐenje.

1.6.1.4. Dozni nivoi

Koriste se najmanje tri tretirane grupe i kontrolnu grupu. Ako se za primjenu ispitivane supstance upotrebljava rastvarač, kontrolna grupa prima najveću korišćenu zapreminu rastvarača. Ukoliko ispitivana supstanca uzrokuje smanjeno uzimanje ili iskorišćenost hrane, koristiti dodatnu kontrolnu grupu koja bi se hranila. U idealnom slučaju, osim ako postoji ograničenje fizičko/hemijske prirode ili biološki efekti ispitivane supstance, najviši dozni nivo izaziva toksičnost, ali ne smrtnost kod životinja roditelja (P). Srednja doza izaziva minimalne toksične efekte koji bi se mogli pripisati ispitivanoj supstanci, a niska doza ne izaziva nikakve primjetne štetne efekte kod roditelja ili potomaka. Kada se daje prisilnim hranjenjem ili kao kapsula, doza koja se daje svakoj životinji određuje se prema njenoj tjelesnoj masi i podešava se svake nedelje prema promjenama tjelesne mase. Doze za gravidne ženke se određuju prema tjelesnoj masi nultog ili šestog dana graviditeta.

1.6.1.5. Ispitivanje granične doze

U slučaju supstance sa niskom toksičnošću, ako dozni nivo od najmanje 1.000 mg/kg ne proizvodi nikakav dokaz interferencije sa reprodukcijom, ispitivanja pri drugim doznim nivoima nisu neophodna. Ako preliminarno ispitivanje pri visokom doznom nivou sa jasnim dokazom toksičnosti po majku ne pokaže štetne efekte na plodnost, ne sprovoditi ispitivanja drugih doznih nivoa.

1.6.2. IzvoĐenje ispitivanja

1.6.2.1. Eksperimentalni rasporedi

Dnevno doziranje roditeljskih (P) mužjaka početi kad su stari oko pet do devet nedjelja, a nakon što su odbijeni od sise i aklimatizovani najmanje pet dana. Kod pacova doziranje se nastavlja 10 nedjelja prije perioda parenja (kod miševa osam nedjelja). Mužjake žrtvovati i pregledati ili na kraju perioda parenja ili se, alternativno, mužjaci zadržavaju na eksperimentalnoj ishrani za moguću produkciju drugog legla i usmrtiti i pregledati negdje prije kraja studije. Doziranje roditeljskih (P) ženki početi nakon najmanje pet dana aklimatizacije i nastaviti najmanje dvije nedelje prije parenja. Dnevno doziranje P ženki nastavlja se tokom perioda parenja od tri nedelje, graviditeta i do odbijanja od sisa F1 potomaka. Razmotriti modifikaciju rasporeda doziranja na osnovu drugih podataka o ispitivanoj supstanci, kao što su podaci o indukciji metabolizma ili bioakumulaciji.

1.6.2.2. Postupak parenja

U ispitivanju reproduktivne toksičnosti primjenjuje se parenje 1:1 (jedan mužjak s jednom ženkom) ili 1:2 (jedan mužjak s dvije ženke).

Kod postupka parenja 1:1, jedna ženka se smješta s istim mužjakom do pojave graviditeta ili nakon isteka perioda od tri nedelje. Svakog jutra ženka se pregleda na prisutnost sperme ili vaginalnog čepa. Nulti dan graviditeta definiše se kao dan kada je utvrĐena prisutnost sperme ili vaginalnog čepa.

Parove koji ne uspiju da se spare procjeniti kako bi se utvrdio uzrok neplodnosti.

Taj postupak uključuje procedure kao što su dodatna mogućnost parenja sa drugim plodnim mužjacima ili ženkama, mikroskopski pregled reproduktivnih organa i ispitivanja ciklusa "estrusa" ili spermatogeneze.

1.6.2.3. Veličine legla

Životinjama koje su primale supstancu tokom ispitivanja plodnosti dozvoljava se normalno koćenje i podizanje mladih do stadijuma odbijanja od sise, bez standardizacije legla.

Tamo gdje se primjenjuje standardizacija sprovodi se sljedeća procedura: između prvog i četvrtog dana nakon roĐenja veličina legla se podesi odstranjivanjem prekobrojnih mladunaca selekcijom kako bi se postiglo, što je približnije moguće, veličina od četiri mužjaka i četiri ženke po leglu. Ako broj mužjaka ili ženki ne dopušta selekciju od četiri mladunca svakog pola po leglu, prihvatljivo je i djelimično sastavljanje (npr. pet mužjaka i tri ženke). PrilagoĐavanje se ne obavlja u leglima s manje od osam mladih.

1.6.2.4. Posmatranja

Tokom perioda ispitivanja bar jednom dnevno posmatrati svaku životinju. Promjene ponašanja, znaci teškog ili produženog koćenja i svi znaci toksičnosti, uključujući i mortalitet, se zabilježe.

Za vrijeme perioda pred parenje i perioda parenja dnevno obavljati mjerenje potrošnje hrane. Nakon koćenja i za vrijeme dojenja mjerenje potrošnje hrane (i vode, ako se ispitivana supstanca daje u vodi za piće) obavljati istog dana kad i mjerenje mase legla. Tjelesna masa P mužjaka i ženki se mjeri prvog dana doziranja, a nakon toga jednom nedeljno. Ova zapažanja navesti za svaku odraslu životinju pojedinačno.

Trajanje gestacije računa se od nultog dana graviditeta. Svako leglo pregledati što je moguće prije po poroĐaju, kako bi se utvrdio broj i pol mladih, mrtvoroĐenih, živih mladih i prisutnost većih anomalija.

MrtvoroĐene i mladunce koji su žrtvovani četvrtog dana sačuvati i ispitati kako bi se utvrdili mogući defekti. Živi mladunci se prebrojavaju i mjeri se masa legla jutro nakon roĐenja i četvrtog i sedmog dana, a nakon toga jednom nedeljno, sve do završetka studije, kada se životinje mjere pojedinačno. Bijleže se fizičke ili abnormalnosti u ponašanju kod ženki ili mladunaca.

1.6.2.5. Patologija

1.6.2.5.1. Postmortalni pregled

U vrijeme žrtvovanja ili smrti tokom ispitivanja životinje P generacije makroskopski pregledati kako bi se utvrdile strukturne abnormalnosti ili patološke promjene, s pažnjom na pregled organa reproduktivnog sistema. Mrtve ili umiruće mladunce pregledati kako bi se uočili defekti.

1.6.2.5.2. Histopatologija

Jajnici, uterus, cerviks, vagina, testisi, epididimisi, sjemene kesice, prostata, koagulišuća žlijezda, hipofiza i ciljni organ(i) svih P životinja se sačuvaju za mikroskopski pregled. U slučaju da se ti organi ne pregledaju u ispitivanjima drugih doznih nivoa, mikroskopski ih pregledati kod svih životinja izloženih visokim dozama i kod kontrolnih životinja i onih koje su uginule tokom studije kada je izvodljivo.

Organe koji pokazuju abnormalnosti kod tih životinja pregledati i kod svih drugih P životinja. Tom prilikom izvršiti mikroskopski pregled svih tkiva koja pokazuju veće patološke promjene. Kao što je preporučeno kod postupka parenja, reproduktivni organi životinja kod kojih postoji sumnja na neplodnost se podvrgavaju mikroskopskom pregledu.

2. Podaci

Podaci se navode tabelarno, tako da se za svaku ispitivanu grupu navodi: broj životinja na početku ispitivanja, broj plodnih mužjaka, broj gravidnih ženki, tipovi promjena i procenat životinja koje pokazuju svaki tip promjene.

Numerički rezultati se ocjenjuju pomoću odgovarajuće statističke metode. Primjenjuje se bilo koja prihvaćena statistička metoda.

3. Izvještaj

3.1. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:
- vrsti/soju;
- toksičnom odgovoru po polu i dozi, uključujući plodnost, gestaciju i viabilitet;
- vremenu smrti tokom studije ili da li su životinje preživjele do trenutka predviđenog žrtvovanja ili završetka ispitivanja;

- tabeli sa podacima o tjelesnoj masi svakog legla, srednja vrijednost: masa mladunaca i pojedinačna tjelesna masa mladunaca na kraju ispitivanja;
- toksičnim ili drugim efektima na reprodukciju, potomke ili postnatalni rast;
- danu utvrđivanja svakog abnormalnog znaka i njegovog daljeg toka;
- tjelesnoj masi P životinja;
- nalazima obdukcije;
- detaljan opis svih mikroskopskih nalaza;
- statističkoj obradi rezultata, gde je moguće; - obrazloženju rezultata; - tumačenju rezultata.

3.2. Procjena i tumačenje rezultata

Procjena i tumačenje rezultat dati su u Opšti uvod.

B.35. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI PO REPRODUKCIJU NA DVIJE GENERACIJE

1. Metoda ispitivanja

Metoda ispitivanja toksičnosti po reprodukciju na dvije generacije zasniva se na metodi OECD: TG 416 (2001).

1.1. Uvod

Ova metoda ispitivanja reprodukcije na dvije generacije namijenjena je da obezbijedi opšte podatke u vezi efekata ispitivane supstance na integritet i učinak muških i ženskih reproduktivnih sistema, uključujući funkciju polnih žlijezda, estrus ciklus, parenje, začeće, gestaciju, porođaj, laktaciju i odbijanje od sise i rast i razvoj potomstva. Studija pruža i podatke o efektima ispitivane supstance na neonatalni morbiditet, mortalitet i preliminarne podatke o prenatalnoj i postnatalnoj toksičnosti po rast i razvoj i da usmjeri buduća ispitivanja. Pored proučavanja rasta i razvoja F_1 generacije, ova eksperimentalna metoda se predviđa i za procjenu integriteta i sposobnosti muških i ženskih reproduktivnih sistema, kao i rasta i razvoja F_2 generacije. Za dodatne podatke o toksičnosti po rast i razvoj i funkcionim nedostacima, u ovaj protokol se uključuju i dodatni segmenti ispitivanja, konsultujući metode za toksičnost po rast i razvoj i/ili neurotoksični efekti za rast i razvoj neurotoksičnost u periodu rasta i razvoja,

ako odgovara, ili se ovi efekti proučavaju u posebnim studijama, koristeći odgovarajuće eksperimentalne metode.

1.2. Princip metode Ispitivana supstanca se daje u rastućim dozama muškim i ženskih jedinkama u grupama. Mužjacima P generacije daju se doze za vrijeme rasta i tokom bar jednog cjelog ciklusa spermatogeneze (približno 56 dana kod miševa i 70 dana kod pacova) kako bi se izazvali svi štetni efekti na spermatogenezu. Efekti na spermu se određuju brojnim parametrima sperme (npr. morfologija i pokretljivost spermatozoida) i pripremom tkiva i detaljnom histopatologijom. Ukoliko postoje podaci o spermatogenezi iz prethodne studije koja je trajala dovoljno dugo i u kojoj je primjenjeno ponovljeno doziranje, npr. 90-dnevna studija, mužjake P generacije ne uključivati u procjenu. Uzorci ili digitalni snimci spreme P generacije se čuvaju kako bi se omogućila kasnija procjena. Ženke P generacije dozirati tokom rasta i tokom nekoliko estrus ciklusa kako bi se uočili bilo kakvi štetni efekti ispitivane supstance na normalnost estrus ciklusa. Ispitivana supstanca se daje roditeljskim (P) životinjama za vrijeme parenja, za vrijeme graviditeta koji su uslijedili i tokom odbijanja od sise njihovog F_1 potomstva. Po odbijanju od sise nastavlja se sa davanjem supstance F_1 potomstvu tokom njihovog rasta do odraslog doba, parenja i produkcije F_2 generacije, sve dok F_2 generacija ne bude odbijena od sise.

Obavljaju se klinička opažanja i patološki pregledi na svim životinjama kako bi se utvrdili znaci toksičnosti sa posebnim naglaskom na efekte na integritet i sposobnost muških i ženskih reproduktivnih sistema i rast i razvoj potomstva.

1.3. Opis metode

1.3.1. Izbor životinjskih vrsta

Vrsta za ispitivanje je pacov. Ukoliko se koriste druge vrste, dati opravdanje, a neophodne su i odgovarajuće izmjene metode. Ne koristiti sojeve sa slabom plodnošću ili one sa poznatom visokom učestalošću pojave nedostataka u rastu i razvoju. Na početku studije varijacija u tjelesnoj masi životinja koje se koriste je minimalna i ne prelazi 20% srednje tjelesne mase za svaki pol.

1.3.2. Uslovi smještaja i ishrane

Temperatura u eksperimentalnoj prostoriji za životinje je 22°C (±3°C). Relativna vlažnost je najmanje 30%, i po mogućnosti da ne prelazi 70%, osim za vrijeme čišćenja prostorije. Idealna vlažnost je 50% do 60%. Osvetljenje je vještačko, uz izmjenu 12 sati svijetla i 12 sati mraka. Za hranjenje se koristi uobičajena laboratorijaska ishrana uz neograničenu količinu vode za piće. Izbor ishrane može da bude pod uticajem potrebe da se obezbijedi odgovarajuća miješavina ispitivane supstance koja se primjenjuje ovom metodom.

Životinje su smještene pojedinačno ili u kavezima u malim grupama istog pola. Parenje se obavlja u odgovarajućim kavezima. Nakon dokazane kopulacije, sparene ženke smještiti pojedinačno u kaveze za poroĐaj ili materinstvo. Spareni pacovi se drže u malim grupama i odvojeni jedan ili dva dana prije koćenja. Sparenim životinjama obezbijediti određeni odgovarajući materijal za gnežĐenje neposredno prije poroĐaja.

1.3.3. Priprema životinja

Koriste se zdrave mlade životinje koje su se aklimatizovale na laboratorijaske uslove tokom najmanje pet dana i koje nisu bile podvrgnute prethodnim eksperimentalnim pokolonama. Eksperimentalne životinje okarakterisati prema vrsti, soju, izvoru, polu, tjelesnoj masi i/ili starosti. Kako bi se izbjeglo parenje srodnih životinja poznato je bilo koje srodstvo među životinjama. Životinje se slučajnim izborom klasifikujeju u kontrolne ili tretirane grupe (stratifikacija po tjelesnoj masi). Kaveze rasporediti tako da se smanje mogući efekti rasporeda kaveza. Svakoj životinji pripisati jedinstveni identifikacioni broj. Za P generaciju ovo se radi prije početka doziranja. Za F_1 generaciju ovo se radi prilikom odbijanja od sise za životinje koje su odabrane za parenje. Podaci o leglu iz kog potiče životinja čuvaju se za sve izabrane F_1 životinje. Pojedinačna identifikacija mladunaca odmah nakon rođenja preporučuje se prilikom individualnog mjerenja mladunaca ili prilikom razmatranja bilo kakvog funkcionalnog ispitivanja.

Roditeljske (P) životinje su stare oko pet do devet nedjelja na početku doziranja. Životinje svih eksperimentalnih grupa su ujednačene tjelesne mase i starosti.

1.4. Postupak

1.4.1. Broj i pol životinja

Svaka eksperimentalna i kontrolna grupa ima dovoljan broj životinja kako bi se dobilo ne manje od 20 gravidnih ženki na porođaju ili pred porođaj. Za supstance koje uzrokuju neželjene efekte tokom tretmana (npr. sterilnost, izražena toksičnost pri visokim dozama), ovo nije moguće. Cilj je da se dobije dovoljno trudnoća kako bi se obezbijedila značajna ocjena potencijala supstance da utiče na plodnost, trudnoću i materinsko ponašanje, sisanje, rast i razvoj F_1 potomstva od začeća do zrelosti, kao i na rast i razvoj njihovog potomstva (F_2) do odbijanja od sise. Ako se ne postigne željeni broj gradivnih životinja (odnosno 20) studija nije obavezno neodgovarajuća i procjenjuje se od slučaja do slučaja.

1.4.2. Priprema doza

Ispitivana supstanca se daje peroralno (putem hrane, vode za piće ili sondom), osim ukoliko se neki drugi put primjene (npr. dermalno ili inhalaciono) ne smatra prikladnijim.

Ispitivana supstanca se rastvara ili suspenduje u odgovarajućem vehikulumu. Preporučuje Koristi se vodeni rastvor/suspenzija, a zatim da se razmotri rastvor/emulzija u ulju (npr. kukuruzno ulje) i zatim rastvor u nekom drugom vehikulumu. Za vehikulume koji nisu voda poznate su toksične karakteristike. Odrediti stabilnost ispitivane supstance u vehikulumu.

1.4.3. Doziranje

Koristi se najmanje tri dozna nivoa i istovremena kontrola. Osim ukoliko nije ograničena fizičkom i hemijskom prirodom ili biološkim efekatima ispitivane supstance, odabrati najveći dozni nivo sa ciljem da se izazove toksičnost ali ne smrt ili teška patnja. U slučaju neočekivane smrtnosti, studija sa stopom smrtnosti od manje od 10% kod roditeljskih (P) životinja još uvjek je prihvatljiva. Opadajući niz doznih nivoa odabrati tako da se pokaže bilo kakav efekat povezan sa doziranjem i nivoom doza pri kojima se ne primećuju štetni efekti (NOAEL). Optimalni su

dvostruki do četvorostrukih intervala za postavljanje opadajućih doznih nivoa, a dodatak četvrte eksperimentalne grupe je prihvatljiviji od korišćenja vrlo velikih intervala (npr. više od faktora 10) između doziranja. Za studije ishrane intervali doza nisu veći od trostrukih. Nivoe doza odabrati uzimajući u obzir bilo koje postojeće podatke o toksičnosti, posebno rezultate iz studija s ponovljenim doziranjem. Uzeti u obzir bilo koje rapoložive podatke o metabolizmu i kinetici ispitivanog jedinjenja ili sličnih materijala. Ovi podaci pomažu u pokazivanju adekvatnosti režima doziranja.

Kontrolna grupa je netretirana grupa ili grupa sa vehikulumom ukoliko se on koristi za primjenu ispitivane supstance. Osim tretmana sa ispitivanom supstancom, životinje u kontrolnim grupama tretirati na identičan način kao i jedinke iz tretiranih grupa ispitivanja. Ukoliko se koristi vehikulum, kontrolna grupa dobija vehikulum u najvećoj zapremini koja se koristi. Ukoliko se ispitivana supstanca daje putem hrane i uzrokuje smanjeno uzimanje ili iskoristljivost hrane, korišćenje kontrolne grupe za unos hrane smatra se neophodnim. Alternativno, podaci iz kontrolisanih studija namjenjenih za ocjenjivanje efekata smanjene potrošnje hrane na reproduktivne parametre koriste se umjesto istovremene kontrolne grupe za unos hrane.

Uzeti u obzir sljedeće karakteristike vehikuluma i drugih aditiva: efekti na apsorpciju, raspoDijelu, metabolizam ili zadržavanje ispitivane supstance; efekte na hemijske osobine ispitivane supstance koji mijenjaju njena toksična svojstva i efekte na potrošnju hrane ili vode, ili na nutritivni status životinja.

1.4.4. Ispitivanje granične doze

Ukoliko se u oralnoj studiji pri jednom doznom nivou od najmanje 1.000 mg/kg TM/dan ili, za primjenu putem hrane ili vode odgovarajući procenat koji se koristi u postupku opisanom u ovoj studiji, ne uzrokuje uočljive toksične efekte kod roditeljskih životinja ili njihovog potomstva, i ako se toksičnost ne očekuje na osnovu podataka iz strukturno i/ili metabolički sličnih jedinjenja, nije neophodna cijela studija uz korišćenje nekoliko doznih nivoa. Primjenjuje se ispitivanje granične doze, osim u slučaju kad izloženost ljudi ukazuje na potrebu za korišćenjem viših nivoa oralne doze. Za druge načine primjene kao što su inhalacija i dermalna primjena, fizička i hemijska svojstva ispitivane supstance, kao što su rastvorljivost, ukazuju na granicu najvećeg ostvarljivog nivoa izlaganja.

1.4.5. Primjena doza

Životinje se doziraju ispitivanom supstancom sedam dana u nedelji. Preporučuje se oralna primjena (hrana, piće ili sonda). Ukoliko se koristi neki drugi put primjene, to opravdati i učiniti potrebne izmjene. Sve životinje su dozirane na isti način tokom odgovarajućeg perioda ispitivanja. Kad se ispitivana supstanca primjenjuje sondom, primjena se obavlja putem trbušne cijevi. Zapremina primjenjene tečnosti ne prelazi 1 ml/kg TM (0,4 ml/100 g TM najviše za kukuruzno ulje), osim u slučaju vodenih rastvora gdje se koristi 2 ml/100 g TM. Osim kod iritabilnih i korozivnih supstanci koje pokazuju lošije efekte u većim koncentracijama, varijabilnost zapremine koja se primjenjuje minimalizovati prilagoĐavanjem koncentracije kako bi se obezbijedila konstantna zapremina pri svim doznim nivoima. Kod prisilnog hranjenja mladunci primaju eksperimentalnu supstancu kroz mlijeko, sve dok se ne doziraju direktno nakon odbijanja od sise. Kada se supstanca primjenjuje putem hrane ili vode za piće, mladunci dodatno primaju ispitivanu supstancu čim počnu samostalno da se hrane za vrijeme posljednje nedelje perioda laktacije.

Kod supstance koja se daje putem hrane ili vode za piće, obezbijediti da količina primjenjene ispitivane supstance ne utiče na balans normalne ishrane ili vode. Kad se ispitivana supstanca daje putem hrane, koristi se stalna prehrambena koncentracija (ppm) ili stalni dozni nivo prema tjelesnoj masi životinje. Alternativne metode se obrazlažu. Ukoliko se supstanca daje prisilno, doza je primjenjena u slično vrijeme svakog dana i prilagođena najmanje nedeljno kako bi se održao konstantni dozni nivo u odnosu na tjelesnu masu životinje. Podatke o placentalnoj raspodijeli uzeti u obzir prilikom prilagođavanja prisilne doze zasnovane na tjelesnoj masi.

1.4.6. Eksperimentalni rasporedi

Dnevno doziranje roditeljskih (P) mužjaka i ženki započeti kad su stari pet do devet nedjelja. Dnevno doziranje F_1 mužjaka i ženki započinje po odbijanju od sise. U slučaju primjene ispitivane supstance putem hrane ili vode za piće, direktno izlaganje F_1 mladunaca ispitivanoj supstanci započinje već za vrijeme perioda laktacije. Za oba pola (P i F_1), doziranje nastaviti najmanje 10 nedjelja prije perioda parenja. Doziranje se nastavlja za oba pola za vrijeme dvonedeljnog perioda parenja. Muške jedinke humano žrtvovati i pregledati kada više ne budu potrebne za ocjenjivanje reproduktivnih efekata. Za roditeljske (P) ženke, doziranje nastaviti tokom trudnoće i sve do odbijanja od sise F_1 potomaka. Uzeti u obzir modifikacije u rasporedu doziranja na osnovu rapoloživih podataka o ispitivanoj supstanci, uključujući postojeće podatke o toksičnosti, indukciji metabolizma ili bioakumulaciji. Doza za svaku životinju je zasnovana na najskorijim mjerenjima tjelesne mase. Obratiti pažnju prilikom prilagođavanja doze tokom posljednjeg tromesečja trudnoće.

Tretiranje P i F_1 mužjaka i ženki nastavlja se do žrtvovanja. Sve P i F_1 odrasle mužjake i ženke humano žrtvovati kada više nisu potrebni za procjenu reproduktivnih efekata. F_1 potomstvo koje nije odabrano za parenje i čitavo F_2 potomstvo humano žrtvovati nakon odbijanja od sise.

1.4.7. Postupak parenja

1.4.7.1. Roditeljsko (P) parenje

Za svako parenje svaku ženku smještiti sa jednim mužjakom iz istog doznog nivoa (1:1 parenje) sve dok ne dođe do kopulacije ili dok ne proteknu dve nedelje. Ženke se svaki dan pregledaju na prisutnost sperme ili vaginalnog čepa. Nulti dan trudnoće definiše se kao dan kad se pronađe sperma ili vaginalni čep. U slučaju da parenje nije uspješno, razmotriti ponovno parenje ženki sa dokazanim mužjacima iz iste grupe. Parovi su naznačeni u podacima. Parenje srodnih jedinki izbjegavati.

1.4.7.2. F1 parenje

Za parenje F_1 potomstva izabere se najmanje jedan mužjak i jedna ženka pri odbijanju od sise iz svakog legla za parenje sa drugim mladuncima iz istog doznog nivoa ali iz drugog legla, kako bi se proizvela F_2 generacija. Izbor mladunaca iz svakog legla je slučajan ukoliko se ne uoče značajne razlike u tjelesnoj masi ili izgledu između jedinki u leglu. U slučaju da se takve razlike uoče, biraju se najbolji predstavnici svakog legla. Ovo se najbolje obavlja na osnovu tjelesne mase, ali je pogodnije da se obavi na osnovu izgleda. F_1 potomstvo ne pariti sve dok ne dostigne punu seksualnu zrelost.

Parovi bez potomaka pregledaju se kako bi se utvrdio uzrok neplodnosti. To uključuje postupke kao što su: dodatne prilike za parenje sa drugim dokazanim jedinkama, mikroskopski pregled reproduktivnih organa i ispitivanje estrus ciklusa ili spermatogeneze.

1.4.7.3. Drugo parenje

U nekim slučajevima, kao što su promjene u veličini legla povezane sa tretmanom ili uočavanje sumnjivog efekta za vrijeme prvog parenja, preporučuje se da se P ili F_1 odrasle jedinke ponovo pare kako bi se proizvelo drugo leglo. Preporučuje se da se ponovno pare mužjaci ili ženke koje nisu proizvele potomstvo s dokazanim priplodnim životinjama suprotnog pola. Ukoliko je drugo leglo neophodno u bilo kojoj generaciji, životinje ponovno pariti približno jednu nedelju nakon odbijanja od sise prethodnog legla.

1.4.7.4. Veličina legla

Životinjama omogućiti da imaju normalna legla i da odgajaju svoje potomstvo do odbijanja od sise. Standardizacija veličine legla nije obavezna. Ako se izvodi standardizacija, korišćenu metodu detaljno opisati.

1.5. Posmatranja

1.5.1. Klinička posmatranja

Svakog dana obavljati opšta klinička posmatranja, a u slučaju prisilnog hranjenja njegov vremenski raspored uzeti u obzir predviđeno vrijeme za pojavu maksimalnih efekata nakon doziranja. Promjene u ponašanju, znaci teškog ili dugotrajnog koćenja i svi znaci toksičnosti se zabilježavaju. Detaljniji pregled svake životinje obaviti najmanje jednom nedeljno i najbolje ga je obavljati prilikom mjerenja tjelesne mase životinja. Dva puta dnevno, a tokom vikenda jednom dnevno, kad odgovara, sve životinje pregledati na morbiditet i smrtnost.

1.5.2. Tjelesna masa i konzumiranje, hrane/vode roditeljskih životinja

Tjelesna masa roditeljskih životinja (P i F_1) mjeri se prvog dana doziranja i najmanje jednom nedeljno nakon toga. Tjelesna masa roditeljskih ženki (P i F_1) mjeri se najmanje nultog, sedmog, četrnaestog, dvadesetog ili dvadeset prvog dana gestacije, kao i za vrijeme laktacije u iste dane kada se mjeri masa legla i na dan kad se životinje žrtvuju. Ova opažanja navesti pojedinačno za svaku odraslu životinju. Prije parenja i u periodu gestacije potrošnja hrane se mjeri najmanje jednom nedeljno. Unos vode mjeri se najmanje jednom nedeljno ukoliko se ispitivana supstanca primjenjuje putem vode.

1.5.3. Estrus ciklus

Dužina i normalnost estrus ciklusa ocjenjuju se za P i F_1 ženke vaginalnim brisevima prije parenja i po izboru za vrijeme parenja, dok se ne pronađu dokazi parenja. Kod dobijanja vaginalnih/cervikalnih ćelija, paziti kako bi se izbjeglo nadraživanje (prekidanje, perturbacija, poremećaj) sluznice i potom izazivanje lažne trudnoće[1].

1.5.4. Parametri sperme

Za sve P i F_1 mužjake prilikom žrtvovanja bilježi se masa testisa i epididimisa i po jedan od organa se čuva za histopatološki pregled (tačka 1.5.7. i 1.5.8.1. ove metode). Od podskupa od najmanje deset mužjaka iz svake grupe P i F_1 mužjaka preostali testisi i epididimisi se koriste za prebrojavanje spermatida otpornih na homogenizaciju i rezerve spermatozoida kaudalnog dijela epididimisa. Iz iste podgrupe mužjaka spermatozoide iz kaude epididimidisa ili vas deferens-a prikupiti zbog ocjenjivanja njihove mobilnosti i morfologije. Ukoliko se uoče efekti u vezi sa tretmanom ili kada postoje dokazi o tome iz drugih studija o mogućim efektima na spermatogenezu, ocjenjivanje spermatozoida obaviti kod svih mužjaka u svakoj doznoj grupi. U protivnom se brojanje ograničava na P i F_1 mužjake iz kontrolne i visokodozne grupe.

Izbrojati ukupni broj spermatida testisa otpornih na homogenizaciju i spermatozoida kaudalnog dela epididimisa . Kaudalne rezerve spermatozoida izvode se iz koncentracije i zapremine sperme u suspenziji korišćenoj za kompletiranje kvalitativnih ocjenjivanja i broja spermatozoida dobijenog kasnijim mljevenjem i/ili homogenizaciom preostalog kaudalnog tkiva. Brojanje obaviti na odabranoj podgrupi mužjaka iz svih doznih grupa odmah nakon žrtvovanja životinja, osim ako se ne naprave video ili digitalni snimci ili ako se primjerci ne zamrznu i analiziraju kasnije. U tim slučajevima kontrolne i grupe velikih doza prve se analizirati. Ukoliko se ne uoče efekti u vezi sa tretmanom (npr. efekti na broj spermatozoida, pokretljivost ili morfologiju), preostale grupe se ne analiziraju. Kada se takvi efekti uoče u grupi visoke doze, onda se ocjenjuju i grupe nižih doza.

Pokretljivost epididimalnih (ili ductus deferens) spermatozoida ocjeniti ili snimiti odmah nakon žrtvovanja. Sperma se pribavlja uz minimalnu štetu i razblažuje za analizu pokretljivosti korišćenjem prihvatljivih metoda[4]. Procenat progresivno pokretljivih spermatozoida određuje se subjektivno ili objektivno. Kada se obavlja kompjuterska analiza pokretljivosti izvoĐenje progresivne pokretljivosti se oslanja na korisnički definisane granične vrijednosti za prosječnu brzinu i pravac putanje ili na linearni indeks. Ukoliko su uzorci snimljeni ili ukoliko postoje slike zabilježene na drugačiji način u trenutku obdukcije, obavlja se kasnija analiza P i F_1 mužjaka samo iz kontrolne i grupe s visokom dozom, osim ukoliko se ne uoče efekti vezani za tretman. U tom slučaju se analiziraju i grupe nižih doza. Ukoliko nema video ili digitalnog zapisa svi uzorci u svim tretiranim grupama se analiziraju pri postmortalnom pregledu.

Uraditi morfološku analizu uzorka spermatozoida iz epididimidisa (ili vas deferens-a). Spermatozoide (najmanje 200 po uzorku) analizirati kao fiksirani, mokri preparat i klasifikovati kao normalne ili abnormalne. Primjeri morfološke abnormalnosti spermatozoida uključuju fuziju, izolovane glave i deformisane glave i/ili repove. Ocjenjivanje se obavlja na odabranoj podgrupi mužjaka svih doznih grupa, bilo odmah nakon žrtvovanja životinja ili kasnije na osnovu video ili digitalnih snimaka. Jednom fiksirani razmazi se čitaju i kasnije. U tim slučajevima prvo se analiziraju kontrolne i grupe visokih doza.

Ukoliko se ne uoče efekti u vezi sa tretmanom (npr. efekti na morfologiju spermatozoida), preostale grupe se ne analiziraju. Kada se takvi efekti uoče kod grupe visoke doze, onda se i grupe nižih doza ocjenjuju.

Ukoliko je bilo koji od gore navedenih parametara za ocjenjivanje sperme već ispitan kao dio studije sistemske toksičnosti koja traje najmanje 90 dana, takve analize ne ponavljati u studiji

na dvije generacije. Preporučuje se da se sačuvaju uzorci ili digitalni snimci sperme P generacije, kako bi se po potrebi omogućila kasnija analiza.

1.5.5. Potomstvo

Svako leglo pregledati što je moguće prije nakon koćenja (dan laktacije 0) kako bi se ustanovio broj i pol mladunaca, mrtvoroĐeni, živoroĐeni i prisutnost većih anomalija. Mladunce koji su pronaĐeni mrtvi na dan 0, ukoliko nisu macerirani, pregledati kako bi se otkrili mogući defekti i uzrok smrti i sačuvati ih. Žive mladunce prebrojati i izmjeriti tjelesnu masu svakog pojedinačno, po roĐenju (dan laktacije 0) ili na dan 1 i danima koji su redovno predviĐeni za mjerenje tjelesne mase, npr. dani 4, 7, 14. i 21. dan laktacije. Bilježe se fizičke ili anomalije u ponašanju uočene na majkama ili potomstvu.

Fizički razvoj potomstva bilježi se prije svega prema dobijanju na tjelesnoj masi. Drugi fizički parametri (npr. otvaranje uha i oka, izbijanje zuba, rast dlake) daju dodatne podatke, ali je ove podatke najbolje ocjenjivati u kontekstu podataka o polnom sazrijevanju (npr. starost i tjelesna masa prilikom otvaranja vagine ili balano-prepucijalne separacije). Funkcionalna ispitivanja npr. motorike, senzorne funkcije, ontogenog refleksa) F_1 potomstva pre i/ili nakon odbijanja od sise, posebno ona vezana uz polno sazrijevanje sprovode se ukoliko nisu uključena u posebne studije. Starost prilikom sazrijevanja vagine i prepucijalne separacije utvrditi za F_1 mladunce koji se odbijaju od sise, a koji su odabrani za parenje. Anogenitalno rastojanje izmjeriti nultog postnatalnog dana kod F_2 mladunaca ukoliko je izazvano alteracijama u odnosu polova u F_1 ili vremenu polnog sazrijevanja.

Funkcionalna posmatranja se izostavljaju kod grupa koje na drugi način pokazuju jasne znake štetnih efekata (npr. značajno smanjenje u dobijanju na tjelesnoj masi, itd.). Ukoliko se rade funkcionalna istraživanja, ne izvoditi ih na mladuncima koji su odabrani za parenje.

1.5.6. Postmortalni pregled

Prilikom zaključivanja ili smrti i toku studije, sve roditeljske životinje (P i F_1), sve mladunce sa poljnjim abnormalnostima ili kliničkim znacima, kao i jedno slučajno odabrano mladunče po polu, po leglu, iz F_1 i F_2 generacije, makroskopski pregledati kako bi se uočile bilo kakve strukturne abnormalnosti ili patološke promjenePosvetiti pažnju organima reproduktivnog sistema. Humano žrtvovane mladunce naĐene na samrti i mrtvu mladunčad, kada nisu macerirana, ispitati na moguće defekte i/ili uzrok smrti i sačuvati.

Materice svih ženki koje su jednom raĐale pregledati na prisustvo i broj implantacionih mjesta na način koji ne kompromituje histopatološko ocjenjivanje.

1.5.7. Mjerenje mase organa

Prilikom zaključivanja utvrđuje se tjelesna masa i masa sljedećih organa za sve P i F_1 roditeljske životinje (parni organi se mjere individualno):
- materica, jajnici;
- testisi, epididimidis (ukupno i kauda);
- prostata;

- sjemene kesice sa koagulacionim žlijezdama i njihove tečnosti i prostata (kao jedna jedinica);
- mozak, jetra, bubrezi, slezina, hipofiza, tiroidna i adrenalne žlijezde i poznati ciljni organi.

Utvrđuje se terminalna tjelesna masa za F1 i F2 mladunce koji su odabrani za obdukciju. Mjere se sljedeći organi od jednog slučajno odabranog mladunca po polu, po leglu (tačka 1.5.6. ove metode): mozak, slezina i timus.

Rezultate obdukcije i mjerenja mase organa procjeniti u kontekstu sa zapažanjima iz drugih studija sa ponovljenim dozama, kada je izvodljivo.

1.5.8. Histopatološka ispitivanja

1.5.8.1. Roditeljske životinje

Sljedeći organi i tkiva roditeljskih (P i F_1) životinja ili reprezentativni uzorci istih se fiksiraju i čuvaju u odgovarajućem medijumumu za histopatološku analizu:
- vagina, materica sa cerviksom i jajnici (sačuvani u odgovarajućem fiksativu);
- jedan testis (sačuvan u Bouin-ovom ili sličnom fiksativu), jedan epididimis, sjemene kesice, prostata i koagulaciona žlijezda;
- prethodno identifikovani ciljni organi od svih P i F_1 životinja odabranih za parenje.

Potpuna histopatološka ispitivanja gore navedenih sačuvanih organa obaviti za sve jedinke iz grupe kojoj je davana visoka doza i kontrolne grupe P i F_1 životinja izabranih za parenje. Ispitivanje jajnika P životinja je opcionalno. Organi koji pokazuju promjene vezane za tretman ispitati u grupama niske i srednje doze kako bi se pomoglo određivanje NOAEL. Reproduktivne organe životinja u grupama s niskim i srednje visokim dozama za koje se sumnja na smanjenu plodnost, npr. onih koje se nisu parile, koje nisu začele, iznele ili rodile zdravo potomstvo ili na čiji je estrus ciklus, broj spermatozoida, mobilnost ili morfologiju bilo uticaja, podvrgnuti histopatološkom ocjenjivanju. Ispitati sva veća oštećenja kao što su atrofija ili tumori.

Obaviti detaljni histopatološki pregled testisa (npr. korišćenjem Bouinovog fiksativa, učvršćivanjem parafinom i poprečnim presecima debljine 4 µm do 5 µm) kako bi se identifikovali efekti vezani za tretman kao što su zadržane spermatide, slojevi ili tipovi germinativnih ćelija koji nedostaju, divovske ćelije sa više jedara ili otpadanje spermatogenih ćelija u lumen. Pregled intaktnog epididimisa uključuje pregled glave, tijela i repa što se može postići analizom uzdužnih presjeka. Epididimis pregledati na infiltraciju leukocita, promjene u preovlađujućim tipovima ćelija, nenormalne tipove ćelija i fagocitozu spermatozoida. Bojenje PAS-om i hematoksilinom koristiti se za pregled muških reproduktivnih organa.

Postlaktacioni jajnik sadrži primordijalne i rastuće folikule kao i velika žuta tijela laktacije. Histopatološki pregled otkriva kvalitativno smanjenje populacije primordijalnih folikula. Obaviti kvantitativna analiza primordijalnih folikula za F_1 ženke; broj životinja, izbor presjeka jajnika i veličina uzorka presjeka treba da budu statistički odgovarajući za postupak ocjenjivanja koji se koristi. Pregled uključuje prebrojavanje primordijalnih folikula koji su kombinovani sa malim rastućim folikulama zbog poređenja tretiranih i kontrolnih jajnika .

1.5.8.2. Mladunci odbijeni od sisanja

Izuzetno, nenormalno tkivo i ciljani organi svih mladunaca sa poljnim abnormalnostima ili kliničkim znacima, kao i oni organi od slučajno odabranog mladunaca po polu, po leglu iz obije F_1 i F_2 generacije, koji nisu odabrani za parenje biće fiksirani i čuvani u odgovarajućem medijumumu za histopatološki pregled. Puna histopatološka karakterizacija sačuvanog tkiva obavlja se uz poseban naglasak na organe reproduktivnog sistema.

2. Podaci

2.1. Obrada rezultata

Podaci se navode pojedinačno i tabelarno. Navode se podaci za svaku eksperimentalnu grupu i svaku generaciju i to: broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje su pronaĐene mrtve za vrijeme ispitivanja ili žrtvovane iz humanih razloga, vrijeme bilo koje smrti ili humanog žrtvovanja, broj plodnih životinja, broj gravidnih ženki, broj životinja koje pokazuju znake toksičnosti, opis uočenih znakova toksičnosti, uključujući, vrijeme nastanka, trajanje i ozbiljnost toksičnih efekata, tipove zapažanja kod roditelja i potomstva, tipove histopatoloških promjena i sve relevantne podatke o leglu.

Numeričke rezultate ocjeniti odgovarajućom opšteprihvaćenom statističkom metodom. Statističke metode odabrati prilikom koncipiranja studije i opravdati ih. Statistički modeli dozaodgovor se koriste za analizu podataka. Izvještaj uključuje dovoljno podataka o metodi analize i o primjenjenom kompjuterskom programu kako bi nezavisni ocjenjivač/statističar mogao ponovno da procjeni i rekonstruiše analizu.

2.2. Ocjenjivanje rezultata

Nalazi ove studije toksičnosti po reprodukciju na dvije generacije ocjenjuju se u smislu uočenih efekata uključujući obdukcione i mikroskopske nalaze. Ocjenjivanje uključuje vezu ili nepostojanje veze između doze ispitivane supstance i prisustva ili odsustva pojave i ozbiljnosti abnormalnosti, uključujući veća oštećenja, identifikovane ciljne organe, efekt na plodnost, kliničke abnormalnosti, efekt na reprodukciju i na legla, promjene tjelesne mase, efekte na smrtnost i sve druge toksične efekte. Prilikom ocjenjivanja rezultata ispitivanja uzeti u obzir fizička i hemijska svojstva ispitivane supstance i kada su dostupni toksikokinetičke podatke. Pravilno izvedeno ispitivanje toksičnosti po reprodukciju obezbiješĐuje zadovoljavajuću procjenu nivoa bez efekta i razumjevanje štetnih efekata na reprodukciju, raĐanje, laktaciju, postnatalni rast i razvoj, uključujući rast i polni razvoj.

2.3. Tumačenje rezultata

Ispitivanje toksičnosti po reprodukciju na dvije generacije daje podatke o efektima ponovljenog izlaganja supstanci za vrijeme svih faza reproduktivnog ciklusa. Studija daje podatke o reproduktivnim parametrima i o razvoju, rastu, sazrijevanju i preživljavanju potomstva. Rezultati studije tumače se zajedno sa nalazima subhroničkih studija, ispitivanja prenatalnog rasta i razvoja, toksikokinetičkih i drugih rapoloživih studija. Rezultati ove studije koriste se u procjeni potrebe za daljim ispitivanjem hemikalije. Ekstrapolacija rezultata studije na čovjeka je prihvatljiva do određenog stepena. Najbolje je da se koriste za obezbiješĐivanje podataka o nivou bez efekta i za dozvoljeno izlaganje ljudi.

3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o: 1) Ispitivanoj supstanci:

- fizička priroda i, ako je relevantno, fizička i hemijska svojstva; - identifikacioni podaci;
- čistoća.

2) Vehikulumu (ako odgovara):

- opravdanje za izbor vehikuluma ako nije u pitanju voda. 3) Eksperimentalnim životinjama:
- korišćena vrsta/soj;
- broj, starost i pol životinja;
- izvor, uslovi smještaja, ishrana, materijal za gnežĐenje, itd.;
- individualna težina životinja na početku ispitivanja. 4) Uslovima ispitivanja:
- obrazloženje izbora nivoa doze;
- detalji o ispitivanoj supstanci formulacija/priprema hrane, postignute koncentracije;
- stabilnost i homogenost preparata;
- detalji o primjeni ispitivane supstance;
- preračunavanje iz koncentracije ispitivane supstance u hrani/vodi za piće (ppm) do postignute doze (mg/kg tjelesna masa/dan), ako je primjenjivo; - podaci o kvalitetu hrane i vode.

5) Rezultatima:

- potrošnja hrane i vode, ako je dostupno, iskorišćenje hrane (dobijanje na tjelesnoj masi po gramu konzumirane hrane) i potrošnja ispitivanog materijala za P i F_1 životinje, osim za period kohabitacije i za nakondnju trećinu perioda laktacije;
- podaci o apsorpciji (ako su dostupni);
- podaci o tjelesnoj masi za P i F_1 životinje koje su izabrane za parenje;
- podaci o masi legla i mladunaca;
- tjelesna masa pri žrtvovanju i apsolutna i relativna masa organa za roditeljske životinje;
- priroda, ozbiljnost i trajanje kliničkih zapažanja (bilo da su reverzibilni ili ne);
- vrijeme smrti tokom studije ili da li su životinje preživjele do žrtvovanja;
- podaci o toksičkim reakcijama po polu i dozi, uključujući indekse parenja, plodnosti, gestacije, roĐenja, održivosti i laktacije; Izvještaj treba navesti brojeve korišćene za iizračunavanje ovih indeksa;
- toksični i drugi efekti na reprodukciju, potomstvo, postnatalni rast, itd.; - nalazi obdukcije;
- detaljan opis svih histopatoloških nalaza;
- broj P i F_1 životinja sa normalnim ciklusom i trajanje ciklusa;
- ukupni broj spermatozoida kaude epididimis, procenat progresivno pokretljivih spermatozoida, procenat morfološki normalnih spermatozoida i procenat spermatozoida sa svakom identifikovanom abnormalnošću;
- vrijeme do parenja, uključujući broj dana do parenja;
- trajanje gestacije;
- broj implantacija, žutih tijela, veličina legla;
- broj živoroĐenih i post-implantacioni gubitak;
- broj mladunaca sa većim vidljivim abnormalnostima, ukoliko je određen treba navesti broj kržljavaca;

- podaci o fizičkim obilježjima kod mladunaca i drugi podaci o postnatalnom rastu i razvoju; proučena fizička obeležja moraju biti opravdana;
- podaci o funkcionalnim zapažanjima kod mladunaca i odraslih jedinki, ako je primjenjivo; - statistička analiza rezultata, kad odgovara. 6) Obrazloženju rezultata.

7) Zaključcima, uključujući NOAEL vrijednosti za efekte na majku i potomstvo.

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

1.2. Definicije

Definicije su date u Opšti uvod.

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance nijesu propisane.

1.4. Princip metode

Supstanca koja se ispituje primjenjuje se odgovarajućim putem. Zavisno od svrhe studije, supstanca se daje kao pojedinačna ili u ponovljenoj dozi tokom određenog perioda, jednoj ili više grupa eksperimentalnih životinja. Nakon toga, zavisno od tipa ispitivanja određuje se supstanca i/ili metaboliti u telesnim tečnostima, tkivima i/ili ekskretima.

Studija se obavlja sa "neobilježenim" ili "obilježenim" oblicima supstance koja se ispituje. Kad se koristi oznaka, ona se nalazi u supstanci na takvom mjestu da se obezbijedi što je moguće više podataka o sudbini jedinjenja.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta nijesu propisani.

1.6. Opis metode

1.6.1. Pripreme

Zdrave mlade odrasle životinje aklimatizuju se na laboratorijaske uslove najmanje pet dana prije obavljanja ispitivanja. Prije ispitivanja životinje se slučajnim izborom svrstavaju u grupe za tretiranje. U posebnim slučajevima se koriste i vrlo mlade, gravidne ili prethodno tretirane životinje.

1.6.2. Eksperimentalni uslovi

1.6.2.1. Eksperimentalne životinje

Toksikokinetička ispitivanja se izvode na jednoj ili više odgovarajućih životinjskih vrsta. Uzimaju se u obzir vrste koje su korišćene i koje će se koristiti u drugim studijama toksičnosti iste ispitivane supstance. Kad se u ispitivanju koriste glodari, varijacija tjelesne mase ne prelazi ±20% srednje tjelesne mase. 1.6.2.2. Broj i pol

Na početku, za ispitivanja apsorpcije i izlučivanja, koristiti četiri životinje u svakoj doznoj grupi. Nije obavezan izbor jednog određenog pola, ali pod određenim uslovima ispituju se oba pola. Ukoliko postoje razlike u odgovoru između polova, ispitati po četiri životinje svakog pola. U slučaju ispitivanja sa vrstama koje nisu glodari, koristi se manji broj životinja. Kada se ispituje raspodjela u tkivima, na početku, prilikom određivanja veličine grupe, uzima se u obzir broj životinja koje će se žrtvovati u svakoj vremenskoj instanci (tački) i broj vremenskih instanci koji se ispituje.

Kod ispitivanja metabolizma veličina grupe zavisi od potreba studije. Kod ispitivanja višestrukih doza ili višestrukih vremenskih instanci, veličina grupe zavisi od broja vremenskih tačaka i od planiranih žrtvovanja, ali nije manja od dvije životinje. Veličina grupe je dovoljna da obezbijedi prihvatljivu karakterizaciju resorpcije, platoa i eliminacije (ako odgovara) supstance koja se ispituje i/ili metabolita.

1.6.2.3. Dozni nivoi

U slučaju primjene pojedinačne doze koriste se najmanje dva nivoa doza: niska doza bez toksičnog efekta i visoka doza pri kojoj se pojavljuju promjene u toksikokinetičkim parametrima ili pri kojoj se javljaju toksični efekti.

U slučaju primjene ponovljenog doziranja dovoljna je niska doza, ali pod određenim uslovima visoka doza je neophodna.

1.6.2.4. Put primjene

U toksikokinetičkim studijama koristiti isti put i, kada odgovara, isti vehikulum kao što se koristi ili će biti korišćen u drugim studijama toksičnosti. Ispitivana supstanca se daje grupama eksperimentalnih životinja oralno prisilnim davanjem ili u hrani, nanosi se na kožu ili primjenjuje inhalacijom tokom određenih vremenskih perioda. Intravenska primjena ispitivane supstance je korisna za utvrĐenje relativne apsorpcije kada se supstanca primjenjuje drugim putevima. Odmah nakon intravenskog davanja supstance dobijaju se korisni podaci o načinu raspodjele.

Uzeti u obzir mogućnost interferencije vehikuluma sa ispitivanom supstancom. Posvetiti pažnju razlikama u apsorpciji između primjene ispitivane supstance prisilnim davanjem i u hrani i potrebe za tačnim (preciznim) određivanjem doze, posebno kad se supstanca daje putem hrane.

1.6.2.5. Period posmatranja

Sve životinje se svakodnevno posmatraju. Svakodnevno se bilježe znaci toksičnosti i drugi relevantni klinički znaci, uključujući vrijeme njihovog nastepena, stepen i trajanje.

1.6.3. Postupak

Nakon mjerenja tjelesne mase, životinjama se odgovarajućim putem primjenjuje supstanca koja se ispituje. Ako je relevantno, životinje se stavljaju na gladovanje prije primjene supstance koja se ispituje.

1.6.3.1. Apsorpcija
Brzina i stepen apsorpcije primjenjene supstance se određuju korišćenjem različitih metoda, sa i bez referentnih grupa[L], na primjer:

- određivanjem količine ispitivane supstance i/ili metabolita u ekskretima, kao što su urin, žuč, stolica, izdahnuti vazduh i u ostacima mrtvih životinja;
- poređenjem bioloških reakcija (tj. studije akutne toksičnosti) između tretiranih grupa i kontrolnih i/ili referentnih grupa;
- upoređenjem količine supstance koja je izlučena putem bubrega i/ili metabolita kod tretiranih i referentnih grupa;
- određivanjem površine ispod krive koncentracija u plazmi/vrijeme između supstance i/ili metabolita i poreĐenju sa podacima dobijenim od referentne grupe.

1.6.3.2. Raspodjela

Postoje dva pristupa, od kojih se jedan ili oba koriste za analizu oblika raspodjele:

- korisni kvalitativni podaci dobijaju se korišćenjem autoradiografskih tehnika na cijelom tijelu; - kvantitativni podaci dobijaju se žrtvovanjem životinja u različito vrijeme nakon ekspozicije i određivanja koncentracije i količine ispitivane supstance i/ili metabolita u tkivima i organima.

1.6.3.3. Izlučivanje

Kod ispitivanja izlučivanja skupljaju se mokraća, stolica i izdahnuti vazduh, a u nekim slučajevima i žuč. Količinu ispitivane supstance i/ili metabolita u tim izlučevinama mjeriti više puta nakon izlaganja ili dok se oko 95% primjenjene doze ne izluči ili tokom sedam dana (ukoliko izlučivanje 95% doze traje duže).

U posebnim slučajevima uzeti u obzir izlučivanje ispitivane supstance u mlijeku eksperimentalnih životinja koje doje.

1.6.3.4. Metabolizam Pogodnim tehnikama analiziraju se biološki uzorci da bi se utvrdio stepen i tip metabolizma. Ukoliko je potrebno dati odgovore na pitanja koja su proizašla iz prethodnih toksikoloških studija, razjasniti strukturu metabolita i predložiti odgovarajuće metaboličke puteve. Obaviti in vitro ispitivanje kako bi se dobili podaci o metaboličkim putevima.

Dodatni podaci o odnosu metabolizma i toksičnosti se dobijaju biohemijskim studijama, kao što je određivanje efekata na sisteme enzima koji učestvuju u metabolizmu, smanjenje endogenih neproteinskih sulfidrilnih jedinjenja i vezivanje supstance za mahromolekule.

2. Podaci

Podaci se navode tabelarno, u skladu sa tipom izvedene studije, a gdje je potrebno, daje se i grafička prezentacija. Za svaku eksperimentalnu grupu navodi se srednja vrijednost i statističke varijacije mjerenja u odnosu na vrijeme, doziranje, tkiva i organe, kada odgovara. Odrediti stepen apsorpcije i količinu i brzine izlučivanja odgovarajućim metodama. Kada se obavljaju ispitivanja metabolizma, navodi se struktura utvrĐenih metabolita i mogući metabolički put. **3. Izvještaj**

3.1. Izvještaj o ispitivanju

U skladu sa tipom izvedenog ispitivanja, Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:
- vrsti, soju, izvoru, uslovima sredine, ishrani;
- karakterizaciji obilježenih materijala, ako su upotrijebljeni;
- nivoima doza i intervalima davanja;
- putu primjene i, ako je korišćen, o vehikulumu;
- toksičnim i drugim uočenim efektima;
- metodi određivanja ispitivane supstance i/ili metabolita u biološkim uzorcima, uključujući izdahnuti vazduh;
- tabele mjerenja po polu, dozi, režimu, vremenu, tkivima i organima;
- prikaz stepena apsorpcije i izlučivanja tokom vremena;
- metodi za karakterizaciju i identifikaciju metabolita u biološkim uzorcima;
- metodi bioloških mjerenja u vezi sa metabolizmom;
- predloženim putevima metabolizma;
- obrazloženju rezultata; - tumačenju rezultata.

3.2. Procjena i tumačenje rezultata

Procjena i tumačenje rezultata je data uOpšti uvod.

B.37. ODLOŽENA NEUROTOKSIČNOST ORGANOFOSFORNIH SUPSTANCI NAKON AKUTNOG IZLAGANJA

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

U procjeni i evaluaciji toksičnih efekata supstanci uzeti u obzir potencijal posebnih grupa supstanci da uzrokuju specifične vrste neurotoksičnosti koje nisu otkrivene u drugim studijama toksičnosti. Uočeno je da određene organofosforne supstance uzrokuju odloženu neurotoksičnost i treba ih smatrati kandidatima za ocjenjivanje.

Za identifikaciju supstanci koje uzrokuju odloženu polineuropatiju primjenjuju se in vitro skrining testovi. Negativni rezultati in vitro studija ne daju dokaze da ispitivana supstanca nije neurotoksična.

1.2. Definicije

Organofosforne supstance uključuju nejonizovane organofosforne estre, tioestere ili anhidride organofosforne, organofosforaste ili organofosfamidne kiseline ili slične tiofosfornoj, tiofosforastoj ili tiofosfamidnoj kiselini ili druge supstance koje uzrokuju odloženu neurotoksičnost koja se ponekad javlja kod ovih grupa supstanci.

Odložena neurotoksičnost je sindrom koji se povezuje sa produženim odloženim nastepenem ataksije, distalne aksonopatije u kičmenoj moždini i perifernim živcima i inhibicijom i starenjem ciljne esteraze neuropatije (u daljem tekstu: NTE) u nervnom tkivu.

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance se ispituju sa pozitivnom kontrolnom grupom kao sredstvo koje pokazuje da se pod laboratorijaskim uslovima odgovor ispitivanih životinjskih vrsta nije značajno promijenio.

Primjer široko korišćene neurotoksične supstance je tri-o-tolil fosfat (CAS 78-30-8, EINECS 201103-5, CAS nomenklatura: tris (2-metilfenil)estar fosforne kiseline, takođe poznat kao tris-okrezilfosfat.

1.4. Princip metode

Ispitivana supstanca primjenjuje se oralno u jednoj dozi domaćim kokoškama koje su zaštićene od akutnih holinergičkih efekata, kada odgovara. Životinje se posmatraju 21 dan kako bi se uočile abnormalnosti u ponašanju, ataksija i paraliza. Na kokoškama nasumično izabranim iz svake grupe izvode se biohemijska mjerenja, posebno NTE, obično 24 i 48 sata nakon doziranja. Dvadeset i jedan dan nakon izlaganja preostale kokoške se žrtvuju i izvode se histopatološki pregled odabranih nervnih tkiva.

1.5. Opis metode

1.5.1. Pripreme

Zdrave mlade kokoške bez virusnih bolesti koje interferiraju, koje ne primaju lijekove i bez abnormalnosti slučajnim izborom uvrstiti u tretirane i kontrolne grupe i aklimatizovati na laboratorijaske uslove najmanje pet dana pre početka studije.

Koriste se kavezi ili zatvoreni prostori koji su dovoljno veliki za slobodno kretanje i lako posmatranje hoda.

Doziranje ispitivane supstance obično je oralnim putem prisilnim hranjenjem, gel kapsulama ili sličnom metodom. Tečnosti se daju nerazblažene ili rastvorene u odgovarajućem vehikulumu kao što je kukuruzno ulje. Čvrste supstance rastvoriti, jer velike doze čvrstih supstanci u gel

kapsulama ne apsorbuju efikasno. Za vehikulume različite od vode poznate su toksične karakteristike, a ukoliko nisu poznate, iste odrediti prije ispitivanja.

1.5.2. Uslovi ispitivanja

1.5.2.1. Eksperimentalne životinje

Potrebna je mlada odrasla domaća kokoška (Gallus gallus domestícus), stara 8 do 12 mjeseci. Koriste se vrste i sojeve standardne veličine. Kokoške se gaje u uslovima koji im omogućavaju slobodno kretanje.

1.5.2.2. Broj i pol

Pored tretirane grupe koristiti kontrolnu grupu vehikuluma i grupu pozitivne kontrole. Sa kontrolnom grupom vehikuluma postupati isto kao i sa tretiranom grupom, osim što se izostavlja primjena ispitivane supstance.

Koristiti dovoljan broj kokoški u svakoj grupi kako bi se omogućilo žrtvovanje najmanje šest ptica za biohemijska određivanja (po tri u svakoj od dvije vrijemenske tačke) i da šest ptica preživi 21dnevni period praćenja nakon tretmana za patologiju.

Grupa pozitivne kontrole se vodi istovremeno ili to je nedavna kontrolna grupa iz ranije studije. Ona sadrži najmanje šest kokoški tretiranih s poznatim neurotoksikantom sa odloženim dejstvom: tri kokoši za biohemiju i tri za patologiju. Preporučljivo je periodično ažuriranje podataka iz ranije studije. Nove podatke pozitivne kontrole razviti kad laboratorijaa koja izvodi ispitivanje promjeni neki osnovni element (npr. soj, hrana, uslovi smještaja).

1.5.2.3. Dozni nivoi

Obavlja se preliminarna studija uz korišćenje odgovarajućeg broja kokoški i grupa doznih nivoa kako bi se utvrdio nivo koji će se koristiti u glavnoj studiji. Određena smrtnost je neophodna u ovoj preliminarnoj studiji kako bi se definisala adekvatna doza za glavnu studiju. Koristiti atropin ili drugi zaštitni agens koji se ne utiče na odložene neurotoksične efekte da bi se spriječila smrt zbog akutnih holinergičkih efekata. Koristiti različite eksperimentalne metode kako bi se procjenila maksimalna doza ispitivanih supstanci koja ne izaziva smrt (metoda V.1bis koja je data u ovom prilogu). Raniji podaci o kokoški ili drugi toksikološki podaci takođe su korisni u izboru doze.

Dozni nivo ispitivane supstance u glavnoj studiji je najveći mogući uzimajući u obzir rezultate studije preliminarnog izbora doze i gornju granicu doze od 2.000 mg/kg TM. Bilo koja smrtnost do koje može doći ne ometa preživljavanje dovoljnog broja životinja za biohemijska (šest) i histološka (šest) ispitivanja nakon 21 dana. Koriste se atropin ili drugi zaštitni agens za koji se zna da ne utiče na odložene neurotoksične efekte kako bi se spriječila smrt usled akutnih holinergičkih efekata.

1.5.2.4. Ispitivanje granične doze

Ukoliko ispitivanje pri doznom nivou od najmanje 2.000 mg/kg TM/dan, korišćenjem postupaka opisanih u ovoj studiji, ne pokaže nikakve toksične efekte i ukoliko se toksičnost ne očekuje na osnovu podataka o strukturno sličnim supstancama, nije neophodna studija koja koristi veće doze. Ispitivanje granične doze se ne primjenjuje kada ljudsko izlaganje ukazuje na potrebu za korišćenjem višeg nivoa doze.

1.5.2.5. Period posmatranja

Period posmatranja traje 21 dan.

1.5.3. Postupak

Nakon primjene zaštitnog agensa kako bi se spriječila smrt zbog akutnih holinergičkih efekata, ispitivana supstanca daje se u jednoj dozi.

1.5.3.1. Opšta posmatranja

Posmatranja se započinju odmah po izlaganju. Sve kokoške pažljivo pregledati nekoliko puta tokom prva dva dana, a nakon toga najmanje jednom dnevno u periodu od 21 dan ili do predviđenog žrtvovanja. Bilježe se sve znaci toksičnosti, uključujući vrijeme nastanka, vrstu, ozbiljnost i trajanje abnormalnosti ponašanja. Ataksija se mjeri ordinalnom skalom za ocjenjivanje koja se sastoji od najmanje četiri nivoa, a paralizu registrovati. Najmanje dva puta nedeljno kokoške odabrane za patološka ispitivanja izvaditi iz kaveza i izložiti prisilnoj motoričkoj aktivnosti određeni period, kao što je penjanje po merdevinama, kako bi se zapazili minimalni toksični efekti. Životinje na samrti i životinje koje trpe ozbiljan stres ili bol ukloniti kada se ove pojave primjete, humano ih žrtvovati i postmortalno pregledati.

1.5.3.2. Tjelesna masa

Prije primjene ispitivane supstance mjeri se tjelesna masa svim kokoškama, a nakon toga najmanje jednom nedeljno.

1.5.3.3. Biohemijska ispitivanja

Šest slučajno izabranih kokoški iz svake tretirane i kontrolne grupe vehikuluma i tri kokoške iz grupe pozitivne kontrole (kad se takva grupa istovrijemeno vodi) su žrtvovane u nekoliko dana nakon doziranja. Osim toga, pripremiti i ispitati mozak i lumbalnu kičmenu moždinu na inhibiciju aktivnosti ciljne esteraze neuropatije. Može da bude korisno da se pripremi i ispita tkivo išijadičnog nerva na inhibiciju aktivnosti ciljne esteraze neuropatije. Obično, tri ptice iz kontrolne i svake tretirane grupe žrtvuju se nakon 24 sata i tri ptice nakon 48 sati, pri čemu tri kokoške iz grupe pozitivne kontrole usmrtiti nakon 24 sata. Ukoliko opažanje kliničkih znakova intoksikacije (ovo se procjenjuje posmatranjem trenutka nastupa holinergičkih znakova) pokazuje da se toksični agens distribuira vrlo polako, poželjno uzorkovati tkivo iz tri ptice u oba navrata između 24 sata i 72 sata nakon doziranja.

Analiza acetilholinesteraze (u daljem tekstu: AChE) se obavlja na tim uzorcima, ako se to smatra odgovarajućim. Može da se dogodi in vivo spontana reaktivacija AChE i da dovede do podcjenjivanja potentnosti supstance kao AChE inhibitora.

1.5.3.4. Postmortalni pregled

Postmortalni pregled svih životinja (planirano žrtvovanih ili žrtvovanih na samrti) uključuje posmatranje izgleda mozga i kičmene moždine.

1.5.3.5. Histopatološka ispitivanja

Nervno tkivo životinja koje prežive period posmatranja i koje se ne koristi za biohemijske studije podvrgnuti mikroskopskom pregledu. Tkiva fiksirati in situ, korišćenjem tehnika perfuzije. Presjeci uključuju mali mozak (srednji longitudinalni nivo), produženu moždinu, kičmenu moždinu i periferne živce. Presjeke kičmene moždine uzeti iz gornjeg cervikalnog segmenta, srednje torakalone i lumbo-sakralne regije. Uzeti presjeke distalne regije tibijalnog živca i njegovih grana do gastroknemijusnog mišića i skijatičnog živca. Presjeke obojiti odgovarajućim mijelin i akson-specifičnim bojama.

2. Podaci

Negativni rezultati efekata izabranih za posmatranje u ovoj metodi (biohemijska, histopatološka ispitivanja i posmatranje ponašanja) ne zahtijevaju dalje ispitivanje odložene neurotoksičnosti. Dvosmisleni ili neuverljivi rezultati za ove efekte zahtijevanju dalje ocjenjivanje.

Navode se pojedinačni podaci. Svi podaci navode se tabelarno. Za svaku eksperimentalnu grupu navodi se: broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje pokazuju oštećenja, bihevioralne ili biohemijske efekte, tipovi i ozbiljnost tih oštećenja ili efekata i procenat životinja koje pokazuju svaki tip i ozbiljnost oštećenja ili efekta.

Nalaze ove studije ocjeniti u smislu incidence, ozbiljnosti i korelacije bihevioralnih, biohemijskih i histopatoloških efekata i drugih opaženih efekata u tretiranim i kontrolnim grupama.

Numeričke rezultate ocjeniti odgovarajućim i prihvaćenim statističkim metodama. Statističke metode odabrati prilikom osmišljavanja studije.

3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o: 1) Eksperimentalnim životinjama: - korišćeni soj;

- broj i starost životinja;
- izvor, uslovi smještaja, itd.;
- individualne tjelesne mase životinja na početku ispitivanja.

2) Uslovima ispitivanja:

- detalji o preparatu ispitivane supstance, stabilnost i homogenost, kad odgovara;
- opravdanje izbora vehikuluma;
- detalji o primjeni ispitivane supstance;
- detalji o kvalitetu hrane i vode;

- obrazloženje izbora doze;
- specifikacija primjenjenih doza uključujući detalje o vehikulumu, zapremini i fizičkom obliku primjenjenog materijala;
- identitet i detalji o primjeni svakog zaštitnog agensa.

3) Rezultatima:
- podaci o tjelesnoj masi;
- podaci o toksičnom odgovoru po grupi, uključujući mortalitet;
- priroda, ozbiljnost i trajanje kliničkih zapažanja (bilo da su reverzibilni ili ne);
- detaljan opis biohemijskih metoda i nalaza;
- nalazi obdukcije;
- detaljan opis svih histopatoloških nalaza;
- statistička obrada rezultata, kada odgovara.

4) Obrazloženju rezultata.

5) Zaključcima.

B.38. ISPITIVANJE ODLOŽENE NEUROTOKSIČNOSTI ORGANOFOSFORNIH SUPSTANCI - PONOVLJENE DOZE, 28 DANA

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

U procjeni i evaluaciji toksičnih efekata supstanci uzeti u obzir potencijal posebnih grupa supstanci da uzrokuju specifične vrste neurotoksičnosti koje nisu otkrivene u drugim studijama toksičnosti. Uočeno je da određene organofosforne supstance uzrokuju odloženu neurotoksičnost i smatraju se kandidatima za ocjenjivanje.

Za identifikaciju supstanci koje uzrokuju odloženu polineuropatiju primjenjuju se in vitro skrining testovi. Negativni rezultati in vitro studija ne daju dokaze da ispitivana supstanca nije neurotoksična.

Ovo 28-dnevno ispitivanje odložene neurotoksičnosti daje podatke o mogućim rizicima po zdravlje koji mogu proizaći iz ponovljenog izlaganja tokom ograničenog vremenskog perioda. Ispitivanje obezbjeđuje podatke o dozi-efektu i daje procjenu doze bez efekta koja je korisna pri utvrĐivanju kriterijuma bezbijednosti za ekspoziciju.

1.2. Definicije

Organofosforne supstance uključuju nejonizovane organofosforne estre, tioestere ili anhidride organofosforne, organofosforaste ili organofosfamidne kiseline ili slične tiofosfornoj, tiofosforastoj ili tiofosfamidnoj kiselini ili druge supstance koje uzrokuju odloženu neurotoksičnost koja se ponekad javlja kod ovih grupa supstanci.

Odložena neurotoksičnost je sindrom koji se povezuje sa produženim odloženim nastepenem ataksije, distalne aksonopatije u kičmenoj moždini i perifernim živcima i inhibicijom i starenjem ciljne esteraze neuropatije (u daljem tekstu: NTE) u nervnom tkivu.

1.3. Princip metode

Dnevne doze ispitivane supstance primjenjuju se oralno domaćim kokoškama tokom 28 dana. Životinje se najmanje jednom dnevno posmatraju zbog abnormalnosti u ponašanju, ataksije i paralize i to do 14 dana nakon zadnje doze. Obavljaju se biohemijska mjerenja, posebno NTE na slučajno odabranim kokoškama iz svake grupe, obično 24 i 48 sata nakon posljednje doze. Dvije nedelje nakon zadnje doze preostale kokoške se žrtvuju i obnavlja se histopatološki pregled odabranih nervnih tkiva.

1.4. Opis metode

1.4.1. Pripreme

Najmanje pet dana prije početka studije zdrave mlade kokoške bez virusnih bolesti koje interferiraju, koje ne primaju lijekove i bez abnormalnosti slučajnim izborom su uvrštene u tretirane i kontrolne grupe i da se aklimatizuju na laboratorijaske uslove.

Koriste se kavezi ili zatvoreni prostori koji su dovoljno veliki za slobodno kretanje i lako posmatranje hoda.

Doziranje ispitivane supstance je oralnim putem sedam dana u nedelji prisilnim hranjenjem, gel kapsulama ili sličnom metodom. Tečnosti se daju nerazblažene ili rastvorene u odgovarajućem vehikulumu kao što je kukuruzno ulje. Čvrste supstance rastvoriti, jer velike doze čvrstih supstanci u gel kapsulama se ne apsorbuju efikasno. Za vehikulume različite od vode su poznate toksične karakteristike, a ukoliko nisu poznate, iste odrediti prije ispitivanja.

1.4.2. Uslovi ispitivanja

1.4.2.1. Eksperimentalne životinje

Preporučuje se mlada odrasla domaća kokoška (Gallus gallus domestícus), stara 8 do 12 mjeseci. Koriste se vrste i sojevi standardne veličine. Kokoške se gaje u uslovima koji im omogućavaju slobodno kretanje.

1.4.2.2. Broj i pol

Koriste se najmanje tri tretirane grupe i kontrolna grupa u vehikuluma. Sa kontrolnom grupom vehikuluma postupa se isto kao i sa tretiranom grupom, osim što se izostavlja primjena ispitivane supstance.

Koristi se dovoljan broj kokoški u svakoj grupi kako bi se omogućilo žrtvovanje najmanje šest ptica za biohemijska određivanja (po tri u svakoj od dve vrijemenske tačke) i da šest ptica preživi 14-dnevni period praćenja nakon tretmana za patološka ispitivanja.

1.4.2.3. Dozni nivoi

Dozne nivoe odabrati uzimajući u obzir rezultate akutnog ispitivanja odložene neurotoksičnosti i postojeće podatke o toksičnosti ili kinetici koji su dostupni za ispitivanu supstancu. Najviši dozni nivo određuje se sa ciljem izazivanja toksičnih efekata, najbolje odložene neurotoksičnosti, ali

ne smrti niti očigledne patnje. Zatim se bira opadajući niz nivoa doza kako bi se pokazao bilo koji odgovor povezan sa doziranjem i nepostojanje štetnih efekata pri najnižem doznom nivou.

1.4.2.4. Ispitivanje granične doze

Ukoliko ispitivanje pri doznom nivou od najmanje 1.000 mg/kg TM/dan, korišćenjem postupaka opisanih u ovoj studiji, ne pokaže nikakve toksične efekte i ukoliko se toksičnost ne očekuje na osnovu podataka o strukturno sličnim supstancama, nije neophodna studija koja koristi veće doze. Ispitivanje granične doze se ne primjenjuje kada izlaganje ljudi ukazuje na potrebu za korišćenjem višeg nivoa doze.

1.4.2.5. Period posmatranja

Sve životinje posmatrati najmanje jednom dnevno tokom perioda izlaganja i 14 dana nakon toga, sve do planiranog žrtvovanja.

1.4.3. Postupak

Životinje se doziraju ispitivanom supstancom sedam dana u nedelji kroz period od 28 dana.

1.4.3.1. Opšta posmatranja

Posmatranja započeti odmah po izlaganju. Sve kokoške se pažljivo pregledaju najmanje jednom dnevno u periodu od 28 dana tretmana i 14 dana nakon doziranja ili do planiranog žrtvovanja. Bilježe se svi znaci toksičnosti, uključujući vrijeme nastanka, vrstu, ozbiljnost i trajanje. Posmatranja uključuju, ali ne i da budu ograničena na, abnormalnosti u ponašanju. Ataksija se mjeri ordinalnom skalom za ocjenjivanje koja se sastoji od najmanje četiri nivoa. Registrovati paralizu. Najmanje dva puta nedeljno kokoške odabrane za patološka ispitivanja izvaditi iz kaveza i izložiti prisilnoj motoričkoj aktivnosti određeni period, kao što je penjanje po merdevinama, kako bi se zapazili minimalni toksični efekti. Životinje na samrti i životinje koje trpe ozbiljan stres ili bol ukloniti kada se primete ove pojave, humano ih žrtvovati i postmortalno pregledati.

1.4.3.2. Tjelesna masa

Svim kokoškama se mjeri tjelesna masa prije primjene ispitivane supstance i najmanje jednom nedeljno nakon toga.

1.4.3.3. Biohemijska ispitivanja

Šest slučajno odabranih kokošaka iz svake tretirane i kontrolne grupe vehikuluma žrtvovati nekoliko dana nakon posljednje doze. Pripremiti i ispitati mozak i lumbalnu kičmenu moždinu na inhibiciju aktivnosti ciljne esteraze neuropatije. Pripremiti i ispitati tkivo išijadičnog nerva na inhibiciju aktivnosti ciljne esteraze neuropatije. Tri ptice iz kontrolne i svake tretirane grupe žrtvuju se nakon 24 sata i tri ptice 48 sati nakon zadnjeg doziranja. Ukoliko podaci iz akutne studije ili drugih studija (npr. toksikokinetike) ukazuju da su druge vremenske tačke nakon zadnjeg doziranja pogodnije, primjeniti te tačke, a obrazloženje dokumentovati.

Analiza acetilholinesteraze (u daljem tekstu: AChE) se obavlja na tim uzorcima, ako se to smatra odgovarajućim. DogaĐa se in vivo spontana reaktivacija AChE i dovodi do podcjenjivanja potentnosti supstance kao AChE inhibitora.

1.4.3.4. Postmortalni pregled

Postmortalni pregled svih životinja (planirano žrtvovanih ili žrtvovanih na samrti) uključuje posmatranje izgleda mozga i kičmene moždine.

1.4.3.5. Histopatološka ispitivanja

Nervno tkivo životinja koje prežive period posmatranja i koje se ne koristi za biohemijska ispitivanja podvrgnuti mikroskopskom pregledu. Tkiva fiksirati in situ, korišćenjem tehnika perfuzije. Presjeci uključuju mali mozak (srednji longitudinalni nivo), produženu moždinu, kičmenu moždinu i periferne živce. Presjeke kičmene moždine uzeti iz gornjeg cervikalnog segmenta, srednje torakalone i lumbo-sakralne regije. Uzeti prejseke distalne regije tibijalnog živca i njegovih grana do gastroknemijusnog mišića i skijatičnog živca. Presjeke obojiti odgovarajućim mijelin i akson-specifičnim bojama. Izvesti mikroskopski pregled na očuvanim tkivima svih životinja u kontrolnoj i tretiranoj grupi kojoj je davana visoka doza. Kada postoje dokazi za efekte kod grupe visoke doze, obaviti mikroskopski pregled kod kokoški iz grupa srednje i niže doze.

2. Podaci

Negativni rezultati efekata izabranih za posmatranje u ovoj metodi (biohemijska, histopatološka ispitivanja i posmatranje ponašanja) obično ne zahtijevaju dalje ispitivanje odložene neurotoksičnosti. Dvosmisleni ili neuverljivi rezultati za ove efekte zahtijevaju dalje ocjenjivanje.

Podaci se navode pojedinačno i to tabelarno. Za svaku eksperimentalnu grupu navodi se: broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje pokazuju oštećenja, bihevioralne ili biohemijske efekte, tipovi i ozbiljnost tih oštećenja ili efekata i procenat životinja koje pokazuju svaki tip i ozbiljnost oštećenja ili efekta.

Nalazi ove studije ocjenjuju se u smislu incidence, ozbiljnosti i korelacije bihevioralnih, biohemijskih i histopatoloških efekata i drugih opaženih efekata u tretiranim i kontrolnim grupama.

Numerički rezultati ocjenjuju se odgovarajućim i prihvaćenim statističkim metodama. Statističke metode se biraju prilikom osmišljavanja studije.

3.Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o: 1) Eksperimentalnim životinjama: - korišćeni soj;
- broj i starost životinja;
- izvor, uslovi smještaja, itd.;
- individualne tjelesne mase životinja na početku ispitivanja. 2) Uslovima ispitivanja:
- detalji o preparatu ispitivane supstance, stabilnost i homogenost, kad odgovara;
- opravdanje izbora vehikuluma;

- detalji o primjeni ispitivane supstance;
- detalji o kvalitetu hrane i vode;
- obrazloženje izbora doze;
- specifikacija primjenjenih doza uključujući detalje o vehikulumu, zapremini i fizičkom obliku primjenjenog materijala;
- opravdanje izbora drugih vremenskih tačaka za biohemijska određivanja, ukoliko vrijeme nije 24 sata i 48 sati.

3) Rezultatima:
- podaci o tjelesnoj masi;
- podaci o toksičnom odgovoru po grupi, uključujući mortalitet;
- doza bez štetnog dejstva;
- priroda, ozbiljnost i trajanje kliničkih zapažanja (bilo da su reverzibilni ili ne);
- detaljan opis biohemijskih metoda i nalaza;
- nalazi obdukcije;
- detaljan opis svih histopatoloških nalaza;
- statistička obrada rezultata, kad odgovara.

4) Obrazloženju rezultata.

5) Zaključcima.

B.39. ISPITIVANJE VANREDNE SINTEZE DNK (UDS) NA ĆELIJAMA JETRE SISARA IN VIVO

1. Metode ispitivanja

Metoda ispitivanja vanredne sinteze DNK na ćelijama jetre sisara in vivo zasniva se na metodi OECD: TG 486, Unscheduled DNK Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells In vivo (1997).

1.1. Uvod

Svrha ispitivanja vanredne sinteze DNK (u daljem tekstu: UDS) na ćelijama jetre sisara in vivo je identifikacija ispitivanih supstanci koje uzrokuju popravku DNK u ćelijama jetre tretiranih životinja. [4]

Ovo in vivo ispitivanje daje metodu za istraživanje genotoksičnih efekata hemikalija u jetri. Krajnji efekat koji se mjeri je indikativan za oštećenje DNK i kasniju popravku u ćelijama jetre. Jetra je obično glavno mjesto metabolizma apsorbovanih supstanci, pa je to odgovarajuće mjesto za mjerenje oštećenja DNK in vivo.

Ne koristi se ovo ispitivanje ukoliko postoje dokazi da ispitivana supstanca neće dospijeti u ciljno tkivo.

Krajnji efekat UDS mjeri se određivanjem preuzimanja označenih nukleozida u ćelije koje ne prolaze kroz redovnu (u s-fazi) DNK sintezu. Tehnika koja se najviše koristi je određivanje preuzimanja timidina označenog tricijumom (u daljem tekstu: ^{3}H-TdR) autoradiografijom. Jetre

pacova se najviše koriste za in vivo UDS ispitivanja. Koriste se i druga tkiva osim jetre, ali nisu predmet ove metode.

Detekcija UDS efekta zavisi od broja DNK baza koje su uklonjene i zamjenjene na mjestu oštećenja. UDS ispitivanje je posebno koristan za detektovanje "dugačke popravke" (20 do 30 baza) izazvanog supstancom. Obrnuto "kratka popravka" (1 do 3 baze) detektuje se s mnogo manjom osjetljivošću. Mutageni događaji nastaju zbog nepopravljenih, pogrešno popravljenih ili pogrešno replikovanih oštećenja DNK. Obim UDS reakcije ne daje indikacije pouzdanosti procesa oporavka. Mutagen reaguje sa DNK, ali se oštećenje DNK ne popravlja kroz proces popravke izrezivanjem. Nedostatak specifičnih podataka o mutagenoj aktivnosti koje daje UDS ispitivanje kompenzuje se potencijalnom osjetljivošću ovog krajnjeg efekta od interesa, budući da se prati celokupni genom.

1.2. Definicije

Ćelije u popravci su viša neto nuklearna zrnca od podešene vrijednosti koja se opravdava u laboratorijai koja vrši ispitivanje.

Neto nuklearna zrnca (net nuclear grains, u daljem tekstu: NNG) je kvantitativna mjera za UDS aktivnost ćelija u autoradiografskim UDS ispitivanjima, obračunata oduzimanjem prosječnog

[4] Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. and Penman, M.G. (1985). An Assessment of the In vivo Rat Hepatocyte DNK Repair Assay.
Mutation Res., 156, 1-18.
Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987). A Protocol and Guide for the In vivo Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay. Mutation Res. 189, 123-133.
Kennelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell, I. de G. (1993). In vivo Rat Liver UDS Assay. In: Kirkland D.J. and Fox M., (Eds) Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.
Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C.A. and Mori, H. (1993). Recommendations for the Performance of UDS Tests In vitro and In vivo. Mutation Res., 312, 263-285.

broja citoplazmatskih zrnaca u delovima citoplazme ekvivalentnim nukleusu (u daljem tekstu: CG) od broja nuklearnih zrnaca (u daljem tekstu: NG), odnosno: NNG = NG - CG. NNG broj se dobija za pojedinačne ćelije, a zatim se zbraja za ćelije u kulturi, u paralelnim kulturama, itd.

Vanredna sinteza DNK (u daljem tekstu: UDS) je sinteza radi popravke DNK nakon uklanjanja i odstranjivanja niza DNK koji sadrži područje oštećenja koje je uzrokovano hemijskom supstancom ili fizičkim agensom.

1.3. Princip metode

UDS ispitivanje na ćelijama jetre sisara in vivo ukazuje na sintezu radi popravke DNK nakon uklanjanja i odstranjivanja niza DNK koji sadrži područje oštećenja koje je uzrokovano hemijskom supstancom ili fizičkim agensom. Ispitivanje se zasniva na ugrađivanju ^{3}H-TdR u

DNK ćelija jetre koje imaju nisku frekvenciju ćelija u S-fazi ćelijskog ciklusa. Preuzimanje ^{3}H-TdR određuje se autoradioografijom, budući da ova tehnika nije osjetljiva na interferencije iz ćelija u S-fazi kao što je to npr. upotreba tečnog scintilacijskog brojanja.

1.4. Opis metode

1.4.1. Pripreme

1.4.1.1. Izbor životinjske vrste

Obično se koriste pacovi, mada se koristi bilo koja vrsta sisara. Uobičajeno se koriste sojevi mladih zdravih odraslih životinja. Na početku studije varijacija u tjelesnoj masi životinja je minimalna i ne prelazi ±20% srednje tjelesne mase za svaki pol.

1.4.1.2. Uslovi smještaja i ishrane

Primjenjuju se opšti uslovi navedeni u Opštem uvodu, mada je vlažnost vazduha između 50% i 60%.

1.4.1.3. Priprema životinja Zdrave mlade odrasle životinje raspoređuju se slučajnim izborom u kontrolnu i tretirane grupe. Kaveze rasporediti tako da se minimalizuju mogući efekti položaja kaveza. Životinje se identifikuju pojedinačno i drže u kavezima najmanje pet dana prije početka studije kako bi se omogućila aklimatizacija na laboratorijaske uslove.

1.4.1.4. Ispitivana supstanca/Preparat

Prije doziranja životinja čvrste ispitivane supstance se rastvaraju ili suspenduju u odgovarajućim rastvaračima ili vehikulumima i, ukoliko je potrebno, razblažuju. Tečne ispitivane supstance se doziraju direktno ili razblažene prije doziranja. Primjenjuju se svježi preparati ispitivane supstance osim ukoliko podaci o stabilnosti ne ukazuju na prihvatljivost čuvanja.

1.4.2. Uslovi ispitivanja

1.4.2.1. Rastvarač/vehikulum

Rastvarač/vehikulum ne uzrokuje toksične efekte pri korišćenim doznim nivoima i ne sumnja se na hemijske reakcije sa ispitivanom supstancom. Ukoliko se koriste rastvarači/vehikulumi koji nisu dobro poznati, njihovo uključivanje podupreti podacima o njihovoj kompatibilnosti. Prvo razmotri primjenu vodenog rastvarača/vehikuluma.

1.4.2.2. Kontrole

Istovremene pozitivne i negativne kontrole (rastvarač/vehikulum) uključiti u svaki dio eksperimenta koji se nezavisno izvodi. Osim tretmana ispitivanom supstancom, sa životinjama u kontrolnoj grupi postupati isto kao i sa životinjama u tretiranim grupama.

Pozitivne kontrole su supstance za koje je poznato da proizvode UDS kada se primjene pri nivoima izloženosti za koje se očekuje da daju uočljivo povećanje u odnosu na pozadinu. Pozitivne kontrole koje zahtijevaju metaboličku aktivaciju koristiti u dozama koje izazivaju umjereni efekat[4]. Doze se biraju tako da su efekti jasni ali ne otkrivaju trenutno identitet kodiranih slajdova onome koji čita.

Tabela 1. Primjeri supstanci koje se koriste kao pozitivne kontrole:

Vrijeme uzorkovanja	Supstanca	CAS br.	EINECS br
Rano uzorkovanje (2 do 4 sata)	N-nitrozodimetilamin	62-75-9	200-249-8
Kasno uzorkovanja (12 do 16 sati)	N-2-fluorenilacetamid (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Koriste se i druge odgovarajuće supstance kao pozitivne kontrolne. Pozitivna kontrola se primjenjuje drugačijim putem od ispitivane supstance.

1.5. Postupak

1.5.1. Broj i pol životinja

Koristi se odgovarajući broj životinja kako bi se uzele u obzir prirodne biološke varijacije u efektu ispitivanja. Broj životinja je najmanje tri životinje po grupi koje se analiziraju. Tamo gde je akumulirana značajna istorijska baza podataka koriste se samo jedna ili dvije životinje za istovremene negativne i pozitivne kontrolne grupe.

Ukoliko u vrijeme studije postoje rapoloživi podaci iz studija za iste vrste i korišćenje istog puta izlaganja koje pokazuju da ne postoje bitne razlike u toksičnosti među polovima, ispitivanje se vrši na samo jednom polu, prevashodno na mužjacima. Ako je ljudsko izlaganje hemikalijama specifično za pol, kao što je to npr. s nekim farmaceutskim agensima, ispitivanje obaviti na životinjama odgovarajućeg pola.

1.5.2. Raspored tretmana

Ispitivane supstance se primjenjuju kao jedan tretman.

1.5.3. Dozni nivoi

Koriste se najmanje dva dozna nivoa. Najviša doza se definiše kao doza koja uzrokuje znake toksičnosti koji su takvi da bi se za više nivoe doza, zasnovane na istom režimu doziranja, očekivalo da uzrokuju smrtnost. Niža doza je 50% do 25% više doze.

Supstance sa specifičnim biološkim aktivnostima pri niskim netoksičnim dozama (kao što su hormoni i mitogeni) su izuzeci od kriterijuma za određivanje doza i ocjenjuju se od slučaja do slučaja. Ukoliko se obavlja studija nalaženja raspona, jer nisu rapoloživi odgovarajući podaci, izvoditi u istoj laboratorijai uz korišćenje iste vrste, soja, pola i režima tretiranja kao i u glavnoj studiji.

Najviša doza se definiše i kao doza koja proizvodi određene indikacije toksičnosti u jetri (npr. piknotički nukleusi).

1.5.4. Ispitivanje granične doze

Ukoliko ispitivanje korišćenjem doze od najmanje 2.000 mg/kg TM primjenjene u jednom tretmanu ili u dva tretmana istog dana ne pokaže toksične efekte i ukoliko genotoksičnost nije očekivana na osnovu podataka iz strukturno sličnih supstanci, nije neophodna potpuna studija. Očekivano izlaganje ljudi ukazuje na potrebu za korišćenjem višeg nivoa doze u ispitivanju granične doze.

1.5.5. Primjena doza

Ispitivana supstanca se primjenjuje pomoću gastrične cijevi ili prikladnim instrumentom za intubaciju. Drugi putevi izlaganja su prihvatljivi ako se opravdaju. Ne koristi se intraperitonealni način, budući da se jetra izlažei ispitivanoj supstanci direktno, a ne preko cirkulacionog sistema. Maksimalna zapremina tečnosti koja se prisilno primjenjuje ili ubrizgava odjednom zavisi od veličine eksperimentalne životinje. Ova zapremina ne prelazi 2 ml/100g TM. Korišćenje većih zapremina se opravdava. Osim kod iritabilnih ili korozivnih supstanci koje uobičajeno pokazuju lošije efekte pri višim koncentracijama, varijabilnost u ispitivanoj zapremini je minimalizovana prilagoĐavanjem koncentracije kako bi se obezbijedila stalna zapremina pri svim nivoima doza.

1.5.6. Priprema ćelija jetre

Ćelije jetre pripremaju se od tretiranih životinja obično 12 do 16 sati nakon doziranja. Uglavnom je neophodno dodatno ranije vrijeme uzorkovanja (obično 2 do 4 sata nakon tretmana), osim ukoliko postoji jasan pozitivni efekat unutar 12 do 16 sati. Alternativno vrijeme uzorkovanja se koristi kad je to opravdano na osnovu toksikokinetičkih podataka.

Kratkotrajne kulture ćelija jetre sisara se dobijaju perfuzijom jetre in situ kolagenazom i omogućavanjem svježe odvojenim ćelijama jetre da se pričvrste na prikladnu podlogu. Ćelije jetre životinja negativne kontrole imaju vijabilitet [25]od najmanje 50%.

1.5.7. Određivanje UDS

Svježe izolovane ćelije jetre sisara inkubiraju se sa medijumumom koji sadrži ^{3}H-TdR tokom odgovarajućeg vremenskog perioda, npr. 3 do 8 sati. Na kraju perioda inkubacije medijumum se uklanja od ćelija koje se tada inkubiraju sa medijumumom koji sadrži višak neoznačenog timidina kako bi se izbjegla neugraĐena radioaktivnost ("hladna potraga"). Ćelije se zatim ispiraju, fiksiraju i suše. Hladna potraga nije neophodna za produžena vremena inkubacije. Slajdovi se prastvaraju u autoradiografsku emulziju, izlažu u mraku (npr. u frižideru 7 do 14 dana), razvijaju, boje i izložena srebrna zrnca se prebrojavaju. Od svake životinje priprema se dva do tri slajda.

1.5.8. Analiza

[25] Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993). Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the In vivo/In vitro DNK Repair Assay (UDS). Mutation Res., 291, 21-27

Preparati slajdova sadrže dovoljno ćelija normalne morfologije kako bi se omogućilo značajno ocjenjivanje UDS. Preparati se mikroskopski ispituju na znake očigledne citotoksičnosti (npr. piknoza, smanjen nivo radio označavanja).

Slajdovi se kodiraju prije prebrojavanja zrnaca. Dobije se 100 ćelija od svake životinje u najmanje dva slajda. Manje od 100 ćelija po životinji, se obrazlaže. Ne prebrojavaju za nukleusi S-faze, već se bilježi razmera S-faze.

Količina ugrađenih ^{3}H-TdR u jedru i citoplazmi morfološki normalnih ćelija, dokazana taloženjem(deposition) srebrnih zrnaca, utvrđuje se odgovarajućim metodama.

Broj zrnaca se određuje po jedru (nuklearna zrnca, u daljem tekstu: NG) i jedru-ekvivalentnim područjima po citoplazmi (citoplazmatska zrnca, u daljem tekstu: CG). Broj CG se mjeri uzimanjem najviše označenog područja citoplazme ili uzimanjem prosjeka dva ili tri broja citoplazmatskih zrnaca u poređenju sa jedrom. Druge metode prebrojavanja (npr. prebrojavanje cijelih ćelija) koristi se ako je to opravdano.

2. Podaci

2.1. Obrada rezultata

Navode se podaci o pojedinačnim slajdovima i životinjama. Svi podaci se navode tabelarno. Neto nuklearna zrnca (u daljem tekstu: NNG) se iizračunavaju za svaku ćeliju, za svaku životinju i svaku dozu i vrijeme, i to oduzimanjem broja CG od broja NG. Ukoliko se broje "ćelije u oporavku", kriterijumi za definisanje "ćelija u oporavku" obrazložiti i zasnivati ih na podacima negativne kontrole ranije ili konkurentne studije. Numerički rezultati se ocjenjuju statističkim metodama. Ukoliko se koriste statističke metode, biraju se i opravdavaju prije izvođenja studije.

2.2. Procjena i tumačenje rezultata

Kriterijumi za pozitivne odgovore uključuju:
a) NNG vrijednosti iznad prethodno zadatog praga, a što je opravdano na osnovu laboratorijaskih istorijskih podataka ili
b) NNG vrijednosti koje su značajno veće nego istovremena kontrola.

Kriterijumi za negativne odgovore uključuju:
a) NNG vrijednosti u okviru/ispod istorijskog praga kontrole ili
b) NNG vrijednosti koje nisu značajno veće od istovremene kontrole.

Razmotriti biološku relevantnost podataka, odnosno parametre kao što su međuživotinjska varijacija, odnos doza-odgovor, a uzeti u obzir i citotoksičnost. Pri ocjenjivanju rezultata ispitivanja koriste se statističke metode. Statistički značaj nije jedini određujući faktor za pozitivni odgovor.

Većina eksperimenata daje jasno pozitivne ili negativne rezultate, u rijetkim slučajevima podaci onemogućuju definitivnu ocjenu o aktivnosti ispitivane supstance. Rezultati ostaju dvosmisleni ili sumnjivi bez obzira na broj ponavljanja eksperimenta.

Pozitivni rezultat UDS ispitivanja na ćelijama jetre sisara in vivo ukazuje da ispitivana supstanca uzrokuje oštećenje DNK u ćelijama jetre sisara in vivo koje se popravlja vanrednom sintezom DNK in vitro. Negativni rezultat ukazuje da, pod uslovima ispitivanja, ispitivana supstanca ne uzrokuje oštećenja DNK koja su uočljiva ovim ispitivanjem.

Razmotriti vjerovatnoću da ispitivana supstanca dospije u sistemsku cirkulaciju ili specifično u ciljano tkivo (npr. sistemska toksičnost).

3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o: 1) Rastvaraču/vehikulumu:

- opravdanje za izbor vehikuluma;
- rastvorljivost i stabilnost ispitivane supstance u rastvaraču/vehikulumu, ukoliko je poznato.

2) Eksperimentalnim životinjama: - korišćena vrsta/soj;

- broj, starost i pol životinja;
- izvor, uslovi smještaja, ishrana, itd.;
- individualna tjelesna masa životinja na početku ispitivanja, uključujući raspon tjelesne mase, srednju vrijednost i standardnu devijaciju za svaku grupu. 3) Uslovima ispitivanja:
- pozitivne i negativne kontrole vehikuluma/rastvarača;
- podaci iz studije traženja raspona, ukoliko je obavljena;
- obrazloženje izbora nivoa doza;
- detalji o preparatu ispitivane supstance;
- detalji o primjeni ispitivane supstance;
- obrazloženje puta primjene;
- metode provere da je ispitivani agens dospijeo do sistemske cirkulacije ili ciljnog tkiva, ukoliko je primjenjivo;
- konverzija iz koncentracije ispitivane supstance u hrani/vodi za piće (ppm) do stvarne doze (mg/kg tjelesna masa/dan), ukoliko je primjenjivo;
- detalji o kvalitetu hrane i vode;
- detaljan opis tretmana i uzorkovanja;
- metode mjerenja toksičnosti;
- metode pripreme ćelija jetre i kultura;
- korišćena autoradiografska tehnika;
- broj pripremljenih slajdova i broj prebrojanih ćelija;
- kriterijumi ocjenjivanja;
- kriterijumi da je ispitivanje pozitivno, negativno ili dvosmisleno. 4) Rezultatima:
- individualni slajd, srednje vrijednosti po životinji i grupi za nuklearna zrnca, citoplazmatska zrnca, i neto nuklearna zrnca; - odnos doza-efekat, ukoliko je dostupan;
- statistička ocjena, ukoliko postoji;
- znaci toksičnosti;
- podaci o istovrijemenoj negativnoj (rastvarač/vehikulum) i pozitivnoj kontroli;
- istorijski podaci o negativnoj (rastvarač/vehikulum) i pozitivnoj kontroli s rasponom, srednjom vrijednošću i standardnim devijacijama;

- broj "ćelija u popravci" ako je utvrđen;
- broj ćelija S-faze ako je utvrđen;
- vijabilitet ćelija.

5) Obrazloženju rezultata. 6) Zaključcima.

B.40. IN VITRO ISPITIVANJE KOROZIVNOG OŠTEĆENJA KOŽE: ISPITIVANJE TRANSKUTANOG ELEKTRIČNOG OTPORA (TER)

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 430 (2015.). Korozivno oštećenje kože odnosi se na izazivanje ireverzibilnog oštećenja kože koje se manifestuje kao vidljiva nekroza koja kroz epidermu prodire u dermu nakon primjene ispitivane hemikalije [kako je utvrđeno Globalno usklađenim sistemom klasifikacije i označivanja hemikalija (GHS) UN i Uredbom (EZ) br. 1272/2008 o klasifikaciji, označavanju i pakovanja supstanci i smješa (CLP). Ova ažurirana ispitna metoda B.40. pruža in vitro postupak kojim se omogućava utvrđivanje nagrizajućih i nenagrizajućih supstanci i smješa u skladu s UN GHS-om i CLP-om.

2. Procjena korozivnog oštećenja kože obično je obuhvatala primjenu laboratorijskih životinja (ispitna metoda B.4., ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 404 koja je izvorno donesena 1981. i revidirana 1992., 2002. i 2015.). Uz sadašnju ispitnu metodu B.40., validirane su i donesene druge ispitne metode in vitro za ispitivanje potencijala hemikalija da uzrokuju korozivno oštećenje kože, kao što su ispitna metoda B.40.bis (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 431) i ispitna metoda B.65. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 435), kojima se mogu utvrditi i potkategorije korozivnih hemikalija ako je potrebno. Doneseno je nekoliko validovanih ispitnih metoda in vitro, kao što je ispitna metoda B.46. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 439, koje treba upotrebljavati za ispitivanje nadraženosti kože. U Smjernicama OECD-a o integrisanim pristupima ispitivanju i procjeni (IATA) za nagrizanje i korozivno oštećenje kože opisano je nekoliko modula u kojima se grupišu različiti izvori informacija i alati za analizu te se pružaju smjernice o i. načinu integrisanja i upotrebe postojećih podataka o ispitivanju i podataka koji se dobijaju bez ispitivanja za procjenu potencijala hemikalija da uzrokuju korozivno oštećenje i korozivno oštećenje kože te predlaganju pristupa kad je potrebno dalje ispitivanje.

3. Ova se ispitna metoda bavi konačnim efektom korozivnog oštećenja kože na zdravlje ljudi. Bazira se na ispitnoj metodi transkutanog električnog otpora (TER) na koži glodara kod koje se upotrebljavaju diskovi kože kako bi se identifikovale korozivno supstanci prema njihovoj sposobnosti da dovedu do gubitka integriteta i funkcije barijere normalnog stratum corneum. Odgovarajuća smjernica OECD-a za ispitivanje izvorno je donesena 2004. i ažurirana je 2015. kako bi se odnosila na smjernice o IATA-i.

4. Kako bi se u regulatorne svrhe ocijenilo in vitro ispitivanje korozivnog oštećenja kože sprovedene su predvalidacione studije nakon čega je slijedila službena validaciona studija ispitne metode TER-a na koži glodara za procjenu korozivnog oštećenja kože. Rezultati tih studija doveli su do preporuke da bi se ispitna metoda TER-a (imenovana validovanom referentnom metodom) mogla upotrebljavati u regulatorne svrhe za procjenu in vivo korozivnog oštećenja kože.

5. Prije nego što se predložena slična ili izmijenjena ispitna metoda TER-a in vitro za korozivno oštećenje kože, koja nije validirana referentna metoda, može upotrijebiti u regulatorne svrhe, trebalo bi utvrditi njenu pouzdanost, relevantnost (tačnost) i ograničenja za njenu predloženu upotrebu kako bi se obezbijedila njena sličnost s validovanom referentnom metodom, u skladu sa zahtjevima. OECD-ovo uzajamno prihvatanje podataka garantovaće će se samo nakon što se svaka predložena nova ili ažurirana ispitna metoda koja je u skladu sa zahtjevima izvođenja pregleda i uključi u odgovarajuću smjernicu OECD-a za ispitivanje.

POČETNA RAZMATRANJA

7. Validacionom studijom i drugim objavljenim studijama utvrđeno je da se ispitnom metodom TER-a na koži glodara mogu razlikovati poznate supstance s korozivnim djelovanjem na kožu od supstanci koje na kožu ne djeluju korozivno uz ukupnu osjetljivost od 94 % (51/54) i specifičnost od 71 % (48/68) za bazu podataka od 122 supstanci.

8. Ova se ispitna metoda bavi korozivnim oštećem kože in vitro. Omogućava identifikaciju ispitivanih hemikalija koje ne djeluju korozivno i onih koje djeluju korozivno u skladu s UN GHS-om ili CLP-om. Ograničenje ove ispitne metode, kako je pokazano validacionim studijama, jest to što ne omogućava dalje klasifikovanje nagrizajućih supstanci i smješa u skladu s UN GHS-om ili CLP-om. Primjenjivim regulatornim okvirom utvrdit će se način upotrebe ove ispitne metode. Iako se ovom ispitnom metodom ne dobijaju primjerene informacije o korozivnom oštećenju kože, trebalo bi napomenuti da se ispitna metoda B.46. posebno bavi efektom koji korozivno oštećenje kože in vitro ima na zdravlje. Za potpunu evaluaciju lokalnih efekata na kožu nakon jednostrukog dermalnog izlaganja potrebno je proučiti Smjernice OECD-a o IATA-i.

9. Tokom validacione studije na kojoj se bazira ova ispitna metoda ispitan je širok raspon hemikalija koje uglavnom čine supstance, a empirijskom bazom podataka validacione studije bilo je obuhvaćeno 60 supstanci koje su obuhvatale širok raspon hemijskih klasaa (8. i 9.). Na osnovu svih podataka koji su dostupni, ispitna metoda primjenjiva je na širok raspon hemijskih klasaa i agregatnih stanja, uključujući tečnosti, polučvrste i čvrste supstanci te voskove. Međutim, budući da za posebna agregatna stanja nisu lako rapoložive ispitivane stavke s odgovarajućim referentnim podacima, trebalo bi napomenuti da je tokom validacije procijenjen relativno malen broj voskova i nagrizajućih krutih supstanci. Tečnosti mogu biti vodene i bezvodne; čvrste supstanci mogu biti rastvorive ili nerastvorive u vodi. U slučajevima u kojima se može dokazati da se ispitna metoda ne može primijeniti za ispitivanje specifične kategorije supstanci, tu ispitnu metodu ne bi trebalo upotrebljavati za tu specifičnu kategoriju supstanci. Osim toga, pretpostavlja se da se ova ispitna metoda može primijeniti na smješe kao proširenje njene primjenjivosti na supstanci. Međutim, budući da smješe obuhvataju široki spektar kategorija i sastava te da su trenutno dostupne samo ograničene informacije o ispitivanju smješa, u slučajevima u kojima se može dokazati da se ispitna metoda ne može primijeniti za ispitivanje specifične kategorije smješa (npr. primjenom strategije koju su predložili Eskes i dr., 2012.) (18.), ispitnu metodu ne bi trebalo upotrebljavati za tu specifičnu kategoriju smješa. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smješi radi dobijanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smješe. Gasovi i aerosoli još nisu ocijenjeni u validacionim studijama (8. i

9.). Iako je moguće da se oni mogu ispitati upotrebom ispitne metode TER-a, trenutnom ispitnom metodom nije omogućeno ispitivanje gasova i aerosola.

NAČELO ISPITIVANJA

10. Ispitivana hemikalija primjenjuje se u trajanju do 24 sata na epidermalne površine diskova kože u dvodijelnom ispitnom sistemu u kojem diskovi kože djeluju kao pregrada između dva odjeljka. Diskovi kože uzeti su od humano usmrćenih glodara u dobi od 28 do 30 dana. Korozivno hemikalije identifikovane su prema sposobnosti da dovedu do gubitka integriteta i funkcije barijere normalnog stratum corneum, što se mjeri kao smanjenje TER vrijednosti ispod nivoa praga. Za TER vrijednosti za kožu glodara, vrijednost praga u iznosu od 5 kΩ odabrana je na osnovu mnogobrojnih podataka za širok raspon supstanci kod kojih je velika većina vrijednosti jasno bila ili znatno iznad (često > 10 kΩ), ili znatno ispod (često < 3 kΩ) te vrijednosti (16.). Uopšteno, ispitivane hemikalije koje na životinje ne djeluju korozivno, već su nadražujuće ili nenadražujuće, ne smanjuju TER ispod te vrijednosti praga. Nadalje, upotreba drugih preparata kože ili druge opreme može modificirati vrijednost praga, što znači da je potrebna dodatna validacija.

11. U ispitni postupak ugrađena je i faza vezanja boje kojom se potvrđuju pozitivni rezultati za TER u vrijednostima od približno 5 kΩ. Postupkom vezanja boje određuje se može li se povećanje ionske permeabilnosti pripisati fizičkom uništenju stratum corneum. Pokazalo se da se TER metodom uz primjenu kože glodara može predvidjeti korozivno djelovanje in vivo kod zečeva koji su procjenjivani ispitnom metodom B.4.

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

12.Prije rutinske upotrebe ispitne metode TER-a na koži glodara koja je u skladu s ovom ispitnom metodom laboratorije bi trebale dokazati tehničku osposobljenost pravilnim utvrđivanjem kategorije dvanaest supstanci koje služe za dokazivanje osposobljenosti koje su preporučene u tabeli 1. U slučajevima u kojima nije dostupna navedena supstanca ili ako je to opravdano, može se upotrijebiti druga supstanca za koju su dostupni primjereni referentni in vivo i in vitro podaci (npr. s listaa referentnih hemikalija pod uslovom da se primjenjuju isti kriterijumi za izbor kao oni opisani u tabeli 1.

Tabela 1.Lista supstanci koje služe za dokazivanje osposobljenosti

Supstanca	CAS br.	Hemijski klasa	Kat. Sistema UN GHS-a ili CLP-a na osnovu in vivo rezultata	Kat. VRM-a na osnovu in vitro rezultata	Agregatno stanje	pH
Supstanci koje djeluju korozivno in vivo						
N,N'-dimetil dipropilentriamin	10563-29-8	organska baza	1.A	6 × C	Tečno	8,3

1,2-diaminopropan	78-90-0	organska baza	1.A	6 × C	Tečno	8,3
Sumporna kiselina (10 %)	7664-93-9	neorganska kiselina	(1.A/)1.B/1.C	5 × C 1 × NC	Tečno	1,2
Kalijum hidroksid (10 % aq.)	1310-58-3	neorganska baza	(1.A/)1.B/1.C	6 × C	Tečno	13,2
Oktanska (kaprilna) kiselina	124-07-2	organska kiselina	2.B/1.C	4 × C 2 × NC	Tečno	3,6
2-tert-butilfenol	88-18-6	fenol	2.B/1.C	4 × C 2 × NC	Tečno	3,9
Supstanci koje ne djeluju korozivno in vivo						
Izostearinska kiselina	2724-58-5	organska kiselina	NC	6 × NC	Tečno	3,6
4-amino-1,2,4-triazol	584-13-4	organska baza	NC	6 × NC	Čvrsto	5,5
Fenetil bromid	103-63-9	elektrofil	NC	6 × NC	Tečno	3,6
4-(metiltio)-benzaldehid	3446-89-7	elektrofil	NC	6 × NC	Tečno	6,8
1,9-dekadien	1647-16-1	neutralne organske hemikalije	NC	6 × NC	Tečno	3,9
Tetrahloretilen	127-18-4	neutralne organske hemikalije	NC	6 × NC	Tečno	4,5
aq. = vodeni rastvor; CAS br. = registarski broj Službe za podatke o hemijskim supstancima; VRM = validirana referentna metoda; C = korozivno; NC = nije korozivno.						

POSTUPAK

Dostupni su standardni operativni postupci za ispitne metode TER-a na koži glodara za ispitivanje korozivnog oštećenja kože. Ispitne metode TER-a na koži glodara obuhvaćene ovom ispitnom metodom trebale bi biti u skladu sa sljedećim uslovima.

Životinje

Trebali bi se upotrebljavati štakori jer je osjetljivost njihove kože na supstanci u ovoj ispitnoj metodi prethodno dokazana te je jedini izvor kože koji je službeno validiran. Dob (u kojoj se koža prikuplja) i soj glodara posebno su važni kako bi se osiguralo da folikuli dlake budu u latentnoj fazi prije početka rasta odraslih dlaka.

Dlaka na leđima i bokovima mladih, približno 22 dana starih mužjaka ili ženki glodara (soja Wistar ili nekog uporedivog soja) pažljivo se ukloni malim škarama. Životinje se zatim operu nježnim brisanjem, a ošišana se površina umoči u antibiotsku rastvor (koja sadrži, primjerice, streptomicin, penicilin, hloramfenikol i amfotericin u koncentracijama koje su efikasne u inhibiciji rasta bakterija). Životinje se ponovno operu antibioticima trećeg ili četvrtog dana nakon prvog pranja i koriste u roku od tri dana nakon drugog pranja, kad se stratum corneum oporavi od odstranjivanja dlake.

Priprema diskova kože

Životinje se humano usmrte kad su stare 28–30 dana; ta je dob veoma važna. Sa svake životinje odstrani se bočna koža na leđima s koje se opreznim ljuštenjem oguli prekodnosna potkožna mast. Odstrane se diskovi kože, u prodnosu svaki približno 20 mm. Prije upotrebe diskova koža se može skladištiti ako se pokaže da su podaci za pozitivnu i negativnu kontrolu istovjetni podacima dobijenima sa svježom kožom.

Po jedan disk stavi se preko jednog kraja teflonske (politetrafluoretilenske) cijevi, osiguravajući da je epidermalna površina u dodiru s cijevi. Gumeni O-prsten pritisne se preko ruba cijevi kako bi se učvrstila koža, a višak tkiva se odreže. Gumeni O-prsten zatim se dužinom ruba teflonske cijevi oprezno zabrtvi petrolejskim gelom. Cijev se uvede u prihvatnu komoru koja sadrži rastvor $MgSO_4$ (154 mM) u kojoj je pridržava opružna štipaljka (slika 1.). Disk kože treba potpuno prastvoriti u rastvor $MgSO_4$. Od kože jednog glodara može se dobiti čak 10–15 diskova kože. Dimenzije cijevi i O-prstena prikazane su na slici 2.

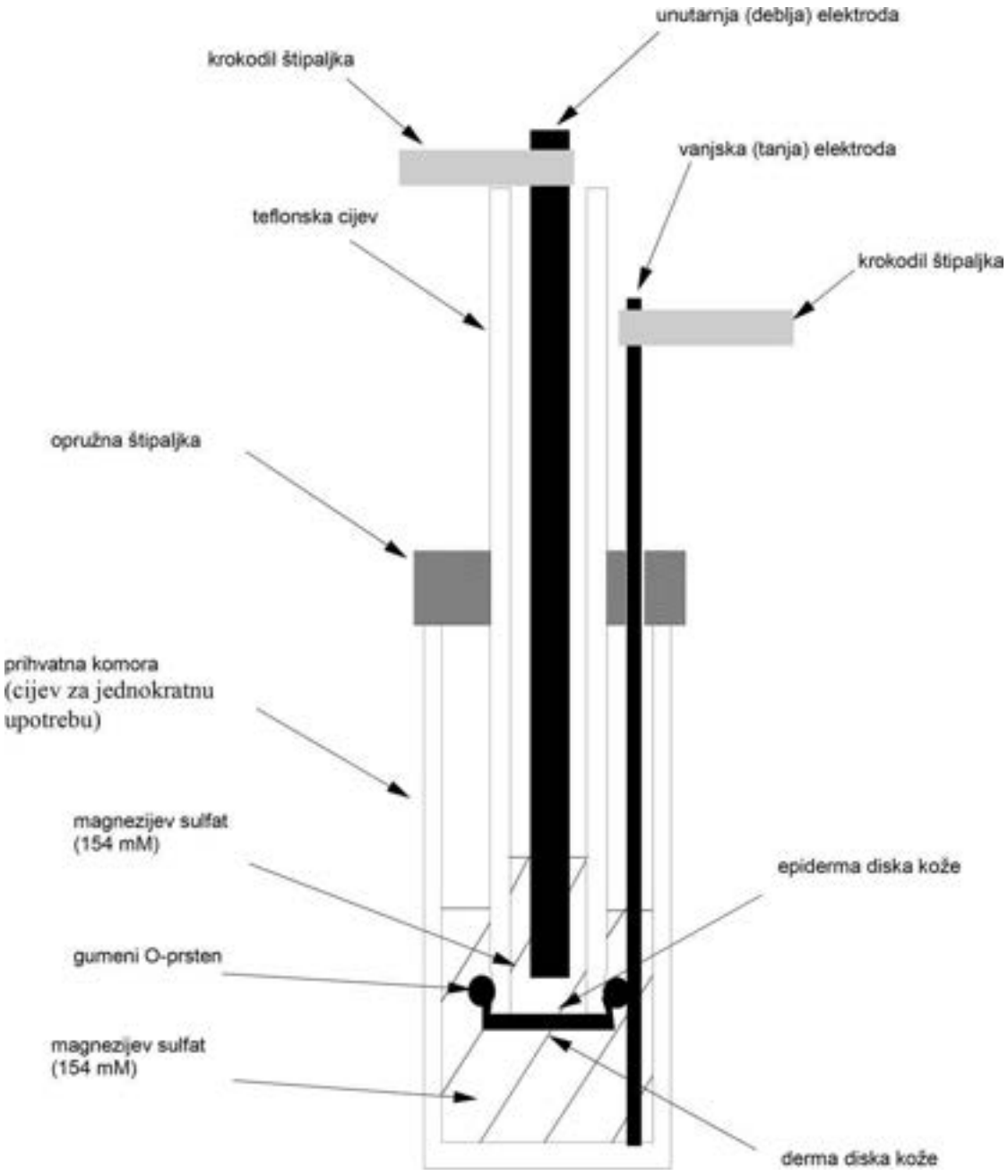
18.Prije početka ispitivanja mjeri se TER na dva kožna diska kao postupak kojim se kontroliše kvaliteta kože svake životinje. Kako bi se preostali diskovi te kože mogli koristiti u ispitnoj metodi, oba kontrolna diska moraju dati vrijednosti električnog otpora veće od 10 kΩ. Ako je vrijednost otpora manja od 10 kΩ, preostale diskove te kože treba baciti.
Primjena ispitivane hemikalije i kontrolnih supstanci

Za svaki ciklus (eksperiment) treba koristiti istovremene pozitivne i negativne kontrole kako bi se obezbijedila odgovarajuća uspješnost eksperimentnog modela. Za svaki ciklus (eksperiment) treba koristiti diskove kože jedne životinje. Kao ispitivane hemikalije pozitivne i negativne kontrole predlažu se 10 M hlorovodonična kiselina odnosno destilovana voda.

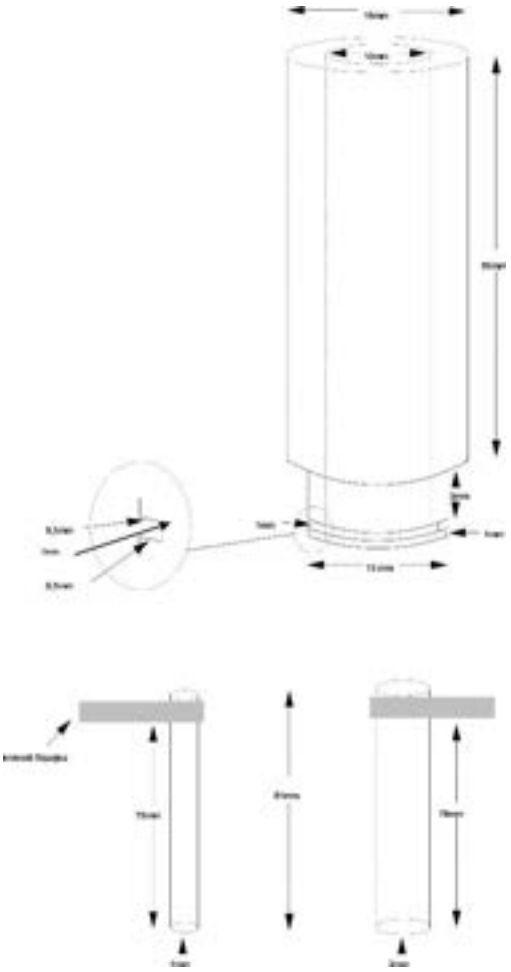
Tečno ispitivane hemikalije (150 µl) primjenjuju se ravnodnosno na epidermalnu površinu unutar cijevi. Kod ispitivanja krutih materijala, dovoljna količina čvrste supstanci primjenjuje se ravnodnosno na disk kako bi se obezbijedila pokrivenost cijele epiderme. Na čvrstu supstancu dodaje se dejonizovana voda (150 µl) i cijev se pažljivo protrese. Za postizanje maksimalnog dodira s kožom, čvrste supstanci možda treba zagrijati na 30 °C kako bi se ispitivana supstanca rastopila ili omekšala ili samljeti kako bi se dobio zrnati materijal ili prah.

Za svako ispitivanje i kontrolnu hemikaliju koriste se tri diska kože u svakom ciklusu ispitivanja (eksperimentu). Ispitivane hemikalije primjenjuju se 24 sata na temperaturi 20–23 °C. Ispitivana hemikalija uklanja se ispiranjem pod mlazom vode iz slavine čija temperatura nije viša od sobne temperature sve dok se ne odstrani sav materijal.

Slika 1. Uređaj za Test Transkutanog Električnog Otpora (TER) na Koži pacova



Slika 2. Dimenzije Upotrijebljene Teflonske (Politetrafluoretilenske – PTFE) I Prihvatne Cijevi i Elektroda



Kritički faktori uređaja prikazanog na gornjoj slici:

— unutarnji prečnik teflonske (PTFE) cijevi,
— dužina elektroda u odnosu na teflonsku i prihvatnu cijev; dužina bi trebala biti takva da elektrode ne dodiruju disk kože i da je elektrode pri standardnoj dužini u dodiru s rastvaračom MgSO4,
— količina rastvora MgSO4 u prihvatnoj cijevi trebala bi omogućiti dubinu tečnosti u odnosu na nivo u u teflonskoj cijevi, kako je prikazano na slici 1.,
— disk kože treba biti dobro pričvršćen na teflonsku cijev, kako bi izmjereni električni otpor vjerno odražavao svojstva kože.

Mjerenja transkutanog električnog otpora (TER)

Impedancija kože mjeri se kao transkutani električni otpor (TER) upotrebom Wheatstoneova mjernog mosta na niskonaponsku izmjeničnu struju (18.). Opšte su specifikacije mosta radni napon 1–3 volta, izmjenična struja sinusnog ili pravokutnog oblika 50–1 000 Hz i mjerno područje od najmanje 0,1–30 kΩ. Mjerni most koji je korišten u validacionoj studiji mjerio je induktivitet, kapacitivnost i otpor do vrijednosti 2 000 H, 2 000 μF odnosno 2 MΩ, kod frekvencija od 100 Hz ili 1 kHz, primjenom serijskih ili paralelnih vrijednosti. U svrhu testa otkrivanja korozivnog djelovanja, mjerenja transkutanog električnog otpora bilježe se pri frekvenciji od 100 Hz primjenom serijskih vrijednosti. Prije mjerenja električnog otpora,

površinska napon kože smanjuje se dodavanjem dovoljnog volumena 70-postotnog etanola koji se nanosi na epidermu. Nakon nekoliko sekundi etanol se uklanja iz cijevi, a tkivo se hidratizira dodavanjem 3 ml rastvora MgSO4 (154 mM). Elektrode mjernog mosta postavljaju se na obje strane diska kože kako bi se izmjerio otpor u kΩ/disk kože (slika 1.). Dimenzije elektrode i dužina elektrode izložene ispod krokodilskih štipaljki prikazane su na slici 2. Štipaljka na unutarnjoj elektrodi za vrijeme mjerenja otpora stoji na vrhu teflonske cijevi kako bi se osiguralo da u rastvor MgSO4 bude uronjena stalno ista dužina elektrode. Vanjska elektroda postavlja se unutar komore na način da stoji na dnu komore. Razmak između opružne štipaljke i dna teflonske cijevi održava se nepromjenjivim (slika 2.) jer ta udaljenost utiče na dobijene vrijednosti otpora. Zbog toga, razmak između unutarnje elektrode i diska kože treba biti nepromjenjiv i minimalan (1–2 mm).

Ako je izmjerena vrijednost otpora veća od 20 kΩ, to može biti posljedica preostalog sloja ispitivane hemikalije na epidermalnoj površini diska kože. Ponovno treba pokušati ukloniti taj sloj, primjerice, tako da se teflonska cijev zatvori pritiskom prsta zaštićenog rukavicom i protrese približno deset sekundi; rastvora MgSO4 baca se i mjerenje otpora ponavlja se s novom rastvorom MgSO4.

Svojstva i dimenzije ispitnog uređaja i primijenjen ispitni postupak mogu uticati na dobijene vrijednosti transkutanog električnog otpora. Prag od 5 kΩ za korozivno djelovanje određen je iz podataka dobijenih konkretnim uređajem i postupkom opisanim u ovoj ispitnoj metodi. Ako se ispitni uslovi izmijene ili se primijeni drukčiji uređaj, mogu vrijediti drugačiji pragovi i kontrolne vrijednosti. Stoga je potrebno kalibrirati metodologiju i vrijednosti praga otpora ispitivanjem niza supstanci koje služe za dokazivanje osposobljenosti odabranih među supstancima koje su korištene u validacionoj studiji (8. i 9.) ili hemikalijama koje su iz hemijski sličnih klasaa kao supstanci koje se istražuju. Niz odgovarajućih supstanci koje služe za dokazivanje osposobljenosti utvrđen je u tabeli 1.

Metode vezanja boje

Izlaganje određenih nenagrizajućih materijala može rezultirati smanjenjem otpora na vrijednost ispod praga od 5 kΩ koja dopušta prolazak iona kroz stratum corneum, čime se električni otpor smanjuje (9.). Na primjer, neutralne organske supstanci i supstanci koje imaju površinski aktivna svojstva (uključujući deterdžente, emulgatore i druge površinski aktivne supstanci) mogu iz kože odstraniti lipide i time povećati propusnost barijere za ione. Znači, ako su vrijednosti TER-a koje proizvode te hemikalije manje od 5 kΩ ili približno 5 kΩ bez vidljivog oštećenja diskova kože, na kontrolnom i tretiranom tkivu treba sprovesti procjenu penetracije boje kako bi se odredilo jesu li te dobijene vrijednosti TER rezultat povećane propusnosti kože ili korozivnog oštećenja kože (7. i 9.). Ako se radi o korozivnom djelovanju, odnosno o pucanju stratum corneum, boja sulforodamin B, kad se nanese na površinu kože, brzo prodire i boji potkožno tkivo. Ta konkretna boja stabilna je na širok raspon supstanci i na nju ne utiče postupak ekstrakcije opisan u nastavku.
Primjena i odstranjivanje boje sulforodamina B

Nakon procjene vrijednosti TER, magnezijev sulfat evakuira se iz cijevi i koža se pažljivo pregleda s obzirom na vidljiva oštećenja. Ako nema očitih velikih oštećenja (npr. perforacija), 150 µl 10-postotne (w/v) rastvora boje sulforodamina B (Acid Red 52; C.I. 45100; CAS broj

3520-42-1) u destiliranoj vodi primjenjuje se na epidermalnu površinu svakog diska kože tokom dva sata. Zatim se ti diskovi kože približno deset sekundi ispiru vodom iz slavine čija temperatura nije viša od sobne temperature kako bi se time uklonio višak boje ili nevezana boja. Svaki disk kože oprezno se skine s teflonske cijevi i stavi u tikvicu (npr. tikvicu od 20 ml za scintilaciju) koja sadrži deioniziranu vodu (8 ml). Tikvice se nježno tresu pet minuta kako bi se odstranila eventualna preostala nevezana boja. Zatim se ponavlja postupak ispiranja, nakon kojega se diskovi kože skidaju i stavljaju u tikvice koje sadržiju 5 ml 30-postotnog (w/v) natrijumog dodecil-sulfata (SDS) u destiliranoj vodi i ostave se inkubirati preko noći na 60 °C.

Nakon inkubacije, svaki disk kože skida se i baca, a preostala rastvora centrifugira se osam minuta na 21 °C (relativna centrifugalna sila ~175 × g). Uzorak od 1 ml supernatanta razrijedi se u odnosu 1:5 (v/v) [tj. 1 ml + 4 ml] s 30-postotnim (w/v) natrijumim dodecil-sulfatom (SDS) u destiliranoj vodi. Optička gustina (OD) rastvora mjeri se na 565 nm.
Izračun sadržaja boje

Sadržaj boje sulforodamin B po disku računa se iz vrijednosti optičke gustine (OD) (9.) (koeficijent molarne ekstinkcije sulforodamina B na 565 nm = 8,7 × l04; molekulska masa = 580). Sadržaj boje određuje se za svaki disk kože primjenom odgovarajuće kalibracione krive, zatim se za ponovljene eksperimente izračunava srednja vrijednost sadržaja boje.

Kriterijumi prihvatljivosti

Srednji rezultati TER vrijednosti prihvatljivi su ako su vrijednosti istovremene pozitivne i negativne kontrole unutar prihvatljivih raspona za predmetnu laboratorijsku metodu ispitivanja. Prihvatljivi rasponi otpora za metodologiju i uređaj iz prethodnog teksta navedeni su u sljedećoj tabeli:

Kontrola	Supstanca	Raspon otpora (kΩ)
Pozitivna	10 M hlorovodonična kiselina	0,5–1,0
Negativna	Destilovana voda	10–25

Srednji rezultati vezanja boje prihvatljivi su pod uslovom da su vrijednosti istovremene kontrole unutar prihvatljivih raspona za predmetnu metodu. Predloženi prihvatljivi rasponi sadržaja boje za kontrolne supstanci za metodologiju i uređaj iz prethodnog teksta navedeni su u sljedećoj tabeli:

Kontrola	Supstanca	Raspon sadržaja boje (µg/disku)

Pozitivna	10 M hlorovodonična kiselina	40–100
Negativna	Destilovana voda	15–35

Tumačenje rezultata

Granična vrijednost TER-a koja služi za razlikovanje nagrizajućih od nenagrizajućih ispitivanih hemikalija utvrđena je tokom optimizacije ispitne metode, ispitana tokom predvalidacione faze i potvrđena u službenoj validacionoj studiji.

Model predviđanja za ispitnu metodu TER-a na koži glodara za ispitivanje korozivnog oštećenja kože, povezan sa sistemom klasifikacije UN GHS-om ili CLP-om naveden je u nastavku.
Ispitivana hemikalija ne smatra se nagrizajućom za kožu:

- ako je srednja vrijednost TER-a postignuta za ispitivanu hemikaliju veća od (>) 5 kΩ; ili
- ako je srednja vrijednost TER-a postignuta za ispitivanu hemikaliju manja od ili jednaka (≤) 5 kΩ; i
- ako diskovi kože ne pokazuju vidljivo oštećenje (npr. perforaciju), i
- ako je srednja vrijednost sadržaja boje diska manja od (<) srednje vrijednosti sadržaja boje diska iz istovremene pozitivne kontrole s 10 M HCl.
- Ispitivana hemikalija smatra se nagrizajućom za kožu:
- ako je srednja vrijednost TER-a postignuta za ispitivanu hemikaliju manja od ili jednaka (≤) 5 kΩ i ako su diskovi kože vidljivo oštećeni (npr. perforirani); ili
- ako je srednja vrijednost TER-a postignuta za ispitivanu hemikaliju manja od ili jednaka (≤) 5 kΩ i:

- ako diskovi kože ne pokazuju vidljivo oštećenje (npr. perforaciju), ali
- srednja vrijednost sadržaja boje diska veća je ili jednaka (≥) srednjoj vrijednosti sadržaja boje diska iz istovremene pozitivne kontrole s 10 M HCl.

Ciklus ispitivanja (eksperiment) koji obuhvata najmanje tri ponovljena diska kože trebao bi biti dovoljan za ispitivanu hemikaliju ako je klasifikovanje nedvosmisleno. Međutim, u slučajevima graničnih rezultata, kao što su neusklađena ponovljena mjerenja i/ili srednja vrijednost TER-a od 5 ± 0,5 kΩ, trebalo bi razmotriti drugi neovisni ciklus ispitivanja (eksperiment), a i treći ciklus u slučaju neusklađenih rezultata između prva dva ciklusa ispitivanja (eksperimenta).

PODACI I IZVJEŠTAVANJE

Podaci

Po mogućnosti, vrijednosti otpora (kΩ) i vrijednosti sadržaja boje (μg/disku) za ispitivanu hemikaliju te za pozitivne i negativne kontrole treba zabilježiti u tabličnom obliku, uključujući podatke za svaki pojedinačni ponovljeni disk u svakom ciklusu ispitivanja (eksperimentu) i

srednje vrijednosti ± standardno odstepene. Treba zabilježiti sve ponovljene eksperimente. Uočeno oštećenje na diskovima kože trebalo bi zabilježiti za svaku ispitivanu hemikaliju.
Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju trebalo bi sadržiti sljedeće informacije:

Ispitivana hemikalija i kontrolne supstanci:

- supstanca s jednim sastojkom: hemijske identifikacione oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.,
- supstanca s više sastojaka, UVCB supstanca i smješa: opis (koliko je to moguće) hemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizičko-hemijskih svojstava sastojaka,
- fizički izgled, rastvorivost u vodi i druga relevantna fizičko-hemijska svojstva,
- izvor, broj serije, ako su dostupni,
- tretiranje ispitivane hemikalije/kontrolne supstanci prije ispitivanja, ako je primjenljivo (npr. grijanje, mljevenje),
- stabilnost ispitivane hemikalije, rok upotrebe ili datum za ponovnu analizu ako je poznat,
- uslovi skladištenja.

Ispitne životinje:

- soj i pol koji je upotrijebljen,
- dob životinja kad su upotrijebljene kao donorske životinje,
- porijeklo, uslovi smještaja, prehrana itd.,
- pojedinosti o preparatu kože.

Ispitni uslovi:

- kalibracione krive za ispitni uređaj,
- kalibracione krive za sprovođenje testa vezanja boje, pojas koji se upotrebljava za mjerenje optičke gustine (OD) i raspon linearnosti OD-a uređaja za mjerenje (npr. spektrofotometra), ako je primjereno,
- pojedinosti o ispitnom postupku upotrijebljenom za mjerenja TER-a,
- pojedinosti o ispitnom postupku za procjenu vezivanja boje, ako je primjereno,
- upotrijebljene ispitne doze, trajanje perioda izlaganja i temperature izlaganja,
- pojedinosti o postupku ispiranja upotrijebljenom nakon perioda izlaganja,
- broj ponovljenih diskova kože upotrijebljenih po ispitivanoj hemikaliji i kontrolama (pozitivna i negativna kontrola),
- opis svih izmjena ispitnog postupka,
- upućivanje na prošle podatke za predmetni model. To bi, među ostalim, trebalo uključivati:

i)prihvatljivost vrijednosti TER-a pozitivnih i negativnih kontrola (u kΩ) u odnosu na raspone otpora pozitivnih i negativnih kontrola;

ii)prihvatljivost vrijednosti sadržaja boje pozitivnih i negativnih kontrola (u µg/disku) u odnosu na raspone sadržaja boje pozitivnih i negativnih kontrola;

iii)prihvatljivost rezultata ispitivanja u odnosu na prijašnju varijabilnost među ponovljenim diskovima kože,

—opis primijenjenih kriterijuma za odlučivanje/modela predviđanja.

Rezultati:

—tablični podaci iz testova za utvrđivanje vrijednosti TER-a i vezivanja boje (ako je primjereno) za pojedinačne ispitivane hemikalije i kontrole, za svaki ciklus ispitivanja (eksperiment) i svaki ponovljeni disk kože (pojedinačne životinje i pojedinačni uzorci kože), srednje vrijednosti, standardne devijacije (SD) i koeficijenti varijacije (CV),

—opis svih uočenih efekata,

—utvrđeno klasifikovanje, s upućivanjem na primijenjeni model predviđanja/kriterijume odlučivanja.

Rasprava o rezultatima

Zaključci

B.40. BIS. KOROZIVNO OŠTEĆENJE KOŽE IN VITRO: ISPITNA METODA NA MODELU REKONSTRUISANE LJUDSKE EPIDERME (RhE)

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 431 (2016.). Korozivno oštećenje kože odnosi se na izazivanje ireverzibilnog oštećenja kože koje se manifestuje kao vidljiva nekroza koja kroz epidermu prodire u dermu nakon primjene ispitivane hemikalije [kako je utvrđeno Globalno usklađenim sistemom klasifikacije i označivanja hemikalija (GHS) Ujedinjenih naroda (UN) (1.) i Uredbom (EZ) br. 1272/2008 o klasifikaciji, označavanju i pakovanja supstanci i smješa (CLP) (6) Europske unije]. Ova ažurirana ispitna metoda B.40.bis pruža in vitro postupak kojim se omogućava utvrđivanje nagrizajućih i nenagrizajućih supstanci i smješa u skladu s UN GHS-om i CLP-om. Omogućava i djelimično dalje klasifikovanje nagrizajućih supstanci.

Procjena potencijala hemikalija da uzrokuju korozivno oštećenje kože obično je uključivala upotrebu laboratorijskih životinja (ispitna metoda B.4., ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 404; izvorno donesena 1981. i revidirana 1992., 2002. i 2015.) (2.). Uz sadašnju ispitnu metodu B.40.bis validirane su i donesene još dvije ispitne metode in vitro za ispitivanje potencijala hemikalija da uzrokuju korozivno oštećenje kože – ispitna metoda B.40. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 430) (3.) i ispitna metoda B.65. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 435) (4.). Nadalje, donesena je ispitna metoda in vitro B.46. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 439) (5.) za ispitivanje potencijala korozivnog oštećenja kože. U Smjernicama OECD-a o integrisanim pristupima ispitivanju i procjeni (IATA) za nagrizanje i korozivno oštećenje kože opisano je nekoliko modula u kojima se grupišu izvori

informacija i alati za analizu te se pružaju smjernice o i. načinu integrisanja i upotrebe postojećih podataka o ispitivanju i podataka koji se dobijaju bez ispitivanja za procjenu potencijala hemikalija da uzrokuju korozivno oštećenje i korozivno oštećenje kože te ii. predlaganju pristupa kad je potrebno dalje ispitivanje (6.).

Ova se ispitna metoda bavi konačnim efektom korozivnog oštećenja kože na zdravlje ljudi. U njoj se upotrebljava rekonstruirana ljudska epiderma (RhE) (dobijena iz ljudskih netransformisanih epidermalnih keratinocita) koja vjerno imitira histološka, morfološka, biohemijska i fiziološka svojstva gornjih slojeva ljudske kože, tj. epiderme. Odgovarajuća smjernica OECD-a za ispitivanje izvorno je donesena 2004. i ažurirana 2013. kako bi se uključile dodatne ispitne metode u kojima se upotrebljavaju modeli RhE-a i mogućnost upotrebe metoda koje podržavaju dalje klasifikovanje nagrizajućih hemikalija, a 2015. je ažurirana radi upućivanja na smjernice o IATA-i i uvođenja alternativnog postupka za mjerenje vijabilnosti.
4.Ova ispitna metoda obuhvata četiri validirana komercijalno dostupna modela RhE-a. Predvalidacione studije (7.), nakon kojih je slijedila službena validaciona studija za procjenu korozivnog oštećenja kože (8., 9. i 10.), provedene su (11. i 12.) za dva ta komercijalno dostupna ispitna modela – standardni model EpiSkin™ i test korozivnog oštećenja kože EpiDerm™ (EPI-200) (dalje u tekstu „Validirane referentne metode – VRM-ovi"). Ishod tih studija doveo je do preporuke da bi se dvije prethodno navedene validirane referentne metode mogle upotrebljavati u regulatorne svrhe za razlikovanje nagrizajućih supstanci (C) od nenagrizajućih supstanci (NC) i da bi se EpiSkin™ osim toga mogao upotrebljavati za dalje klasifikovanje nagrizajućih supstanci (13., 14. i 15.). Druga dva komercijalno dostupna ispitna modela RhE za utvrđivanje korozivnog oštećenja kože in vitro pokazala su rezultate slične validiranoj referentnoj metodi EpiDerm™ u skladu s validacijom na osnovu zahtjeva izvođenja (16., 17. i 18.). To su SkinEthic™ RHE (7) i epiCS® (prethodni naziv EST-1000) te se i oni mogu upotrebljavati u regulatorne svrhe za razlikovanje nagrizajućih supstanci od nenagrizajućih supstanci (19. i 20.). Postvalidacionim studijama koje su proveli proizvođači modela RhE od 2012. do 2014. s poboljšanim protokolom u kojem su ispravljene interferencije neodređene redukcije MTT-a koje uzrokuju ispitivane hemikalije poboljšana je efikasnost razlikovanja nagrizajućih i nenagrizajućih supstanci, ali i daljeg klasifikacije nagrizajućih supstanci (21. i 22.). Provedene su dalje statističke analize postvalidacijskih podataka s modelima EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE i EpiCS® kako bi se identificirali alternativni modeli predviđanja koji poboljšavaju prediktivnu sposobnost daljeg klasifikacije.

Prije nego što se predložena slična ili izmijenjena ispitna metoda RhE in vitro za korozivno oštećenje kože, koja nije validirana referentna metoda, može upotrijebiti u regulatorne svrhe, trebalo bi utvrditi njenu pouzdanost, relevantnost (tačnost) i ograničenja za njenu predloženu upotrebu kako bi se obezbijedila njena sličnost s validovanom referentnom metodom, u skladu sa zahtjevima izvođenja (24.) utvrđenima u skladu s načelima Smjernice OECD-a br. 34 (25.). Uzajamno prihvatanje podataka garantovaće će se samo nakon što se svaka predložena nova ili ažurirana ispitna metoda koja je u skladu sa zahtjevima izvođenja pregleda i uključi u odgovarajuću smjernicu za ispitivanje. Ispitni modeli uključeni u tu smjernicu za ispitivanje mogu se upotrijebiti za ispunjavanje zahtjeva zemalja u pogledu rezultata ispitivanja ispitne metode in vitro za korozivno oštećenje kože, uz ossupstancivanje koristi od uzajamnog prihvatanja podataka.

POČETNA RAZMATRANJA

Ova ispitna metoda omogućava utvrđivanje nagrizajućih i nenagrizajućih supstanci i smješa u skladu s UN GHS-om i CLP-om. Ovom se ispitnom metodom podržava dalje klasifikovanje nagrizajućih supstanci i smješa na neobaveznu potkategoriju 1.A, u skladu s UN GHS-om (1.), te kombinaciju potkategorija 1.B i 1.C (21., 22. i 23.). Ograničenje je ove metode to što ne omogućava razlikovanje potkategorije 1.B i potkategorije 1.C s korozivnim djelovanjem na kožu u skladu s UN GHS-om i CLP-om zbog ograničenog skupa poznatih hemikalija iz potkategorije 1.C s nagrizajućim djelovanjem in vivo. Ispitnim modelima EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE i epiCS® mogu se odrediti dalje potkategorije (tj. 1.A naspram 1.B i 1.C naspram NC).
Širok raspon hemikalija, koje uglavnom čine pojedinačne supstanci, ispitan je u validaciji kojom se podržavaju ispitni modeli uključeni u ovu ispitnu metodu kada se upotrebljavaju za utvrđivanje nagrizajućih i nenagrizajućih hemikalija; empirijska baza podataka validacione studije uključivala je 60 hemikalija koje su obuhvatale širok raspon hemijskih klasaa (8., 9. i 10.). Subjekti koji su razvili ispitnu metodu proveli su ispitivanje radi dokazivanja osjetljivosti, specifičnosti, tačnosti i obnovljivosti unutar laboratorija testa za dalje klasifikovanje, a rezultate je pregledao OECD (21., 22. i 23.). Na osnovu svih podataka koji su dostupni, ispitna metoda primjenjiva je na širok raspon hemijskih klasaa i agregatnih stanja, uključujući tečnosti, polučvrste i čvrste supstance te voskove. Tečnosti mogu biti vodene i bezvodne; čvrste supstance mogu biti rastvorive ili nerastvorive u vodi. Čvrste supstance prije primjene treba samljeti u sitni prah kad je god moguće; nije potrebno nikakvo drugo prethodno tretiranje uzorka. U slučajevima u kojima se može dokazati da se ispitni modeli uključeni u ispitnu metodu ne mogu primijeniti za ispitivanje specifične kategorije ispitivanih hemikalija, te modele ne bi trebalo upotrebljavati za tu specifičnu kategoriju ispitivanih hemikalija. Osim toga, pretpostavlja se da se ova ispitna metoda može primijeniti na smješe kao proširenje njene primjenjivosti na supstance. Međutim, budući da smješe obuhvataju široki spektar kategorija i sastava te da su dostupne samo ograničene informacije o ispitivanju smješa, u slučajevima u kojima se može dokazati da se ispitna metoda ne može primijeniti za ispitivanje specifične kategorije smješa ispitnu metodu ne bi trebalo upotrebljavati za tu specifičnu kategoriju smješa. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smješi radi dobijanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smješe. Gasovi i aerosoli još nisu ocijenjeni u validacionim studijama. Iako je moguće da se oni mogu ispitati upotrebom tehnologije RhE, ispitnom metodom nije omogućeno ispitivanje gasova i aerosola.

Ispitivane hemikalije koje apsorbuju svjetlost u istom rasponu kao i MTT formazan i ispitivane hemikalije koje mogu direktno redukovati vitalnu boju MTT (na MTT formazan) mogu ometati mjerenje vijabilnosti tkiva te se kod njih trebaju upotrebljavati prilagođene kontrole za ispravke. Vrsta prilagođenih kontrola koja može biti potrebna mijenja će se u zavisnosti od vrste interferencije koju proizvodi ispitivana hemikalija i postupku koji se upotrebljava za mjerenje MTT formazana.

Iako se ovom ispitnom metodom ne dobijaju primjerene informacije o korozivnom oštećenju kože, trebalo bi napomenuti da se ispitna metoda B.46. posebno bavi efektom iritacije kože na zdravlje in vitro i bazira se na istom ispitnom sistemu RhE uz upotrebu drugog protokola. Za potpunu evaluaciju lokalnih efekata na kožu nakon jednostrukog dermalnog izlaganja potrebno je proučiti Smjernice OECD-a o integrisanim pristupima ispitivanju i procjeni. Taj pristup IATA obuhvata ssprovođenje in vitro ispitivanja za dokazivanje korozivnog (kako je opisano u ovoj ispitnoj metodi) i nadražujućeg djelovanja na kožu prije eventualnog ssprovođenja ispitivanja na

živim životinjama. Podrazumijeva se da upotreba ljudske kože podliježe nacionalnim i međunarodnim etičkim pitanjima i uslovima.

NAČELO ISPITIVANJA

Ispitivana se hemikalija lokalno nanosi na trodimenzionalni model RhE, koji čine netransformisani ljudski epidermalni keratinociti uzgojeni u svrhu dobijanja višeslojnog, visoko izdiferenciranog modela ljudske epiderme. Sastoji se od organiziranih bazalnih, trnastih i zrnatih slojeva te višeslojnog rožnatog sloja (stratum corneum) koji između ćelija sadrži lamelarne masne slojeve koji predstavljaju glavne klase lipida analogne onima koji se susreću in vivo.

Ispitna metoda RhE bazira se na pretpostavci da korozivne hemikalije mogu penetrirati kroz stratum corneum putem difuzije ili erozije te su citotoksične za ćelije ispod tog sloja. Vijabilnost ćelija mjeri se enzimskom konverzijom vitalne boje MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid, tiazolil plavo tetrazolij bromid; CAS broj 298-93-1] u so plavog formazana koja se kvantitativno mjeri nakon ekstrakcije iz tkiva. Korozivne hemikalije prepoznaju se po tome što smanjuju vijabilnost ćelija ispod definisanih pragova. Pokazalo se da se ispitnom metodom za utvrđivanje korozivnog oštećenja kože koja se bazira na modelu RhE može predvidjeti korozivno djelovanje na kožu in vivo koje je procijenjeno kod zečeva u skladu s ispitnom metodom B.4.

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

Prije rutinske primjene bilo kojeg od četiri validovanih ispitnih modela RhE koji su u skladu s ovom ispitnom metodom laboratorije bi trebali dokazati tehničku osposobljenost pravilnim utvrđivanjem kategorije dvanaest supstanci koje služe za dokazivanje osposobljenosti koje su navedene u tabeli 1. U slučaju upotrebe metode za dalje klasifikovanje trebalo bi dokazati i pravilno dalje klasifikovanje. U slučajevima u kojima nije dostupna navedena supstanca ili ako je to opravdano, može se upotrijebiti druga supstanca za koju su dostupni primjereni referentni in vivo i in vitro podaci (npr. s listaa referentnih hemikalija) pod uslovom da se primjenjuju isti kriterijumi za izbor kao oni opisani u tabeli 1.

Nakon što se metoda uspješno uspostavi i nakon što se dokaže osposobljenost u pogledu njene upotrebe, takva rutinska provjera neće biti potrebna. Međutim, kod rutinske upotrebe ispitne metode preporučuje se dalje ocjenjivanje svojstava barijere u pravilnim vremenskim intervalima.

POSTUPAK

U nastavku se nalazi opšti opis elemenata i postupaka u vezi s metodom na osnovu rekonstruisane ljudske epiderme za potrebe ocjenjivanja korozivnog oštećenja kože obuhvaćenih ovom ispitnom metodom. Modeli RhE koji su podržani kao naučno valjani za upotrebu u ovoj ispitnoj metodi, tj. modeli EpiSkin™ (standardni model), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE i epiCS® mogu se nabaviti iz komercijalnih izvora. Dostupni su standardni operativni postupci za ta četiri modela RhE (34., 35., 36. i 37.), a glavni. Preporučuje se da se pri sprovođenju i upotrebi jednog od tih modela u laboratoriji prouči relevantni standardni operativni postupak. Ispitivanje s četiri ispitna modela RhE obuhvaćena ovom ispitnom metodom trebalo bi biti u skladu sa sljedećim:

ELEMENTI ISPITNE METODE RHE

Opšti uslovi

Za rekonstruisanje epitela treba koristiti netransformisane ljudske keratinocite. Ispod funkcionalnog rožnatog sloja (stratum corneum) nalaze se višestruki slojevi vijabilnih epitelnih ćelija (bazalni sloj, trnasti sloj, zrnati sloj). I sam rožnati sloj višeslojan je te sadrži esencijalni profil lipida kao čvrstu funkcionalnu barijeru koja je sposobna zaustaviti brzi prodor citotoksičnih referentnih hemikalija, npr. natrijum dodecil-sulfat (SDS) ili Triton X-100. Funkciju barijere trebalo bi dokazati i može se ocijeniti određivanjem koncentracije pri kojoj referentna hemikalija smanjuje vijabilnost tkiva za 50 % (IC50) nakon fiksnog vremena izlaganja ili određivanjem vremena izlaganja koje je potrebno da se vijabilnost ćelija smanji za 50 % (ET50) nakon primjene referentne hemikalije u unaprijed određenoj fiksnoj koncentraciji. Model RhE mora biti dovoljno nepropustan da spriječi prolazak materijala oko rožnatog sloja do vijabilnog tkiva jer bi to dovelo do lošeg modeliranja izlaganja kože. Model RhE ne smije biti zagađen bakterijama, virusima, mikoplazmama ili gljivicama.

Funkcionalni uslovi

Vijabilnost

Za kvantifikaciju vijabilnosti tkiva upotrebljava se MTT test (27.). Vijabilne ćelije modela tkiva RhE redukuju vitalnu boju MTT u talog plavog MTT formazana koji se zatim ekstrahuje iz tkiva izopropanolom (ili sličnim rastvaračem). Optička gustina (OD) samog ekstrakcionog rastvarači treba biti dovoljno mala tj. OD < 0,1. Ekstrahujeni MTT formazan može se kvantifikovati upotrebom mjerenja standardne apsorbancije (OD) ili postupkom HPLC/UPLC spektrofotometrije (38.). Korisnici modela RhE trebali bi osigurati da svaka šarža modela RhE koji se upotrebljava ispunjava utvrđene kriterijume za negativnu kontrolu. Raspon prihvatljivosti (gornja i donja granica) za vrijednosti optičke gustine negativne kontrole trebao bi utvrditi subjekt koji je razvio model RhE ili dobavljač tog modela. Rasponi prihvatljivosti za vrijednosti optičke gustine negativne kontrole za četiri validirana ispitna modela RhE uključena u ovu ispitnu metodu navedeni su u tabeli 2. Korisnik HPLC/UPLC spektrofotometrije trebao bi upotrebljavati raspone optičke gustine negativne kontrole navedene u tabeli 2. kao kriterijum prihvatljivosti za negativnu kontrolu. Potrebno je dokumentirati da su tkiva obrađena negativnom kontrolom stabilna u kulturi (tj. daju slična mjerenja optičke gustine) za vrijeme trajanja izlaganja.

Tabela 2. Rasponi prihvatljivosti vrijednosti optičke gustine negativne kontrole za kontrolu kvaliteta šarži

	Donja granica prihvatljivosti	Gornja granica prihvatljivosti
EpiSkin™ (standardna metoda)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0

epiCS®	> 0,8	< 2,8

Funkcija barijere

Rožnati sloj sa svojim sastavom lipida trebao bi biti sposoban zaustaviti brzi prodor određenih citotoksičnih referentnih hemikalija (npr. SDS ili Triton X-100), procijenjeno na osnovu IC50 ili ET50 (tabela 3.). Subjekt koji je razvio model RhE ili njegov prodavac trebao bi pri dostavi tkiva krajnjem korisniku dokazati funkciju barijere svake šarže modela RhE koji se upotrebljava.

Morfologija

U izvođenju histološkog pregleda modela RhE mora se dokazati da je struktura slična višeslojnoj strukturi ljudske epiderme koja sadrži bazalni sloj, trnasti sloj, zrnati sloj i rožnati sloj te pokazuje profil lipida sličan profilu lipida ljudske epiderme. Subjekt koji je razvio model RhE ili njegov prodavac trebao bi pri dostavi tkiva krajnjem korisniku dostaviti histološko ispitivanje svake šarže modela RhE koji se upotrebljava kojim se dokazuje odgovarajuća morfologija tkiva.

Obnovljivost

Korisnici ispitnih metoda trebali bi dokazati obnovljivost ispitnih metoda tokom vremena primjenom pozitivnih i negativnih kontrola. Nadalje, ispitna metoda trebala bi se upotrebljavati samo ako subjekt koji je razvio model RhE ili dobavljač dostavi podatke kojima se dokazuje obnovljivost tokom vremena primjenom hemikalija koje djeluju korozivno i onih koje ne djeluju korozivno, npr. s listaa supstanci koje služe za dokazivanje osposobljenosti (tabela 1.). U slučaju upotrebe ispitne metode za dalje klasifikovanje trebalo bi dokazati i obnovljivost u pogledu potkategorija.

Kontrola kvaliteta (KK)

Model RhE trebao bi se upotrebljavati samo ako subjekt koji ga je razvio ili dobavljač dokaže da svaka šarža upotrijebljenog modela RhE ispunjava definisane kriterijume za odobrenje proizvoda, među kojima su najvažniji oni za vijabilnost, funkciju barijere i morfologiju. Ti se podaci trebaju dostaviti korisnicima ispitne metode tako da ih mogu uključiti u izvještaj o ispitivanju. Za pouzdano predviđanje prihvatljivi su isključivo rezultati dobijeni sa šaržama tkiva koje ispunjavaju kontrolu kvaliteta. Raspon prihvatljivosti (gornja i donja granica) za IC50 ili ET50 utvrđuje subjekt koji je razvio model RhE ili dobavljač tog modela. Rasponi prihvatljivosti za četiri validirana ispitna modela navedeni su u tabeli 3.

Tabela 3. Kriterijumi za kontrolu kvaliteta šarže

	Donja granica prihvatljivosti	Gornja granica prihvatljivosti
EpiSkin™ (standardna metoda) (18-satno tretiranje SDS-om) (33.)	IC50 = 1,0 mg/ml	IC50 = 3,0 mg/ml

EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (34.)	ET50 = 4,0 sati	ET50 = 8,7 sati
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35.)	ET50 = 4,0 sati	ET50 = 10,0 sati
epiCS® (1 % Triton X-100) (36.)	ET50 = 2,0 sati	ET50 = 7,0 sati

B.40.bis KOROZIVNO OŠTEĆENJE KOŽE IN VITRO: ISPITNA METODA NA MODELU REKONSTRUISANE LJUDSKE EPIDERME (RhE)

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 431 (2016.). Korozivno oštećenje kože odnosi se na izazivanje ireverzibilnog oštećenja kože koje se manifestuje kao vidljiva nekroza koja kroz epidermu prodire u dermu nakon primjene ispitivane hemikalije [kako je utvrđeno Globalno usklađenim sistemom klasifikacije i označivanja hemikalija (GHS) Ujedinjenih naroda (UN) i Uredbom (EZ) br. 1272/2008 o klasifikaciji, označavanju i pakovanja supstanci i smješa (CLP). Ova ažurirana ispitna metoda B.40.bis pruža in vitro postupak kojim se omogućava utvrđivanje nagrizajućih i nenagrizajućih supstanci i smješa u skladu s UN GHS-om i CLP-om. Omogućava i djelimično dalje klasifikovanje nagrizajućih supstanci.

Procjena potencijala hemikalija da uzrokuju korozivno oštećenje kože obično je uključivala upotrebu laboratorijskih životinja (ispitna metoda B.4., ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 404; izvorno donesena 1981. i revidirana 1992., 2002. i 2015.). Uz sadašnju ispitnu metodu B.40.bis validirane su i donesene još dvije ispitne metode in vitro za ispitivanje potencijala hemikalija da uzrokuju korozivno oštećenje kože – ispitna metoda B.40. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 430) i ispitna metoda B.65. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 435). Nadalje, donesena je ispitna metoda in vitro B.46. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 439) za ispitivanje potencijala korozivnog oštećenja kože. U Smjernicama OECD-a o integrisanim pristupima ispitivanju i procjeni (IATA) za nagrizanje i korozivno oštećenje kože opisano je nekoliko modula u kojima se grupišu izvori informacija i alati za analizu te se pružaju smjernice o i. načinu integrisanja i upotrebe postojećih podataka o ispitivanju i podataka koji se dobijaju bez ispitivanja za procjenu potencijala hemikalija da uzrokuju korozivno oštećenje i korozivno oštećenje kože te predlaganju pristupa kad je potrebno dalje ispitivanje.

Ova se ispitna metoda bavi konačnim efektom korozivnog oštećenja kože na zdravlje ljudi. U njoj se upotrebljava rekonstruisana ljudska epiderma (RhE) (dobijena iz ljudskih netransformisanih epidermalnih keratinocita) koja vjerno imitira histološka, morfološka, biohemijska i fiziološka svojstva gornjih slojeva ljudske kože, tj. epiderme. Odgovarajuća smjernica OECD-a za ispitivanje izvorno je donesena 2004. i ažurirana 2013. kako bi se uključile dodatne ispitne metode u kojima se upotrebljavaju modeli RhE-a i mogućnost upotrebe metoda koje podržavaju dalje klasifikovanje nagrizajućih hemikalija, a 2015. je ažurirana radi upućivanja na smjernice o IATA-i i uvođenja alternativnog postupka za mjerenje vijabilnosti.

Ova ispitna metoda obuhvata četiri validirana komercijalno dostupna modela RhE-a. Predvalidacione studije, nakon kojih je slijedila službena validaciona studija za procjenu

korozivnog oštećenja kože sprovedene su za dva ta komercijalno dostupna ispitna modela – standardni model EpiSkin™ i test korozivnog oštećenja kože EpiDerm™ (EPI-200) (dalje u tekstu „Validirane referentne metode – VRM-ovi"). Ishod tih studija doveo je do preporuke da bi se dvije prethodno navedene validirane referentne metode mogle upotrebljavati u regulatorne svrhe za razlikovanje nagrizajućih supstanci (C) od nenagrizajućih supstanci (NC) i da bi se EpiSkin™ osim toga mogao upotrebljavati za dalje klasifikovanje nagrizajućih supstanci. Druga dva komercijalno dostupna ispitna modela RhE za utvrđivanje korozivnog oštećenja kože in vitro pokazala su rezultate slične validiranoj referentnoj metodi EpiDerm™ u skladu s validacijom na osnovu zahtjeva izvođenja. To su SkinEthic™ RHE i epiCS® (prethodni naziv EST-1000) te se i oni mogu upotrebljavati u regulatorne svrhe za razlikovanje nagrizajućih supstanci od nenagrizajućih supstanci. Postvalidacionim studijama koje su sproveli proizvođači modela RhE od 2012. do 2014. s poboljšanim protokolom u kojem su ispravljene interferencije neodređene redukcije MTT-a koje uzrokuju ispitivane hemikalije poboljšana je efikasnost razlikovanja nagrizajućih i nenagrizajućih supstanci, ali i daljeg klasifikacije nagrizajućih supstanci. Sprovedene su dalje statističke analize postvalidacionih podataka s modelima EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE i EpiCS® kako bi se identifikovali alternativni modeli predviđanja koji poboljšavaju prediktivnu sposobnost daljeg klasifikacije.

Prije nego što se predložena slična ili izmijenjena ispitna metoda RhE in vitro za korozivno oštećenje kože, koja nije validirana referentna metoda, može upotrijebiti u regulatorne svrhe, trebalo bi utvrditi njenu pouzdanost, relevantnost (tačnost) i ograničenja za njenu predloženu upotrebu kako bi se obezbijedila njena sličnost s validovanom referentnom metodom, u skladu sa zahtjevima izvođenja utvrđenima u skladu s načelima Smjernice OECD-a br. 34. Uzajamno prihvatanje podataka garantovaće će se samo nakon što se svaka predložena nova ili ažurirana ispitna metoda koja je u skladu sa zahtjevima izvođenja pregleda i uključi u odgovarajuću smjernicu za ispitivanje. Ispitni modeli uključeni u tu smjernicu za ispitivanje mogu se upotrijebiti za ispunjavanje zahtjeva zemalja u pogledu rezultata ispitivanja ispitne metode in vitro za korozivno oštećenje kože, uz ostvarivanje koristi od uzajamnog prihvatanja podataka.

POČETNA RAZMATRANJA

Ova ispitna metoda omogućava utvrđivanje nagrizajućih i nenagrizajućih supstanci i smješa u skladu s UN GHS-om i CLP-om. Ovom se ispitnom metodom podržava dalje klasifikovanje nagrizajućih supstanci i smješa na neobaveznu potkategoriju 1.A, u skladu s UN GHS-om, te kombinaciju potkategorija 1.B i 1.C. Ograničenje je ove metode to što ne omogućava razlikovanje potkategorije 1.B i potkategorije 1.C s korozivnim djelovanjem na kožu u skladu s UN GHS-om i CLP-om zbog ograničenog skupa poznatih hemikalija iz potkategorije 1.C s nagrizajućim djelovanjem in vivo. Ispitnim modelima EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE i epiCS® mogu se odrediti dalje potkategorije (tj. 1.A naspram 1.B i 1.C naspram NC).

Širok raspon hemikalija, koje uglavnom čine pojedinačne supstance, ispitan je u validaciji kojom se podržavaju ispitni modeli uključeni u ovu ispitnu metodu kada se upotrebljavaju za utvrđivanje nagrizajućih i nenagrizajućih hemikalija; empirijska baza podataka validacione studije uključivala je 60 hemikalija koje su obuhvatale širok raspon hemijskih klasaa. Subjekti koji su razvili ispitnu metodu sproveli su ispitivanje radi dokazivanja osjetljivosti, specifičnosti, tačnosti i obnovljivosti unutar laboratorija testa za dalje klasifikovanje, a rezultate je pregledao OECD. Na osnovu svih podataka koji su dostupni, ispitna metoda primjenjiva je na širok raspon hemijskih klasaa i agregatnih stanja, uključujući tečnosti, polučvrste i čvrste supstanci te voskove. Tečnosti mogu biti vodene i bezvodne; čvrste supstance mogu biti rastvorive ili

nerastvorive u vodi. Čvrste supstance prije primjene treba samljeti u sitni prah kad je god moguće; nije potrebno nikakvo drugo prethodno tretiranje uzorka. U slučajevima u kojima se može dokazati da se ispitni modeli uključeni u ispitnu metodu ne mogu primijeniti za ispitivanje specifične kategorije ispitivanih hemikalija, te modele ne bi trebalo upotrebljavati za tu specifičnu kategoriju ispitivanih hemikalija. Osim toga, pretpostavlja se da se ova ispitna metoda može primijeniti na smješe kao proširenje njene primjenjivosti na supstanci. Međutim, budući da smješe obuhvataju široki spektar kategorija i sastava te da su dostupne samo ograničene informacije o ispitivanju smješa, u slučajevima u kojima se može dokazati da se ispitna metoda ne može primijeniti za ispitivanje specifične kategorije smješa, ispitnu metodu ne bi trebalo upotrebljavati za tu specifičnu kategoriju smješa. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smješi radi dobijanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smješe. Gasovi i aerosoli još nisu ocijenjeni u validacionim studijama. Iako je moguće da se oni mogu ispitati upotrebom tehnologije RhE, ispitnom metodom nije omogućeno ispitivanje gasova i aerosola.

Ispitivane hemikalije koje apsorbuju svjetlost u istom rasponu kao i MTT formazan i ispitivane hemikalije koje mogu direktno redukovati vitalnu boju MTT (na MTT formazan) mogu ometati mjerenje vijabilnosti tkiva te se kod njih trebaju upotrebljavati prilagođene kontrole za ispravke. Vrsta prilagođenih kontrola koja može biti potrebna mijenja će se u zavisnosti o vrsti interferencije koju proizvodi ispitivana hemikalija i postupku koji se upotrebljava za mjerenje MTT formazana.

Iako se ovom ispitnom metodom ne dobijaju primjerene informacije o korozivnom oštećenju kože, trebalo bi napomenuti da se ispitna metoda B.46. posebno bavi efektom nadraženosti kože na zdravlje in vitro i bazira se na istom ispitnom sistemu RhE uz upotrebu drugog protokola. Za potpunu evaluaciju lokalnih efekata na kožu nakon jednostrukog dermalnog izlaganja potrebno je proučiti Smjernice OECD-a o integrisanim pristupima ispitivanju i procjeni. Taj pristup IATA obuhvata ssprovođenje in vitro ispitivanja za dokazivanje korozivnog (kako je opisano u ovoj ispitnoj metodi) i nadražujućeg djelovanja na kožu prije eventualnog ssprovođenja ispitivanja na živim životinjama. Podrazumijeva se da upotreba ljudske kože podliježe nacionalnim i međunarodnim etičkim pitanjima i uslovima.

NAČELO ISPITIVANJA

Ispitivana se hemikalija lokalno nanosi na trodimenzionalni model RhE, koji čine netransformisani ljudski epidermalni keratinociti uzgojeni u svrhu dobijanja višeslojnog, visoko izdiferenciranog modela ljudske epiderme. Sastoji se od organiziranih bazalnih, trnastih i zrnatih slojeva te višeslojnog rožnatog sloja (stratum corneum) koji između ćelija sadrži lamelarne masne slojeve koji predstavljaju glavne klase lipida analogne onima koji se susreću in vivo.

Ispitna metoda RhE bazira se na pretpostavci da korozivno hemikalije mogu penetrirati kroz stratum corneum putem difuzije ili erozije te su citotoksične za ćelije ispod tog sloja. Vijabilnost ćelija mjeri se enzimskom konverzijom vitalne boje MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli bromid, tiazolil plavo tetrazolij bromid; CAS broj 298-93-1] u so plavog formazana koja se kvantitativno mjeri nakon ekstrakcije iz tkiva. Korozivno hemikalije prepoznaju se po tome što smanjuju vijabilnost ćelija ispod definisanih pragova. Pokazalo se da se ispitnom metodom za utvrđivanje korozivnog oštećenja kože koja se bazira na modelu RhE može

predvidjeti korozivno djelovanje na kožu in vivo koje je procijenjeno kod zečeva u skladu s ispitnom metodom B.4.

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

Prije rutinske primjene bilo kojeg od četiri validovanih ispitnih modela RhE koji su u skladu s ovom ispitnom metodom laboratorija bi trebala dokazati tehničku osposobljenost pravilnim utvrđivanjem kategorije dvanaest supstanci koje služe za dokazivanje osposobljenosti koje su navedene u tabeli 1. U slučaju upotrebe metode za dalje klasifikovanje trebalo bi dokazati i pravilno dalje klasifikovanje. U slučajevima u kojima nije dostupna navedena supstanca ili ako je to opravdano, može se upotrijebiti druga supstanca za koju su dostupni primjereni referentni in vivo i in vitro podaci (npr. s listaa referentnih hemikalija pod uslovom da se primjenjuju isti kriterijumi za izbor kao oni opisani u tabeli 1.

Tabela 1. **Lista supstanci koje služe za dokazivanje osposobljenosti**

Supstanca	**CAS br.**	**Hemijski klasa**	**Kat. sistemaUN GHS-a ili CLP-a na osnovu *in vivo* rezultata**	**Kat. VRM-a na osnovu *in vitro* rezultata**	**Redukcija MTT-a**	**Agregatno stanje**
Supstance koje djeluju nagrizajuće *in vivo* iz potkategorije 1.A						
Bromsirćetna kiselina	79-08-3	Organska kiselina	1.A	(3) 1.A	—	S
Borov trifluorid dihidrat	13319-75-0	neorganska kiselina	1.A	(3) 1.A	—	L
Fenol	108-95-2	Fenol	1.A	(3) 1.A	—	S
Dihloracetil hlorid	79-36-7	Elektrofil	1.A	(3) 1.A	—	L
Kombinacija supstanci koje djeluju nagrizajuće *in vivo* iz potkategorija 1.B i 1.C						
Monohidrat glioksilne kiseline	563-96-2	Organska kiselina	1.B i 1.C	(3) 1.B i 1.C	—	S

Mliječna kiselina	598-82-3	Organska kiselina	1.B i 1.C	(3) 1.B i 1.C	—	L
Etanolamin	141-43-5	Organska baza	1.B	(3) 1.B i 1.C	Y	Viskozno
hlorovodonična kiselina (14,4 %)	7647-01-0	Neorganska kiselina	1.B i 1.C	(3) 1.B i 1.C	—	L
Supstance koje ne djeluju nagrizajuće *in vivo*						
Fenetil bromid	103-63-9	Elektrofil	NC	(3) NC	Y	L
4-amino-1,2,4-triazol	584-13-4	Organska baza	NC	(3) NC	—	S
4-(metiltio)-benzaldehid	3446-89-7	Elektrofil	NC	(3) NC	Y	L
Laurinska kiselina	143-07-7	Organska kiselina	NC	(3) NC	—	S

U okviru dokazivanja osposobljenosti preporučuje se da korisnik po primitku provjeri svojstva barijere tkiva u skladu sa specifikacijama proizvođača modela RhE. To je posebno važno ako se tkiva šalju na velike udaljenosti/tokom dugih vremenskih perioda. Nakon što se metoda uspješno uspostavi i nakon što se dokaže osposobljenost u pogledu njene upotrebe, takva rutinska provjera neće biti potrebna. Međutim, kod rutinske upotrebe ispitne metode preporučuje se dalje ocjenjivanje svojstava barijere u pravilnim vremenskim intervalima.

POSTUPAK

U nastavku se nalazi opšti opis elemenata i postupaka u vezi s metodom na osnovu rekonstruisane ljudske epiderme za potrebe ocjenjivanja korozivnog oštećenja kože obuhvaćenih ovom ispitnom metodom. Modeli RhE koji su podržani kao naučno valjani za upotrebu u ovoj ispitnoj metodi, tj. modeli EpiSkin™ (standardni model), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE i epiCS® mogu se nabaviti iz komercijalnih izvora. Dostupni su standardni operativni postupci za ta četiri modela RhE, a glavni elementi ispitne metode sažeti su u Dodatku 2. Preporučuje se da se pri sprovođenju i upotrebi jednog od tih modela u laboratoriju prouči relevantni standardni operativni postupak. Ispitivanje s četiri ispitna modela RhE obuhvaćena ovom ispitnom metodom trebalo bi biti u skladu sa sljedećim:

ELEMENTI ISPITNE METODE RHE

Opšti uslovi

Za rekonstruisanje epitela treba koristiti netransformisane ljudske keratinocite. Ispod funkcionalnog rožnatog sloja (stratum corneum) nalaze se višestruki slojevi vijabilnih epitelnih ćelija (bazalni sloj, trnasti sloj, zrnati sloj). I sam rožnati sloj višeslojan je te sadrži esencijalni profil lipida kao čvrstu funkcionalnu barijeru koja je sposobna zaustaviti brzi prodor citotoksičnih referentnih hemikalija, npr. natrijum dodecil-sulfat (SDS) ili Triton X-100. Funkciju barijere trebalo bi dokazati i može se ocijeniti određivanjem koncentracije pri kojoj referentna hemikalija smanjuje vijabilnost tkiva za 50 % (IC50) nakon fiksnog vremena izlaganja ili određivanjem vremena izlaganja koje je potrebno da se vijabilnost ćelija smanji za 50 % (ET50) nakon primjene referentne hemikalije u unaprijed određenoj fiksnoj koncentraciji. Model RhE mora biti dovoljno nepropustan da spriječi prolazak materijala oko rožnatog sloja do vijabilnog tkiva jer bi to dovelo do lošeg modeliranja izlaganja kože. Model RhE ne smije biti zagađen bakterijama, virusima, mikoplazmama ili gljivicama.

Funkcionalni uslovi

Vijabilnost

Za kvantifikaciju vijabilnosti tkiva upotrebljava se MTT test (27.). Vijabilne ćelije modela tkiva RhE redukuju vitalnu boju MTT u talog plavog MTT formazana koji se zatim ekstrahuje iz tkiva izopropanolom (ili sličnim rastvaračem). Optička gustina (OD) samog ekstrakcionog rastvarači treba biti dovoljno mala tj. OD < 0,1. Ekstrahujeni MTT formazan može se kvantifikovati upotrebom mjerenja standardne apsorbancije (OD) ili postupkom HPLC/UPLC spektrofotometrije (38.). Korisnici modela RhE trebali bi osigurati da svaka šarža modela RhE koji se upotrebljava ispunjava utvrđene kriterijume za negativnu kontrolu. Raspon prihvatljivosti (gornja i donja granica) za vrijednosti optičke gustine negativne kontrole trebao bi utvrditi subjekt koji je razvio model RhE ili dobavljač tog modela. Rasponi prihvatljivosti za vrijednosti optičke gustine negativne kontrole za četiri validirana ispitna modela RhE uključena u ovu ispitnu metodu navedeni su u tabeli 2. Korisnik HPLC/UPLC spektrofotometrije trebao bi upotrebljavati raspone optičke gustine negativne kontrole navedene u tabeli 2. kao kriterij prihvatljivosti za negativnu kontrolu. Potrebno je dokumentirati da su tkiva obrađena negativnom kontrolom stabilna u kulturi (tj. daju slična mjerenja optičke gustine) za vrijeme trajanja izlaganja.

Tabela 2. **Rasponi prihvatljivosti vrijednosti optičke gustine negativne kontrole za kontrolu kvaliteta šarži**

	Donja granica prihvatljivosti	**Gornja granica prihvatljivosti**
EpiSkin™ (standardna metoda)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0

epiCS®	> 0,8	< 2,8

Funkcija barijere

Rožnati sloj sa svojim sastavom lipida trebao bi biti sposoban zaustaviti brzi prodor određenih citotoksičnih referentnih hemikalija (npr. SDS ili Triton X-100), procijenjeno na osnovu IC50 ili ET50 (tabela 3.). Subjekt koji je razvio model RhE ili njegov prodavatelj trebao bi pri dostavi tkiva krajnjem korisniku dokazati funkciju barijere svake šarže modela RhE koji se upotrebljava (vidjeti stav 21.).

Morfologija

U izvedbi histološkog pregleda modela RhE mora se dokazati da je struktura slična višeslojnoj strukturi ljudske epiderme koja sadrži bazalni sloj, trnasti sloj, zrnati sloj i rožnati sloj te pokazuje profil lipida sličan profilu lipida ljudske epiderme. Subjekt koji je razvio model RhE ili njegov prodavatelj trebao bi pri dostavi tkiva krajnjem korisniku dostaviti histološko ispitivanje svake šarže modela RhE koji se upotrebljava kojim se dokazuje odgovarajuća morfologija tkiva (vidjeti stav 21.).

Obnovljivost

Korisnici ispitnih metoda trebali bi dokazati obnovljivost ispitnih metoda tokom vremena primjenom pozitivnih i negativnih kontrola. Nadalje, ispitna metoda trebala bi se upotrebljavati samo ako subjekt koji je razvio model RhE ili dobavljač dostavi podatke kojima se dokazuje obnovljivost tokom vremena primjenom hemikalija koje djeluju korozivno i onih koje ne djeluju korozivno, npr. s listaa supstanci koje služe za dokazivanje osposobljenosti (tabela 1.). U slučaju upotrebe ispitne metode za dalje klasifikovanje trebalo bi dokazati i obnovljivost u pogledu potkategorija.

Kontrola kvaliteta (KK)

Model RhE trebao bi se upotrebljavati samo ako subjekt koji ga je razvio ili dobavljač dokaže da svaka šarža upotrijebljenog modela RhE ispunjava definisane kriterijume za odobrenje proizvoda, među kojima su najvažniji oni za vijabilnost, funkciju barijere i morfologiju. Ti se podaci trebaju dostaviti korisnicima ispitne metode tako da ih mogu uključiti u izvještaj o ispitivanju. Za pouzdano predviđanje korozivnog klasifikacije prihvatljivi su isključivo rezultati dobijeni sa šaržama tkiva koje ispunjavaju kontrolu kvaliteta. Raspon prihvatljivosti (gornja i donja granica) za IC50 ili ET50 utvrđuje subjekt koji je razvio model RhE ili dobavljač tog modela. Rasponi prihvatljivosti za četiri validirana ispitna modela navedeni su u tabeli 3.

Tabela 3.**Kriterijumi za kontrolu kvaliteta šarže**

	Donja granica prihvatljivosti	**Gornja granica prihvatljivosti**

EpiSkin™ (standardna metoda) (18-satno tretiranje SDS-om) (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 sati	ET50 = 8,7 sati
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35.)	ET50 = 4,0 sati	ET50 = 10,0 sati
epiCS® (1 % Triton X-100) (36.)	ET50 = 2,0 sati	ET50 = 7,0 sati

Primjena ispitivane hemikalije i kontrolnih hemikalija

Za svaku ispitnu hemikaliju i kontrole trebala bi se upotrijebiti barem dva ponovljena tkiva za svako vrijeme izlaganja. I kod tečnosti i hemikalija u čvrstom stanju treba primijeniti dovoljnu količinu ispitivane hemikalije kako bi se ravnodnosno pokrila površina epiderme tako da se izbjegne beskonačna doza, tj. trebalo bi upotrijebiti najmanje 70 µl/cm2 ili 30 mg/cm2 hemikalije. U zavisnosti o modelima, površinu epiderme trebalo bi navlažiti deioniziranom ili destiliranom vodom prije primjene hemikalija u čvrstom stanju kako bi se poboljšao kontakt ispitivane hemikalije s površinom epiderme (34., 35., 36. i 37.). Kad je god moguće, hemikalije u čvrstom stanju treba ispitivati u obliku sitnog praha. Metodu primjene treba prilagoditi ispitivanoj hemikaliji (vidjeti npr. upućivanja (34.–37.). Na kraju perioda izlaganja ispitivanu hemikaliju treba pažljivo oprati s epiderme vodenom puferskom rastvorom ili 0,9-postotnom NaCl. U zavisnosti o tome koji se od četiri validirana ispitna modela RhE upotrebljava, upotrebljavaju se dva ili tri perioda izlaganja po ispitivanoj hemikaliji (za sva četiri valjana modela RhE: 3 min. i 1 sat; za EpiSkin™ dodatno vrijeme izlaganja od četiri sata). U zavisnosti o tome koji se ispitni model RhE upotrebljava i razdoblju izlaganja koje se procjenjuje, temperatura inkubacije tokom izlaganja može varirati od sobne temperature do 37 °C.

U svakom bi se ciklusu trebale upotrebljavati istovremene negativne i pozitivne kontrole kako bi se dokazalo da su vijabilnost (s negativnim kontrolama), funkcija barijere i posljedična osjetljivost tkiva (s pozitivnim kontrolama) unutar prihvatljivog raspona utvrđenog na osnovu rezultata proslih ispitivanja. Kao hemikalija pozitivne kontrole predlaže se ledena sirćetna kiselina ili 8N KOH, u zavisnosti o modelu RhE koji se upotrebljava. Trebalo bi napomenuti da 8N KOH direktno redukuje MTT pa će možda biti potrebne prilagođene kontrole. Kao negativna kontrolna supstanca predlaže se 0,9-postotna NaCl (w/v) ili voda.

Mjerenja vijabilnosti ćelija

MTT test je kvantitativni test koji bi se trebao upotrebljavati za mjerenje vijabilnosti ćelija na osnovu ove ispitne metode. Uzorak tkiva stavlja se u rastvor MTT odgovarajuće koncentracije (0,3 ili 1 mg/ml) i ostavi u njoj tri sata. Nataloženi plavi formazan zatim se ekstrahuje iz tkiva s pomoću rastvarači (npr. izopropanol, kiseli izopropanol) i koncentracija formazana mjeri se određivanjem vrijednosti OD na 570 nm uz pojas propuštanja do najviše ±30 nm ili postupkom HPLC/UPLC spektrofotometrije.

Ispitivane hemikalije mogu ometati MTT test direktnom redukcijom MTT-a u plavi formazan i/ili interferencijom s bojom ako ispitivana hemikalija apsorbira, prirodno ili zbog postupaka tretiranja, u istom rasponu optičke gustine formazana (570 ± 30 nm, uglavnom plave i ljubičaste hemikalije). Treba upotrijebiti dodatne kontrole kako bi se utvrdila i ispravila moguća interferencija do koje dovode te ispitivane hemikalije, kao što su kontrola nespecifične redukcije MTT-a (NSMTT) i kontrola nespecifične boje (NSC). To je naročito važno kada se određena ispitivana hemikalija ne ispere u potpunosti s tkiva ili prodre u epidermu te je stoga prisutna u tkivima pri provođenju MTT testa vijabilnosti. Detaljan opis načina na koji se ispravljaju direktna redukcija MTT-a i interferencija bojila dostupan je u standardnim operativnim pokolonama za ispitne modele.

Kako bi se identifikovale supstanci koje direktno redukuju MTT, svaku bi ispitivanu hemikaliju trebalo dodati u svježe pripremljeni medij MTT. Ako smješa MTT-a koja sadrži ispitivanu hemikaliju postane plava/ljubičasta, pretpostavlja se da ispitivana hemikalija direktno redukuje MTT i treba se sprovesti dalja funkcionalna provjera nevijabilne epiderme, neu zavisnosti o upotrebi mjerenja standardne apsorbancije (OD) ili postupka HPLC/UPLC spektrofotometrije. U toj dodatnoj funkcionalnoj provjeri upotrebljavaju se mrtva tkiva kod kojih je prisutna samo preostala metabolička aktivnost, ali koja apsorbuju sličnu količinu ispitivane hemikalije kao vijabilna tkiva. Svaka hemikalija koja redukuje MTT primjenjuje se na barem dva ponovljena mrtva tkiva po vremenu izlaganja, koja se podvrgavaju cijelom ispitivanju korozivnog oštećenja kože. Prava vijabilnost tkiva zatim se računa kao postotak vijabilnosti tkiva koji se dobija iz živih tkiva izloženih supstanci koja redukuje MTT umanjenom za postotak nespecifične redukcije MTT-a dobijene s mrtvim tkivima izloženima istoj supstanci koja redukuje MTT, izračunano u odnosu na negativnu kontrolu koja se sprovodi istovremeno kad i ispitivanje koje se ispravlja (%NSMTT).

Kako bi se identificirala potencijalna interferencija obojenih ispitivanih hemikalija ili ispitivanih hemikalija koje se oboje u dodiru s vodom ili izopropanolom te kako bi se odlučilo jesu li potrebne dodatne kontrole, trebalo bi sprovesti spektralnu analizu ispitivane hemikalije u vodi (životna sredina tokom izlaganja) i/ili izopropanolu (rastvora za ekstrahujenje). Ako ispitivana hemikalija u vodi i/ili izopropanolu apsorbira svjetlost u rasponu od 570 ± 30 nm, trebalo bi sprovesti dalje kontrole bojila ili bi, kao alternativu, trebalo primijeniti postupak HPLC/UPLC spektrofotometrije; u poslednjem slučaju te kontrole nisu potrebne. Pri sprovođeju l mjerenja standardne apsorbancije (OD) svaka interferirajuća obojena ispitivana hemikalija primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka vijabilnog tkiva po vremenu izlaganja, koji se podvrgavaju cijelom ispitivanju korozivnog oštećenja kože, ali se u koraku inkubacije MTT-a inkubiraju medijem, a ne rastvorom MTT-a, kako bi nastala kontrola nespecifične boje (NSCliving). Kontrolu NSCliving treba sprovoditi istovremeno po vremenu izlaganja po obojenoj ispitivanoj hemikaliji (u svakom ciklusu) zbog svojstvene biološke varijabilnosti živih tkiva. Prava vijabilnost tkiva zatim se računa kao postotak vijabilnosti tkiva koji se dobija iz živih tkiva izloženih interferirajućoj ispitivanoj hemikaliji i inkubiranih rastvorom MTT-a, umanjeno za postotak nespecifične boje dobijen sa živim tkivima izloženima interferirajućoj ispitivanoj hemikaliji i inkubiranima medijem bez MTT-a, što se sprovodi istovremeno kad i ispitivanje koje se ispravlja (%NSCliving).

Za ispitivane hemikalije za koje se utvrdi da uzrokuju i direktnu redukciju MTT-a i interferenciju s bojom pri mjerenju standardne apsorbancije (OD) bit će potreban i treći skup kontrola, uz kontrole NSMTT i NSCliving. To je obično slučaj kod tamno obojenih ispitivanih hemikalija koje ometaju MTT test (npr. plave, ljubičaste ili crne hemikalije) jer njihova intrinzična boja sprečava

procjenu njihove sposobnosti da direktno redukuju MTT. Te se ispitivane hemikalije mogu vezati i na živa i na mrtva tkiva te se stoga kontrolom NSMTT može ispraviti ne samo potencijalna direktna redukcija MTT-a ispitivanom hemikalijom, već i interferencija s bojom koja je posljedica vezanja ispitivane hemikalije na mrtva tkiva. To bi moglo dovesti do dvostrukog ispravka za interferenciju s bojom jer se kontrolom NSCliving već ispravlja interferencija s bojom koja je posljedica vezanja ispitivane hemikalije na živa tkiva. Kako bi se izbjegao mogući dvostruki ispravak za interferenciju s bojom, treba sprovesti treću kontrolu za nespecifičnu boju u mrtvim tkivima (NSCkilled). U toj dodatnoj kontroli ispitivana hemikalija primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka mrtvog tkiva po vremenu izlaganja, koja se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja, ali se u koraku inkubacije MTT-a inkubiraju medijem, a ne rastvorom MTT-a. Dovoljna je jedna kontrola NSCkilled po ispitivanoj hemikaliji neu zavisnosti o broju provedenih nezavisnih ispitivanja/ciklusa, ali treba je sprovoditi istovremeno s kontrolom NSMTT i, ako je moguće, s istom šaržom tkiva. Prava vijabilnost tkiva zatim se računa kao postotak vijabilnosti tkiva koji se dobija iz živih tkiva izloženih ispitivanoj hemikaliji umanjeno za %NSMTT i %NSCliving te uvećano za postotak nespecifične boje dobijen s mrtvim tkivima izloženima interferirajućoj ispitivanoj hemikaliji i inkubiranima medijem bez MTT-a, izračunano u odnosu na negativnu kontrolu koja se sprovodi istovremeno kad i ispitivanje koje se ispravlja (%NSCkilled).

Važno je napomenuti da nespecifična redukcija MTT-a i nespecifična interferencija s bojom mogu povećati očitanja ekstrakta tkiva izvan raspona linearnosti spektrofotometra. Na osnovu toga svaki bi laboratorij prije početka ispitivanja ispitivanih hemikalija u regulatorne svrhe trebao utvrditi raspon linearnosti svojeg spektrofotometra s MTT formazanom (CAS # 57360-69-7) iz komercijalnog izvora. Tačnije, mjerenje standardne apsorbancije (OD) upotrebom spektrofotometra primjereno je za procjenu supstanci koje direktno redukuju MTT i ispitivanih hemikalija koje interferiraju s bojom ako je optička gustina ektrakata tkiva dobijena ispitivanom hemikalijom bez ikakvih ispravaka za direktnu redukciju MTT-a i/ili interferenciju s bojom unutar linearnog raspona spektrofotometra ili ako je neispravljenim postotkom vijabilnosti dobijenim ispitivanom hemikalijom ona već utvrđena kao nagrizajuća. Ipak, rezultate za ispitivane hemikalije koji daju %NSMTT i/ili %NSCliVing > 50 % negativne kontrole trebalo bi oprezno tumačiti.

Kod obojenih ispitivanih hemikalija koje nisu kompatibilne s mjerenjem standardne apsorbancije (OD) zbog prejake interferencije s MTT testom, za mjerenje MTT formazana može se upotrijebiti alternativni postupak HPLC/UPLC spektrofotometrije. Sistem HPLC/UPLC spektrofotometrije omogućava izdvajanje MTT formazana iz ispitivane hemikalije prije njegove kvantifikacije (38.). Zato pri upotrebi HPLC/UPLC spektrofotometrije nikad nisu potrebne kontrole NSCliVing ili NSCkilled, neu zavisnosti o hemikaliji koja se ispituje. Kontrole NSMTT ipak bi se trebale upotrijebiti ako se sumnja u to da ispitivana hemikalija direktno redukuje MTT ili ima boju koja sprečava procjenu sposobnosti direktne redukcije MTT-a. Ako se za mjerenje MTT formazana upotrebljava HPLC/UPLC spektrofotometrija, postotak vijabilnosti tkiva računa se kao postotak površine pika MTT formazana dobijen sa živim tkivima izloženima ispitivanoj hemikaliji u odnosu na pik MTT formazana dobijen s istovremenom negativnom kontrolom. Za ispitivane hemikalije koje mogu direktno redukovati MTT prava vijabilnost tkiva računa se kao postotak vijabilnosti tkiva dobijen sa živim tkivima izloženima ispitivanoj hemikaliji umanjen za %NSMTT. Naposljetku, treba napomenuti da se ne mogu procijeniti supstanci koje direktno redukuju MTT i koje ujedno mogu i interferirati s bojom, koje se zadržavaju u tkivima nakon tretiranja i redukuju MTT toliko jako da dovode do optičke gustine (upotrebom standardnog mjerenja optičke gustine) ili površina pika (upotrebom UPLC/HPLC spektrofotometrije)

ispitivanih ekstrakata tkiva koji su izvan raspona linearnosti spektrofotometra, iako do toga dolazi samo u isključivo rijetkim slučajevima.

HPLC/UPLC spektrofotometrija može se upotrebljavati i sa svim vrstama ispitivanih hemikalija (obojenima, neobojenima, koje redukuju MTT i koje ga ne redukuju) za mjerenje MTT formazana (38.). Zbog raznolikosti sistema HPLC/UPLC spektrofotometrije, kvalifikaciju sistema HPLC/UPLC spektrofotometrije trebalo bi dokazati prije njegove upotrebe za kvantificiranje MTT formazana iz ekstrakata tkiva tako da sistem ispuni kriterijume prihvatljivosti za skup standardnih parametara kvalifikacije u skladu s parametrima opisanima u smjernicama američke Uprave za hranu i lijekove o validaciji bioanalitičkih metoda namijenjenih industriji (38. i 39.). Ti ključni parametri i njihovi kriterijumi prihvatljivosti prikazani su u Dodatku 4. Kad se ispune kriterijumi prihvatljivosti definisani u Dodatku 4., smatra se da je sistem HPLC/UPLC spektrofotometrije kvalifikovan i spreman za mjerenje MTT formazana u eksperimentnim uslovima opisanima u ovoj ispitnoj metodi.

Kriterijumi prihvatljivosti

Za svaku ispitnu metodu u kojoj se upotrebljavaju valjani modeli RhE, tkiva tretirana negativnom kontrolom trebala bi pokazivati optičku gustinu koja odražava kvalitetu tkiva, kako je opisano u tabeli 2., i ne bi trebala biti ispod prethodno utvrđenih granica. Tkiva tretirana pozitivnom kontrolom, tj. ledenom octenom kiselinom ili 8N KOH, trebala bi odražavati sposobnost tkiva da odgovore na nagrizajuću hemikaliju u uslovima ispitnog modela (vidjeti Dodatak 2.). Varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva ispitivane hemikalije i/ili kontrolnih hemikalija trebala bi biti unutar prihvaćenih ograničenja za svaki zahtjev valjanog modela RhE (vidjeti Dodatak 2.) (npr. razlika u vijabilnosti između sva ponovljena uzorka tkiva ne bi trebala biti veća od 30 %). Ako negativna ili pozitivna kontrola uključena u ciklus bude izvan prihvaćenih raspona, smatra se da ciklus ne ispunjava zahtjeve i treba ga ponoviti. Ako je varijabilnost ispitivanih hemikalija izvan definisanih raspona, trebalo bi ponoviti ispitivanje.

Tumačenje rezultata i model predviđanja

Vrijednosti optičke gustine za svaku ispitivanu hemikaliju trebalo bi koristiti za izračun postotka vijabilnosti u odnosu na negativnu kontrolu, koja je određena kao 100 %. U slučaju upotrebe HPLC/UPLC spektrofotometrije postotak vijabilnosti tkiva računa se kao postotak površine pika MTT formazana dobijen sa živim tkivima izloženima ispitivanoj hemikaliji u odnosu na pik MTT formazana dobijen s istovremenom negativnom kontrolom. Granične vrijednosti vijabilnosti ćelija, izražene postotkom, koje služe za razlikovanje nagrizajućih od nenagrizajućih ispitivanih hemikalija (ili za razlikovanje različitih potkategorija korozivnog djelovanjaza svaki ispitni model obuhvaćen ovom ispitnom metodom i trebale bi se upotrebljavati za tumačenje rezultata.

Jedan ciklus ispitivanja koji obuhvata najmanje dva ponovljena uzorka tkiva trebao bi biti dovoljan za ispitivanu hemikaliju ako je dobijeno klasifikovanje nedvosmisleno. Međutim, u slučajevima graničnih rezultata, kao što su neusklađena ponovljena mjerenja, može se razmotriti drugi ciklus, a i treći ciklus u slučaju neusklađenih rezultata između prva dva ciklusa.

Model predviđanja za ispitni model EpiSkin™ za ispitivanje korozivnog oštećenja kože (9., 34. i 22.), povezan sa sistemom klasifikacije UN GHS-om ili CLP-om, prikazan je u tabeli 4.

Tabela 4. Model predviđanja za EpiSkin™

Vijabilnost mjerena u tačkama vremena izlaganja (t = 3, 60 i 240 minuta)	Predviđanje koje treba razmotriti
< 35 % nakon 3 min. izlaganja	Korozivno: •Neobavezna potkategorija 1.A (*1)
≥ 35 % nakon 3 min. izlaganja I < 35 % nakon 60 min. izlaganja ILI ≥ 35 % nakon 60 min. izlaganja I < 35 % nakon 240 minuta izlaganja	Korozivno: •Kombinacija neobaveznih potkategorija 1.B i 1.C
≥ 35 % nakon 240 min. izlaganja	Nije korozivno

Modeli predviđanja za ispitne modele EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE i epiCS® za ispitivanje korozivnog oštećenja kože povezani sa sistemom klasifikacije UN GHS-om ili CLP-om prikazani su u tabeli 5.:

Tabela 5.EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE i epiCS®

Vijabilnost mjerena u tačkama vremena izlaganja (t = 3 i 60 minuta)	Predviđanje koje treba razmotriti
KORAK 1 za EpiDerm™ SCT, za SkinEthic™ RHE i epiCS®	
< 50 % nakon 3 min. izlaganja	Korozivno
≥ 50 % nakon 3 min. izlaganja I< 15 % nakon 60 min. izlaganja	Korozivno
≥ 50 % nakon 3 min. izlaganja I≥ 15 % nakon 60 min. izlaganja	Nije korozivno
KORAK 2 za EpiDerm™ SCT – za supstanci/smješe identifikovane kao korozivno u koraku 1	
< 25 % nakon 3 min. izlaganja	Neobavezna potkategorija 1.A*

≥ 25 % nakon 3 min. izlaganja	Kombinacija neobaveznih potkategorija 1.B i 1.C
KORAK 2 za SkinEthic™ RHE – za supstanci/smješe identifikovane kao korozivno u koraku 1	
< 18 % nakon 3 min. izlaganja	Neobavezna potkategorija 1.A*
≥ 18 % nakon 3 min. izlaganja	Kombinacija neobaveznih potkategorija 1.B i 1.C
KORAK 2 za epiCS® – za supstanci/smješe identifikovane kao korozivno u koraku 1	
< 15 % nakon 3 min. izlaganja	Neobavezna potkategorija 1.A*
≥ 15 % nakon 3 min. izlaganja	Kombinacija neobaveznih potkategorija 1.B i 1.C

PODACI I IZVJEŠTAVANJE

Podaci

Podatke pojedinačnih ponavljanja uzoraka tkiva u svakom ispitivanju (npr. vrijednosti OD i izračunati postotak vijabilnosti ćelija za svaku ispitivanu hemikaliju, zajedno s klasifikovanjem) treba prikazati u tabličnom obliku, uključujući eventualne podatke iz ponovljenih eksperimenta. Osim toga, treba navesti srednje vrijednosti i raspone vijabilnosti te koeficijente varijacije između ponovljenih uzoraka tkiva za svako ispitivanje. Za svaku ispitanu hemikaliju treba navesti zapažene interakcije supstanci koje redukuju MTT ili obojenih ispitivanih hemikalija s MTT reagensom.

Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju trebalo bi sadržiti sljedeće informacije:

Ispitivana hemikalija i kontrolne hemikalije:

- Supstanca s jednim sastojkom: hemijske identifikacione oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.,
- supstanca s više sastojaka, UVCB supstanca i smješa: opis (koliko je to moguće) hemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizičko-hemijskih svojstava sastojaka,
- fizički izgled, rastvorljivost u vodi i bilo koja druga relevantna fizičko-hemijska svojstva,
- izvor, broj serije, ako su dostupni,
- tretiranje ispitivanih hemikalija/kontrolne supstance prije ispitivanja, ako je primjenljivo (npr. grijanje, mljevenje),
- stabilnost ispitivane hemikalije, rok upotrebe ili datum za ponovnu analizu ako je poznat,
- uslovi skladištenja.

Model RhE i protokol koji se upotrebljavaju te obrazloženje izbora (ako je primjenjivo)

Ispitni uslovi:

- model RhE koji se upotrebljava (uključujući broj šarže),
- informacije o kalibraciji mjernog uređaja (npr. spektrofotometar), talasna dužina i pojas propuštanja (ako je primjenjivo) koji se upotrebljavaju za kvantifikaciju MTT formazana te raspon linearnosti mjernog uređaja,
- opis metode koja se upotrebljava za kvantifikaciju MTT formazana,
- opis kvalifikacije sistema HPLC/UPLC spektrofotometrije, ako je primjenjivo,
- potpune popratne informacije o konkretnom upotrijebljenom modelu RhE, uključujući njegove radne karakteristike. To bi, među ostalim, trebalo uključivati:
  i. vijabilnost;
  ii. funkciju barijere;
  iii. morfologiju;
  iv. obnovljivost i prediktivnu sposobnost;
  v. kontrole kvaliteta modela,
  - upućivanje na prošle podatke za predmetni model. To bi, među ostalim, trebalo uključivati prihvatljivost podataka o kontroli kvaliteta s upućivanjem na prošle podatke o šarži,
  - dokazivanje osposobljenosti za izvođenje ispitne metode prije rutinske upotrebe ispitivanjem supstanci koje služe za dokazivanje osposobljenosti.

Ispitni postupak:

- pojedinosti o upotrijebljenom ispitnom postupku (uključujući postupke ispiranja upotrijebljene nakon perioda izlaganja),
- doze upotrijebljenih ispitivanih hemikalija i kontrolnih hemikalija,
- trajanje perioda izlaganja i temperature izlaganja,
- oznake kontrola koje se koriste za supstanci koje direktno redukuju MTT i/ili ispitivane hemikalije za bojenje, ako je primjenjivo,

- broj ponavljanja uzoraka tkiva upotrijebljenih po ispitivanoj hemikaliji i kontrolama (pozitivna kontrola, negativna kontrola te NSMTT, NSCliving i NSCkilled, ako je primjenjivo) po vremenu izlaganja,
- opis primijenjenih kriterijuma za odlučivanje/modela predviđanja na osnovu upotrijebljenog RhE modela,
- opis mogućih izmjena ispitne metode (uključujući postupke ispiranja).

Kriterijumi prihvatljivosti ciklusa i ispitivanja:

— srednje vrijednosti i rasponi prihvatljivosti pozitivnih i negativnih kontrola na osnovu proslih podataka,
— prihvatljiva varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva za pozitivne i negativne kontrole,
— prihvatljiva varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva za ispitivanu hemikaliju.

Rezultati:

- tablični prikaz podataka za pojedinačne ispitivane hemikalije i kontrole, za svaki period izlaganja, svaki ciklus i svako ponovljeno mjerenje, uključujući optičku gustinu ili površinu pika MTT formazana, postotak vijabilnosti tkiva, srednji postotak vijabilnosti tkiva, razlike između ponovljenih uzoraka, standardne devijacije i/ili koeficijente varijacije, ako je primjenjivo,
- ako je primjenjivo, rezultati kontrola upotrijebljenih za supstanci koje direktno redukuju MTT i/ili ispitivane hemikalije za bojenje, uključujući optičku gustinu ili površinu pika MTT formazana, %NSMTT, %NSCliving, %NSCkilled, razlike između ponovljenih uzoraka tkiva, standardne devijacije i/ili koeficijente varijacije (ako je primjenjivo) te konačni tačni postotak vijabilnosti tkiva,
- rezultati dobijeni s ispitivanom hemikalijom/hemikalijama i kontrolnim hemikalijama u odnosu na utvrđene kriterijume prihvatljivosti za ciklus i ispitivanje,
- opis drugih uočenih efekata,
- utvrđeno klasifikovanje, s upućivanjem na primijenjeni model predviđanja/kriterijume odlučivanja.

Rasprava o rezultatima

Zaključci

GLAVNI ELEMENTI ISPITNIH MODELA RHE KOJI SU VALIDOVANI ZA ISPITIVANJE KOROZIVNOG OŠTEĆENJA KOŽE

Elementi ispitnog modela	**EpiSkin™**	**EpiDerm™ SCT**	**SkinEthic™ RHE**	**epiCS®**
Površina modela	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Broj ponavljanja uzoraka tkiva	Najmanje dva po vremenu	2–3 po vremenu izlaganja	Najmanje dva po vremenu	Najmanje dva po vremenu

	izlaganja		izlaganja	izlaganja
Doze za tretiranje i primjena	Tečnosti i viskozne hemikalije: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm^2) Čvrste supstanci: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 µl ± 5 µl rastvora NaCl (9 g/l) Voskovi/ljepljive supstanci: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) s najlonskom mrežom	Tečnosti: 50 µl (79,4 µl/cm^2) s najlonskom mrežom ili bez nje *Kompatibilnost ispitivane hemikalije s najlonskom mrežom prije ispitivanja* Polučvrste supstanci: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Čvrste supstanci: 25 µl H_2O (ili po potrebi više) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Voskovi: ravni komad nalik disku prečnika otprilike 8 mm koji se stavlja na tkivo navlaženo s 15 µl H_2O.	Tečnosti i viskozne hemikalije: 40 µl ± 3 µl (80 µl/cm^2) s najlonskom mrežom *Kompatibilnost ispitivane hemikalije s najlonskom mrežom prije ispitivanja* Čvrste supstanci: 20 µl ± 2 µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Voskovi/ljepljive supstanci: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) s najlonskom mrežom	Tečnosti: 50 µl (83,3 µl/cm^2) s najlonskom mrežom *Kompatibilnost ispitivane hemikalije s najlonskom mrežom prije ispitivanja* Polučvrste supstanci: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Čvrste supstanci: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (ili po potrebi više) Voskovi: ravni komad nalik kolačiću prečnika otprilike 8 mm koji se stavlja na tkivo navlaženo s 15 µl H_2O
Prethodna provjera direktne redukcije MTT-a	50 µl (tečnosti) ili 20 mg (čvrste supstanci)+ 2 ml MTT 0,3 mg/ml rastvora za 180 ± 5 min na 37 ^oC, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 % → ako rastvor postane plava/ljubičasta, treba ssprovesti prilagođene	50 µl (tečnosti) ili 25 mg (čvrste supstanci)+ 1 ml MTT 1 mg/ml rastvora za 60 min na 37 ^oC, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 % → ako rastvor postane plava/ljubičasta, treba ssprovesti prilagođene	40 µl (tečnosti) ili 20 mg (čvrste supstanci)+ 1 ml MTT 1 mg/ml rastvora za 180 ± 15 min na 37 °C, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 % → ako rastvor postane plava/ljubičasta, treba ssprovesti prilagođene kontrole usmrćivanjem	50 µl (tečnosti) ili 25 mg (čvrste supstanci)+ 1 ml MTT 1 mg/ml rastvora za 60 min na 37 ^oC, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 % → ako rastvora postane plava/ljubičasta, treba ssprovesti prilagođene

	kontrole usmrćivanjem vodom	kontrole usmrćivanjem zamrzavanjem	zamrzavanjem	kontrole usmrćivanjem zamrzavanjem
Prethodna provjera za interferenciju s bojom	10 µl (tečnosti) ili 10 mg (čvrste supstanci) + 90 µl H_2O miješano 15 min na sobnoj temperaturi → ako rastvora postane obojena, trebalo bi ssprovesti prilagođene kontrole na živom tkivu	50 µl (tečnosti) ili 25 mg (čvrste supstanci) + 300 µl H_2O za 60 min na 37 ^oC, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 % → ako rastvora postane obojena, trebalo bi ssprovesti prilagođene kontrole na živom tkivu	40 µl (tečnosti) ili 20 mg (čvrste supstanci) + 300 µl H_2O miješano 60 min na sobnoj temperaturi → ako je ispitivana hemikalija obojena, trebalo bi ssprovesti prilagođene kontrole na živom tkivu	50 µl (tečnosti) ili 25 mg (čvrste supstanci) + 300 µl H_2O za 60 min na 37 ^oC, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 % → ako rastvora postane obojena, trebalo bi ssprovesti prilagođene kontrole na živom tkivu
Vrijeme i temperatura izloženosti	3 min, 60 min (± 5 min) i 240 min (± 10 min) U ventiliranim ormarima Sobna temperatura (18–28 ^oC)	3 min na sobnoj temperaturi i 60 min na 37 ^oC, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 %	3 min na sobnoj temperaturi i 60 min na 37 ^oC, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 %	3 min na sobnoj temperaturi i 60 min na 37 ^oC, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 %
Ispiranje	25 ml 1 x PBS (2 ml/odbacivanje)	20 puta uz stalan lagani tok 1 x PBS-a	20 puta uz stalan lagani tok 1 x PBS-a	20 puta uz stalan lagani tok 1 x PBS-a
Negativna kontrola	50 µl rastvora NaCl (9 g/l) Ispituje se sa svakim vremenom izlaganja	50 µl H_2O Ispituje se sa svakim vremenom izlaganja	40 µl H_2O Ispituje se sa svakim vremenom izlaganja	50 µl H_2O Ispituje se sa svakim vremenom izlaganja
Pozitivna kontrola	50 µl ledene octene kiseline Ispituje se samo četiri sata	50 µl 8N KOH Ispituje se sa svakim vremenom	40 µl 8N KOH Ispituje se samo 1 sat	50 µl 8N KOH Ispituje se sa svakim vremenom

		izlaganja		izlaganja
Rastvora MTT-a	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Vrijeme i temperatura inkubacije MTT-a	180 min (± 15 min) na 37 ^{o}C, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 %	180 min na 37 ^{o}C, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 %	180 min (±15 min) na 37 ^{o}C, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 %	180 min na 37 ^{o}C, 5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 %
Ekstrakcijski rastvarač	500 µl zakiseljenog izopropanola (0,04 N HCl u izopropanolu) (potpuno uronjeno izolovano tkivo)	2 ml izopropanola (ekstrakcija s vrha i dna umetka)	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija s vrha i dna umetka)	2 ml izopropanola (ekstrakcija s vrha i dna umetka)
Vrijeme i temperatura ekstrakcije	Preko noći na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svjetla	Preko noći bez protresanja na sobnoj temperaturi ili 120 min uz protresanje (~ 120 rpm) na sobnoj temperaturi	Preko noći bez protresanja na sobnoj temperaturi ili 120 min uz protresanje (~ 120 rpm) na sobnoj temperaturi	Preko noći bez protresanja na sobnoj temperaturi ili 120 min uz protresanje (~ 120 rpm) na sobnoj temperaturi
Očitavanje optičke gustine	570 nm (545–595 nm) bez referentnog filtra	570 nm (ili 540 nm) bez referentnog filtra	570 nm (540–600 nm) bez referentnog filtra	540–570 nm bez referentnog filtra
Kontrola kvaliteta tkiva	18-satno tretiranje SDS-om 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	Tretiranje s 1 % Triton X-100 4,08 sati ≤ ET_{50} ≤ 8,7 sati	Tretiranje s 1 % Triton X-100 4,0 sati ≤ ET_{50} ≤ 10,0 sati	Tretiranje s 1 % Triton X-100 2,0 sati ≤ ET_{50} ≤ 7,0 sati
Kriterijumi prihvatljivosti	1.Srednja optička gustina	1.Srednja optička gustina	1.Srednja optička gustina ponovljenih	1.Srednja optička gustina

	ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom (NaCl) trebala bi biti ≥ 0,6 i ≤ 1,5 za svako vrijeme izlaganja. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli (ledena sirćetna kiselina) na četiri sata, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti ≤ 20 %. 3. U rasponu vijabilnosti 20–100 % i za optičku gustinu ≥ 0,3, razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva ne bi trebala biti veća od 30 %.	ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom (H_2O) trebala bi biti ≥ 0,8 i ≤ 2,8 za svako vrijeme izlaganja. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli (8N KOH) na 1 sat, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti < 15 %. 3. U rasponu vijabilnosti 20–100 % koeficijent varijacije između ponovljenih uzoraka tkiva trebao bi biti ≤ 30 %.	uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom (H_2O) trebala bi biti ≥ 0,8 i ≤ 3,0 za svako vrijeme izlaganja. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli (8N KOH) na jedan sat (i četiri sata ako je primjenjivo), izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti < 15 %. 3. U rasponu vijabilnosti 20–100 % i za optičku gustinu ≥ 0,3, razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva ne bi trebala biti veća od 30 %.	ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom (H_2O) trebala bi biti ≥ 0,8 i ≤ 2,8 za svako vrijeme izlaganja. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli (8N KOH) na 1 sat, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti < 20 %. 3. U rasponu vijabilnosti 20–100 % i za optičku gustinu ≥ 0,3, razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva ne bi trebala biti veća od 30 %.

EFIKASNOST ISPITNIH MODELA ZA DALJE KLASIFIKOVANJE

U tabeli u nastavku navedena je efikasnost četiri ispitnih modela izračunata na osnovu skupa od 80 hemikalija koje su ispitala četiri subjekta koja su razvila testove. Izračune je ssproveo OECD-a, a pregledala ih je i potvrdila stručna podgrupa.

Ispitnim modelima EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ i epiCS® mogu se odrediti dalje potkategorije (tj. 1.A naspram 1.B i 1.C naspram NC).

Efikasnost, stope prestrogog i preblagog klasifikovanja i tačnost (prediktivna sposobnost) četiri ispitnih modela na osnovu skupa od 80 hemikalija koje su ispitane u dva ili tri ciklusa u svakom ispitnom modelu:

STATISTIČKI PODACI O PREDVIĐANJIMA DOBIJENI NA CIJELOM SKUPU HEMIKALIJA

(n = 80 hemikalija ispitivanih u dva nezavisna ciklusa za epiCS® ili tri nezavisna ciklusa za EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ i SkinEthic™ RHE, tj. 159 ([*2]) odnosno 240 klasifikacije)

	EpiSkin™	**EpiDerm ™**	**SkinEthic™**	**epiCS®**
Prestroga klasifikacije:				
1.B i 1.C prestrogo klasifikovani kao 1.A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
NC prestrogo klasifikovan kao 1.B i 1.C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
NC prestrogo klasifikovan kao 1.A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Ispr. prestrogog klasifikacije	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Opšta stopa prestrogog klasifikacije (sve kategorije)	**17,9 %**	**23,3 %**	**24,5 %**	**25,8 %**
Preblaga klasifikacije:				
1.A preblago klasifikovan kao 1.B i 1.C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1.A preblago klasifikovan kao NC	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1.B i 1.C preblago klasifikovani kao NC	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Opšta stopa preblagog klasifikacije (sve kategorije)	**3,3 %**	**2,5 %**	**5,4 %**	**4,4 %**
Tačna klasifikacije:				
1.A tačno klasifikovan	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
1.B i 1.C tačno klasifikovani	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
NC tačno klasifikovan	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %

Ukupna tačnost	**78,8 %**	**74,2 %**	**70 %**	**69,8 %**

NC: nije korozivno

Ključni parametri i kriterijumi prihvatljivosti za kvalifikaciju sistema HPLC/UPLC spektrofotometrije za mjerenje MTT formazana ekstrahovanog iz tkiva RhE

Parametar	**Protokol izveden iz smjernica Uprave za hranu i lijekove (FDA)**	**Kriterijumi prihvatljivosti**
Selektivnost	Analiza izopropanola, slijepe probe na živom tkivu (ekstrakt izopropanola iz živih tkiva RhE bez ikakvog tretiranja), slijepe probe na mrtvom tkivu (ekstrakt izopropanola iz mrtvih tkiva RhE bez ikakvog tretiranja)	$Površina_{interference}$ ≤ 20 % $površine_{LLOQ}$ ([13])
Preciznost	Kontrole kvaliteta (tj. MTT formazan pri 1,6 µg/ml, 16 µg/ml i 160 µg/ml) u izopropanolu (n = 5)	CV ≤ 15 % ili ≤ 20 % za LLOQ
Tačnost	Kontrole kvaliteta u izopropanolu (n = 5)	%Dev ≤ 15 % ili ≤ 20 % za LLOQ
Efekat matrice	Kontrole kvaliteta u slijepoj probi na živom tkivu (n = 5)	85 % ≤ efekat matrice kao % ≤ 115 %
Prenos	Analiza izopropanola nakon standardnog ULOQ	$Površina_{interference}$ ≤ 20 % $površine_{LLOQ}$
Obnovljivost (u danu)	3 nezavisne kalibracione krive (na osnovu šest uzastopnih razrjeđivanja 1/3 MTT formazana u izopropanolu, počevši s ULOQ-om, tj. 200 µg/ml) Kontrole kvaliteta u izopropanolu (n = 5)	Kalibracione krive: %Dev ≤ 15 % ili ≤ 20 % za LLOQ Kontrole kvaliteta: %Dev ≤ 15 % i CV ≤ 15 %
Obnovljivost (među danima)	Prvi dan: 1 :kalibraciona kriva i kontrole kvaliteta u izopropanolu (n = 3) Drugi dan: 1 :kalibraciona kriva i kontrole kvaliteta u izopropanolu (n	

	= 3) Treći dan: 1 :kalibraciona kriva i kontrole kvaliteta u izopropanolu (n = 3)	
Kratkoročna stabilnost MTT formazana u ekstraktu tkiva RhE	Kontrole kvaliteta u slijepoj probi na živom tkivu (n = 3) analizirane na dan pripreme i nakon 24 sata skladištenja na sobnoj temperaturi	%Dev ≤ 15 %
Dugoročna stabilnost MTT formazana u ekstraktu tkiva RhE, ako je potrebno	Kontrole kvaliteta u slijepoj probi na živom tkivu (n = 3) analizirane na dan pripreme i nakon nekoliko dana skladištenja na utvrđenoj temperaturi (npr. 4 ^{o}C, –20 ^{o}C, –80 ^{o}C)	%Dev ≤ 15 %

Dio I

1. Metoda ispitivanja

Ova metoda odgovara metodi OECD: TG 432 (2004).

1.1. Uvod

Fototoksičnost se definiše kao toksična reakcija na supstancu primjenjenu na organizam koja je ili izazvana ili pojačana (jasna pri nižim doznim nivoima) nakon naknadnog izlaganja svijetlosti ili koja je uzrokovana zračenjem kože nakon sistemske primjene supstance.

In vitro 3T3 NRU ispitivanje fototoksičnosti se koristi za identifikovanje fototoksičnog potencijala ispitivane supstance koji je izazvan pobuđenom hemikalijom nakon ekspozicije svijetlu. Ispitivanje ocjenjuje foto-citotoksičnost relativnim smanjenjem u vijabilnosti ćelija koje su izložene hemikaliji u prisustvu svjetlosti u odnosu na odsustvo svijetlosti. Supstance koje su identifikovane ovim ispitivanjem su vjerovatno fototoksične in vivo po sistemskoj primjeni i distribuciji u kožu ili poslije površinske primjene (lokalne primjene na kožu).

Mnoge vrste hemikalija su prijavljene da izazivaju fototoksične efekte. Njihova zajednička osobina je njihova sposobnost da apsorbuju svijetlosnu energiju u opsegu sunčeve svijetlosti. Prema prvom zakonu fotohemije (zakon Grotthaus-Draper), fotoreakcija zahtijeva dovoljnu apsorpciju kvantuma svjetlosti. Zbog toga, prije razmatranja biološkog ispitivanja, odrediti UV/VIS apsorpcioni spektar ispitivane supstance. Ako je molarni ekstinkcioni/apsorpcioni koeficijent manji od 10 litre x mol^{-1} x cm^{-1} onda supstanca nije fotoreaktivna. Takvu hemikaliju ne ispitivati in vitro 3T3 NRU ispitivanjem fototoksičnosti ili bilo kojim drugim ispitivanjem za štetne fotohemijske efekte (Dio II ove metode).

Pouzdanost i relevantnost in vitro 3T3 NRU ispitivanja fototoksičnosti je evaluirana. In vitro 3T3 NRU test fototoksičnosti se pokazao predvidivim za akutne fototoksične efekte kod životinja i ljudi in vivo. Test nije dizajniran da predvidi druge štetne efekte koji se pojavljuju iz kombinovanog dejstva hemikalije i svijetlosti, npr. ne odnosi se na fotogenotoksičnost, fotoalergiju ili fotokarcinogenost, niti dozvoljava procjenu potencijala fototoksičnosti. Test nije dizajniran da se odnosi na indirektne mehanizme fototoksičnosti, efekte metabolita ispitivane supstance ili efekte smješa.

Kako je upotreba metabolišućih sistema opšti zahtjev za sve in vitro testove za predviĐanje genotoksičnosti i karcinogenog potencijala, do sada, u slučaju fototoksikologije, postoje samo rijetki primjeri kada je potrebna metabolička transformacija za hemikaliju da bi se ponašala kao fotootrov in vivo ili in vitro. Zbog toga se ne smatra neophodnim niti naučno opravdanim za ovaj test da se izvodi sa sistemom metaboličke aktivacije.

1.2. Definicije

Zračenje je intenzitet upadnog ultravioletnog (u daljem tekstu: UV) ili vidljivog svijetla na površini, mjeren u W/m^2 ili mW/cm^2.

Doza svijetlosti je količina (koja je jednaka proizvodu intenziteta i vremena) UV ili vidljivog upadnog zračenja na površini, izražen u džulima (= W x s) po jedinci površine, npr. J/m^2 ili J/cm^2.

Talasne dužine UV svijetlosti su oznake koje je preporučila CIE (Commission Internationale de L'Eclairage), i to su: UVA (315 nm do 400 nm), UVB (280 nm do 315 nm) i UVC (100 nm do 280 nm), druge oznake su takoĐe u upotrebi: podjela između UVB i UVA se često stavlja na 320 nm, a UVA može biti podijeljena u UV-A1 i UV-A2 s podjelom napravljenom na oko 340 nm.

Viabilitet ćelija je parametar koji mjeri ukupnu aktivnost ćelijske populacije (npr. upijanje vitalne boje Neutral Red u ćelijske lizozome), koja u zavisnosti od ciljnog pokazatelja ispitivanja koji se mjeri i korišćenog dizajna ispitivanja korelira sa ukupnim brojem i/ili vitalnosti ćelija.

Relativni viabilitet ćelija je ćelijski viabilitet izražen u odnosu na negativne (rastvarač) kontrole koje su prošle cijeli eksperimentalni postupak (+Irr ili -Irr), ali nisu tretirane sa ispitivanom hemikalijom.

Fotoiritacioni faktor (u daljem tekstu: PIF) je faktor izveden uporeĐivanjem dvije podjednako efikasne citotoksične koncentracije (IC_{50}) ispitivane hemikalije dobijene u odsustvu (-Irr) i u prisustvu (+Irr) necitotoksičnog zračenja sa UVA/vis svijetlošću.

IC_{50} je koncentracija ispitivane hemikalije koja smanjuje viabilnost ćelija za 50%.

Srednji fotoefekat (u daljem tekstu: MPE) je mjera izvedena iz matematičke analize krivih koncentracija odgovor dobijenih u odsustvu (-Irr) i u prisustvu (+Irr) zračenja sa UVA/VIS svijetlošću koje nije citotoksično.

Fototoksičnost je akutna toksična reakcija koja je izazvana nakon prvog izlaganja kože određenim hemikalijama i naknadnom izlaganju svjetlu ili koja je slično izazvana zračenjem kože nakon sistemske primjene hemikalije.

1.3. Princip metode

In vitro 3T3 NRU test fototoksičnosti zasnovan je na poređenju citotoksičnosti hemikalije, kada se ispituje u prisustvu i odsustvu izlaganja necitotoksičnoj dozi simulirane sunčeve svijetlosti. Citotoksičnost je u ovom testu izražena kao smanjenje preuzimanja vitalne boje, Neutral Red. Zavisno od koncentracije, kada se mjeri 24 sata nakon tretmana ispitivanom hemikalijom i zračenja. NR je slaba katjonska boja koja lako prodire kroz membrane ćelija ne-difuzijom, akumulirajući se intracelularno u lizosomima. Promjene u površini osjetljive lizosomalne membrane vodi do lizosomalne nepostojanosti i drugih promjena koje postepeno postaju ireverzibilne. Takve promjene koje su nastale dejstvom ksenobiotika imaju za poslijedicu smanjenje preuzimanja i vezivanja NR. Na ovaj način se pravi razlika između viabilnih, oštećenih ili mrtvih ćelija, što je osnova ovog ispitivanja.

Balb/c 3T3 ćelije se održavaju u kulturi 24 sata da bi se formirali monoslojevi. Dvije posude sa 96 bazenčića po ispitivanoj hemikaliji se prije-inkubiraju sa osam različitih koncentracija ispitivane supstance u trajanju od 1 sata. Potom se jedna od dvije posude izlaže najvišoj dozi ne-citotoksičnog zračenja dok se druga posuda drži u mraku. Zatim se u obije posude medijumum tretmana zamijeni medijumumom za kultivisanje i poslije sljedećih 24 sata inkubacije određuje se viabilitet ćelija preuzimanjem Neutral Red boje. Viabilitet ćelija se izražava kao procenat od netretiranih kontrola rastvarača i računa se za svaku ispitivanu koncentraciju. Kako bi se predvideo potencijal fototoksičnosti, porede se koncentracione reakcije dobijene u prisustvu i u odsustvu zračenja, obično pri nivou IC_{50}, tj. pri koncentraciji koja smanjuje viabilitet ćelija do 50% u poređenju sa netretiranim kontrolama.

1.4. Opis metode

1.4.1. Pripreme

1.4.1.1. Ćelije

Permanentna ćelijska linija mišjih firoblasta, Balb/c 3T3, klon 31, bilo iz Kolekcije kultura amjeričkog tipa (Amjerican Type Culture Collection, ATCC), Manassas, VA, USA ili iz Evropske Kolekcije ćelijskih kultura (The European Collection of Cell Cultures, ECACC, Salisbury, Wiltshire, UK) korišćena je u studiji validacije i zato se nabavljaju iz dobro kvalifikovanih depoa ćelija. Uz isti postupak ispitivanja koriste se i druge ćelije ili ćelijske linije ako su uslovi kultivisanja prilagođeni specifičnim potrebama ćelija, ali se pokazuje ekvivalentnost.

Ćelije redovno provjeravati na odsustvo kontaminacije mikoplazmom i koristiti jedino ako nijedna mikoplazma nije pronađena.

Redovno provjeravati osjetljivost ćelija na UV prema pokolonama kontrole kvaliteta koje su opisane u ovoj metodi. Zbog toga što se UVA osjetljivost ćelija povećava s brojem prolaza, koristiti Balb/c 3T3 ćelije najnižeg broja prolaza koji se dobija, najbolje manje od 100 (tacka 1.4.2.2.2. ove metode i Dio III ove metode).

1.4.1.2. Medijumum i uslovi kultivisanja

Odgovarajući medijumum za kultivisanje i uslovi kultivacije se koriste za rutinske prolaze ćelija i tokom postupka ispitivanja, npr. za ćelije Balb/c 3T3 oni su DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) kome je dodato 10% seruma novoroĐenog govečeta, 4 mM glutamina, penicilin (100 IU) i streptomicin (100 µg/mL), i vlažna inkubacija na 37 °C, 5% - 7,5% CO_2 u zavisnosti od pufera (tacka 1.4.1.4. ove metode). Uslovi kultivisanja ćelija obezbjeđuju da vrijeme ciklusa ćelija bude u okviru normalnog istorijskog opsega ćelija ili ćelijskih linija koje se koriste.

1.4.1.3. Pripremanje kultura

Ćelije iz zamrznutih "stock" kultura zasiju se u medijumum za kultivisanje pri odgovarajućoj gustini i subkultivišu najmanje jednom prije upotrebe u in vitro 3T3 NRU testu fototoksičnosti.

Ćelije koje se koriste za test fototoksičnosti posiju se u medijumum za kultivisanje pri odgovarajućoj gustini tako da kulture ne dostignu nagomilavanje do kraja testa, tj. kada je viabilitet ćelija određen 48 sati nakon zasijavanja ćelija. Za ćelije Balb/c 3T3 koje rastu u posudama od 96 bazenčića, gustina zasijavanja ćelija je 1 x 10^4 ćelija po bazenčiću.

Za svaku ispitivanu supstancu ćelije se zasiju indentično u dvije odvojene posude sa 96 bazenčića, koji zatim istovrijemeno prolaze postupak ispitivanja pod identičnim uslovima kultivacije osim za vremenski period kada se jedna posuda izlaže zračenju (+Irr), a druga se drži u mraku (-Irr).

1.4.1.4. Priprema ispitivane supstance

Ispitivane supstance se pripremaju svježe, odmah prije upotrebe osim ukoliko podaci pokazuju njihovu stabilnost pri čuvanju. Preporučuje se da se cjelokupna priprema hemikalija i inicijalni tretman ćelija izvode pod svijetlosnim uslovima koji bi izbjegli fotoaktivaciju ili degradaciju ispitivane supstance ispitivane supstance pre zračenja.

Ispitivane hemikalije rastvoriti u puferovanim rastvorima soli, npr. Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) ili drugom fiziološki izbalansiranom puferskom rastvoru koji ne sadrži proteinske sastojke, sastojke koji apsorbuju svijetlost (npr. pH-idikatorke boje ili vitamini) kako bi se izbjegla interferencija tokom zračenja. Kako se tokom zračenja ćelije drže oko 50 minuta van CO_2 inkubatora, vodi se računa da se izbjegne alkalizacija. Ako se koriste slabi puferi kao EBSS, ovo se postiže inkubiranjem ćelija pri 7,5% CO_2. Ako se ćelije inkubiraju pri samo 5% CO_2, izabrati jači pufer. Ispitivane hemikalije ograničene rastvorljivosti u vodi rastvoriti u odgovarajućem rastvaraču. Ako se koristi rastvarač, on je prisutan u konstantnoj zapremini u svim kulturama, tj. u negativnoj kontroli (kontroli rastvarača) kao i u svim koncentracijama ispitivane supstance i da ne bude toksičan pri tim koncentracijama. Koncentracije ispitivane supstance izabrati tako da se izbjegne taloženje ili mutnoća rastvora.

Rastvarači su dimetilsulfoksid (u daljem tekstu: DMSO) i etanol (u daljem tekstu: ETOH). Odgovaraju i drugi rastvori niske citotoksičnosti. Prije upotrebe sve rastvarače procijeniti prema specifičnim osobinama, npr. reakcija sa ispitivanom supstancom, gušenje fototoksičnog efekta, osobine dejonizacije radikala i/ili hemijska stabilnost u rastvaraču.

Miješanje na vorteksu i/ili zagrijevanje do odgovarajućih temperatura se koristi kako bi se pomoglo rastvaranje ukoliko ovo ne bi imalo uticaja na stabilnost ispitivane supstance.

1.4.1.5. Uslovi zračenja

1.4.1.5.1. Izvor svijetlosti

Izbor odgovarajućeg izvora svijetlosti i filtera je kritičan faktor u ispitivanju fototoksičnosti. Svijetlost UVA i vidljive oblasti dovodi se u vezu sa fototoksičnim odgovorima in vivo, dok je generalno UVB od manjeg značaja, ali je visoko citotoksična. Citotoksičnost se povećava 1.000 puta kako talasna dužina ide od 313 nm do 280 nm. Kriterijumi za izbor odgovarajućeg izvora svijetlosti uključuju zahtjev da svijetlosni izvor emituje talasne dužine koje apsorbuje ispitivana supstanca (apsorpsioni spektar) i da doza svijetlosti (koja se postiže u razumnom vremenu izlaganja) je dovoljna za detekciju poznatih fotocitotoksičnih hemikalija. Talasne dužine i doze koje se koriste ne štete prekodnosno ispitivanom sistemu, npr. oslobaĐanje toplote (infracrvena oblast).

Simulacija sunčeve svijetlosti sa solarnim simulatorima je optimalni veštački izvor svijetlosti. Raspodjela snage zračenja filtriranog solarnog simulatora je približna dnevnoj svijetlosti poljašnjeg prostora. Ksenonski luk i (dopirani) živa-metal halogeni luk se koriste kao solarni simulatori. Druga ima prednost emitovanja manje toplote i što je jeftinija slaganje sa sunčevom svijetlošću je manje idealna u poreĐenju sa ksenonskim lukovima. Zbog toga što svi solarni simulatori emituju značajne količine UVB one se odgovarajuće filtriraju da bi se prigušile UVB talasne dužine visoke citotoksičnosti. Zbog toga što plastični materijali za kultivisanje ćelija sadrže UV stabilizatore spektar mjeri se kroz isti tip poklopca posude sa 96 bazenčića kao onaj koji će se koristiti u testu. Nezavisno od mjera preduzetih da bi se prigušili djelovi spektra filtriranjem ili neizbežnim filterskim efektima opreme, spektar zabilježen ispod ovih filtera ne odstupa od standardizovane poljašnje dnevne svijetlosti.

1.4.1.5.2. Doziranje

Intenzitet svijetlosti (zračenja) provjerava se prije svakog testa fototoskičnosti koristeći odgovarajući UV-metar širokog opsega. Intenzitet mjeriti preko istog tipa poklopca posude sa 96 bazenčića kao što će se koristiti u testu. UV-metar je kalibrisan prema izvoru. Provjeriti karakteristike UV-metra i u ovu svrhu upotrebljava se drugi, referentni UV-metar iste vrste i iste kalibracija. Idealno, pri većim intervalima koristiti spektroradiometar za mjerenje spektralnog zračenja filtriranog izvora svijetlosti i provjeriti kalibraciju UV-metra širokog opsega.

Doza od 5 J/cm^2 (kao što je mjerena u UVA opsegu) je određena da ne bude citotoksična za ćelije Balb/c 3T3 i dovoljno jaka da pobudi hemikalije da izazovu fototoksičnu reakciju pr. da postigne 5 J/cm^2 tokom vremenskog perioda od 50 minuta zračenje je bilo podešeno na 1,7 mW/cm^2 (Dio III) Slika 2. ove metode. Ukoliko se koristi druga ćelijska linija ili drugi svijetlosni izvor, doza zračenja se kalibriše tako da se način doziranja bira da nije štetan za ćelije ali da je dovoljan da pobudi standardne fotootrove. Vrijeme izlaganja svijetlosti se računa na sljedeći način:

$$dozazraenjaJ/cm^2) \; 100$$

$$t(\text{min}) = \frac{\times}{\textit{zračenje}(mW/cm_{2}) \times 60}$$

1.4.2. Eksperimentalni uslovi

1.4.2.1. Koncentracije ispitivane supstance

Opsezi koncentracija ispitivane hemikalije u prisustvu (+Irr) ili u odsustvu (-Irr) svijetlosti su adekvatno određeni u eksperimentima koji su osmišljeni za nalaženje opsega. Bilo bi korisno prvo procjeniti rastvorljivost i na 60 minuta (ili koje vrijeme će se koristiti), jer se rastvorljivost mjenja tokom vremena ili za vrijeme trajanja ekspozicije. Da bi se izbjegla toksičnost koja je uzrokovana neodgovarajućim uslovima kultivisanja ili visokom kiselošću ili alkalnosti hemikalije, pH ćelijskih kultura sa dodatom ispitivanom supstancom je u opsegu 6,5 do 7,8.

Najviša koncentracija ispitivane supstance je u okviru fizioloških uslova ispitivanja, npr. da se izbjegne osmotski ili pH stres. U zavisnosti od ispitivane hemikalije, razmotriti druge fizikohemijske osobine kao ograničavajuće faktore za najvišu ispitivanu koncentraciju. Za relativno nerastvorne supstance koje nisu toksične pri koncentracijama do tačke zasićenja ispitati najvišu koncentraciju koja se postiže.

Izbjeći taloženje ispitivane hemikalije pri bilo kojoj ispitivanoj koncentraciji. Maksimalna koncentracija ispitivane supstance ne prelazi 1.000 µg/mL; osmolalnost ne prelazi 10 mmolar. Koristiti seriju geometrijskog razblaženja osam koncentracija ispitivane supstance sa konstantnim faktorom razblaženja (tacka 2.1. ove metode).

Ukoliko postoje podaci (iz eksperimenta nalaženja opsega) da ispitivana supstanca nije citotoksična do granice koncentracije u eksperimentu u mraku (-Irr), ali je visoko toksična kada je ozračena (+Irr), opseg koncentracija koji se bira za (+Irr) eksperiment se razlikuje od onog izabranog za (−Irr) eksperiment da bi ispunio zahtjev adekvatnosti kvaliteta podataka 1.4.2.2. Kontrole

1.4.2.2.1. Osjetljivost ćelija na zračenje, uspostavljanje istorijskih podataka

Ćelije provjeravati redovno (približno svakog petog prolaza) na osjetljivost prema izvoru svijetlosti procjenom njihove viabilnosti po ekspoziciji rastućim dozama zračenja. U ovoj procjeni se koristi nekoliko doza zračenja, uključujući nivoe značajno veće od onih koji se koriste u 3T3 NRU testu fototoksičnosti. Ove doze se najlakše kvantifikuju mjerenjima UV djelova izvora svijetlosti. Ćelije se zasade pri gustini koja se koristi u in vitro 3T3 NRU testu fototoksičnosti i zrače se sljedećeg dana. Onda se određuje viabilitet ćelija dan kasnije korišćenjem preuzimanja Neutral Red boje. Pokazati da je nastala najveća necitotoksična doza (npr. u studiji validacije: 5 J/cm^2 (UVA)) bila dovoljna da ispravno klasifikuje referentnu hemikaliju (Tabela 1).

1.4.2.2.2. Osjetljivost na zračenje, provjera tečnog testa

Ispitivanje zadovoljava kriterijume kvaliteta ako ozračene negativne kontrole/kontrole rastvarača pokažu viabilitet veći od 80% u poreĐenju sa neozračenom negativnom kontrolom/kontrolom rastvarača.

1.4.2.2.3. Sposobnost rasta kontrola rastvarača

Apsolutna optička gustina ($OD_{540\ NRU}$) boje Neutral Red ekstrahovane iz kontrole rastvarača ukazuje na to da li je $1x10^4$ ćelija koje su zasijane po bazenčiću pokazalo rast sa normalnim vremenom udvostručavanja tokom dva dana testa. Ispitivanje zadovoljava kriterijume prihvatanja ako je srednja vrijednost $OD_{540\ NRU}$ netretiranih kontrola ≥0,4 (tj. približno 20 puta veća od podloge apsorbancije rastvarača).

1.4.2.2.4. Pozitivna kontrola

Poznata fototoksična hemikalija se testira istovrijemeno sa svakim in vitro 3T3 NRU testom fototoksičnosti. Preporučuje se hlorpromazin (u daljem tekstu: CPZ). Za CPZ koji se testira sa standardnim postupkom u in vitro 3T3 NRU testu fototoksičnosti, određeni su kriterijumi za prihvatanje testa: ozračen CPZ (+Irr): IC_{50}=0,1 do 2,0μg/ml, neozračen CPZ (-Irr): IC_{50} = 7,0 do 90,0 μg/mL. Foto iritacioni faktor (Photo Irritation Factor, PIF) je >6. Pratiti istorijske karakteristike pozitivne kontrole.

Koriste se druge fototoksične hemikalije, koje odgovaraju za hemijsku klasu ili karakteristike rastvorljivosti hemikalije koja se procjenjuje, kao istovremena pozitivna kontrola umjesto hlorpromazina.

1.4.3. Postupak ispitivanja

1.4.3.1. Prvi dan

Razdijeliti 100 μL medijumuma za kultivisanje u periferne bazenčiće posude sa 96 bazenčića za mikrotitraciju tkivnih kultura (= slijepe probe). U preostale bazenčiće, razdijeliti 100 μL suspenzije ćelija od $1x10^5$ ćelija/mL u medijumumu za kultivisanje (= $1×10^4$ ćelija/bazenčić). Dvije posude pripremiti za svaku seriju pojedinačnih koncentracija ispitivane supstance i za kontrolu rastvarača i konpozitivnu kontrolu.

Inkubirati ćelije 24 sata (tacka 1.4.1.2. ove metode) dok ne formiraju polukonfluentan monosloj. Ovaj period inkubacije dozvoljava oporavak ćelija, adherenciju i eksponencijalni rast.

1.4.3.2. Drugi dan

Nakon inkubacije dekantovati medijumum kulture od ćelija i isprati sa 150 μL puferovanog rastvora koji je korišćen za inkubaciju. Dodati 100 μL pufera koji sadrži odgovarajuću koncentraciju ispitivane supstance ili rastvarača (kontrola rastvarača). Primjeniti osam različitih koncentracija ispitivane hemikalije. Inkubitari ćelije sa ispitivanom supstancom u mraku 60 minuta (tačka 1.4.1.2. i tačka 1.4.1.4. ove metode).

Od dvije posude pripremljene za svaku seriju koncentracija ispitivane supstance i kontrola, jedna se izabere, obično nasumično, za određivanje citotoksičnosti (-Irr) (t.j. kontrolna posuda) i jedna (tretirana posuda) za određivanje fototoksičnosti (+Irr).

Za izvoĐenje +Irr ekspozicije, ozračiti ćelije na sobnoj temperaturi 50 minuta preko poklopca posudice sa 96 bazenčića sa najvišom dozom zračenja koja nije citotoksična (Dio III ove

metode). Držati neozračene posude (-Irr) na sobnoj temperaturi u mračnoj kutiji 50 minuta (= vrijeme izlaganja svijetlosti).

Dekantovati ispitivani rastvor i pažljivo isprati dva puta sa 150 µL puferskog rastvora koji je korišćen za inkubaciju, ali koji ne sadrži ispitivani materijal. Zamijeniti pufer sa medijumumom za kultivaciju i inkubirati (tačka 1.4.1.2. ove metode) preko noći (18 do 22 sata).

1.4.3.3. Treći dan

1.4.3.3.1. Mokroskopska procjena

Ćelije pregledati na rast, morfologiju i integritet monosloja koristeći fazno kontrasni mikroskop. Bilježe se promjene u morfologiji ćelija i efekti na ćelijski rast.

1.4.3.3.2. Test preuzimanja boje Neutral Red

Isprati ćelije sa 150 µL prethodno zagrijanog pufera. Ukloniti rastvor za ispiranje lupkanjem. Dodati 100 µL rastvora Neutral Red (u daljem tekstu: NR) (3-amino-7-dimetilamino-2metilfenazin hidrohlorid, EINECS broj 209-035-8; CAS broj 553-24-2; C.I. 50040) koncentracije 50 µg/mL u medijumum bez serumai inkubirati kao što je opisano u dijelu 1.4.1.2. ove metode tokom tri sata. Nakon inkubacije, ukloniti NR medijumum i isprati ćelije sa 150 µL pufera.
Dekantovati i ukloniti višak pufera upijanjem ili centrifugiranjem.

Dodati tačno 150 µL rastvora za odstranjivanje NR (svježe pripremljen 49 djelova vode + 50 djelova etanola + 1 dio sirćetne kiseline).

Miješati posudu za mikrotitraciju na miješalici 10 minuta dok se NR ne ekstrahuje iz ćelija i formira homogeni rastvor.

Izmjeriti optičku gustinu ekstrakta NR na 540 nm na spektrofotometru prema slijepoj probi. Sačuvati podatke u dokumentu odgovarajućeg elektronskog formata za dalju analizu.

2. Podaci

2.1. Kvalitet i kvantitet podataka

Podaci ispitivanja omogućavaju značajnu analizu koncentracije-odgovora dobijene u prisustvu i u odsustvu zračenja i koncentraciju ispitivane hemikalije pri kojoj je viabilnost ćelija smanjena na 50% (IC_{50}). Ukoliko se pronađe citotoksičnost i opseg koncentracija i odsječak pojedinačnih koncentracija su postavljeni tako da omoguće podešavanje krive prema eksperimentalnim podacima.

Za jasno pozitivne i za jasno negativne rezultate (tačka 2.3. ove metode), dovoljan je primarni eksperiment koji je podržan jednim ili sa više preliminarnih ispitivanja nalaženja opsega.

Dvosmisleni, granični ili nejasni rezultati su razjašnjeni daljim ispitivanjima (tačka 2.4. ove metode). U takvim slučajevima razmotriti izmjenu eksperimentalnih uslova. Eksperimentalni uslovi koji se mijenjaju uključuju opseg koncentracija ili razmak između koncentracija, vrijeme

pre-inkubacije i vrijeme izlaganja zračenju. Kraće vrijeme izlaganja je pogodno za hemikalije nestabilne u vodi.

2.2. Procjena rezultata

Da bi se omogućila ocjena rezultata, računa se foto-iritacioni faktor (Photo-Irritation-Factor, PIF) ili srednji foto-efekat (Mean Photo Effect, MPE).

Za iizračunavanje mjera fototoksičnosti aproksimovati skup pojedinačnih vrijednosti koncentracija-odgovor pomoću odgovarajuće neprekidne (model) krive koncentracija - odgovor. Podešavanje krive prema podacima se izvodi ne-linearnom regresivnom metodom. Da bi se procjenio uticaj varijabilnosti podataka na podešavanje krive, koristi se postupak bootstrap.

Foto-iritacioni faktor (u daljem tekstu: PIF) iizračunava se upotrebom formule:

$$PIF = \frac{IC50(Irr)}{IC50(+Irr)}$$

Ako se IC_{50} u prisustvu i u odsustvu svijetlosti ne može izračunati, PIF se ne određuje za ispitivani materijal. Srednji foto-efekat (u daljem tekstu: MPE) određuje se na osnovu upoređivanja završenih koncentracija-odgovor krivih.

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^{N} WiFBcl}{\sum_{i=1}^{n} Wi}$$

Foto-efekat PEc pri bilo kojoj koncentraciji C se definiše kao proizvod odgovora efekta REc i doze efekta DEc tj. PEc = REc x DEc. Odgovor efekta REc je razlika između odgovora primjećenog u odsustvu i u prisustvu svijetlosti, tj. REc = Rc (-Irr) − Rc (+Irr).

Doza-efekat se daje kao:

$$Dec = \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1}$$

gdje je C* ravnotežna koncentracija, odnosno koncentracija pri kojoj je +Irr odgovor jednak -Irr odgovoru pri koncentraciji C. Ako se C* ne može odrediti zato što su vrijednosti odgovora +Irr krive sistematski više ili niže nego R_C(-Irr), dozni efekat je 1. Faktori wi su dati po najvišoj vrijednosti odgovora, tj. wi = MAX {Ri (+Irr), Ri (-Irr)}. Koncentracija C_i se bira tako da isti broj tačaka pripadne svakom koncentracionom intervalu koji su definisani sa vrijednosti koncentracije pri kojoj najmanje jedna ili dvije krive i dalje pokazuju vrijednost odgovora od najmanje 10%. Ako je ova maksimalna koncentracija viša od najviše koncentracije koja je korišćena u +Irr eksperimentu, onda se rezidualni deo +Irr krive podešava da je vrijednost odgovora "0". U zavisnosti od toga da li je MPE vrijednost veća od određene cut-off vrijednosti (MPE_c = 0,15) ili nije, hemikalija se klasifikuje kao fototoksična.

Softverski paket za iizračunavanje PIF i MPE je dostupan.

2.3. Tumačenje rezultata

Na osnovu studije validacije, ispitivana supstanca sa PIF < 2 ili sa MPE < 0,1 predviĐa: "nije fototoksično". Ako je PIF > 2 i < 5 ili ako je MPE > 0,1 i < 0,15 predviĐa: "vjerovatna fototoskičnost"; i ako je PIF > 5 ili MPE > 0,15 predviĐa: "fototoksičnost".

Za laboratorijae koje uvode ovaj test, ispitati referentne materijale nabrojane u Tabeli 1. prije ispitivanja ispitivane supstance za procjenu fototoksičnosti. Vrijednosti PIF i MPE su približne vrijednosti pomenutim u Tabeli 1.

Tabela 1.

Hemijski naziv	EINECS broj	CAS broj	PIF	MPE	Apsorpcioni maksimum	Rastvarač[LII] (1)
amiodaron HCL	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,2-0,54	242 nm 300 nm	etanol
hlorpromazin HCL	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33-0,63	309 nm	etanol
norfloksacin	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34-0,90	316 nm	acetonitril
antracen	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19-0,81	356 nm	acetonitril
Protoporfirin IX, dinatrijum	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54-0,74	402 nm	etanol
L-histidin		[7006-35-1]		0,05-0,10	211 nm	voda
heksahlorofen	200-733-8	[70-30-4]	1,1-1,7	0,00-0,05	299 nm 317 nm	etanol
Natrijum-lauril sulfat	205-788-1	[151-21-3]	1,0-1,9	0,00-0,05	Nema apsorpcije	voda

2.4. Tumačenje rezultata

Fototoksični efekti se uočavaju samo pri najvišim ispitivanim koncentracijama (naročito za ispitivane hemikalije koje su rastvorne u vodi). Dodatna razmatranja su neophodna za procjenu hazarda. Ovo uključuje podatke o apsorpciji kože i o akumulaciji hemikalije u koži i/ili podatke iz drugih testova, npr. ispitivanje hemikalije na in vitro životinjskoj ili ljudskoj koži ili modelima kože.

Ako nije pokazana toksičnost (+Irr i -Irr) i ako je slaba rastvorljivost bila ograničavajući faktor za koncentracije koje se ispituju, dovodi se u pitanje kompatibilnost ispitivane supstance sa testom i razmatra se potvrdno testiranje upotrebom npr. drugog modela.

3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o: 1) Ispitivanoj supstanci:

- podaci o identifikaciji, uobičajeni generički nazivi i IUPAC i CAS brojevi, ako su poznati;
- fizička priroda i čistoća;
- fizičke i hemijske osobine relevantne za izvoĐenje studije;
- UV/vis apsorpcioni spektar;
- stabilnost i fotostabilnost, ako je poznata. 2) Rastvaraču:
- opravdanje za izbor rastvarača;
- rastvorljivost ispitivane hemikalije u rastvaraču;
- procenat prisustva rastvarača u medijumumu za tretman.

3) Ćelijama:

- vrsta i izvor ćelija;
- odsustvo mikoplazme;
- broj ćelijskih prolaza, ako je poznat;
- osjetljivost ćelija na zračenje, određena opremom za zračenje koja se koristi u in vitro 3T3 NRU testu fototoksičnosti.

4) Uslovima ispitivanja ; inkubaciji pre i nakon tretmana:

- vrsta i sastav medijumuma za kultivisanje;
- uslovi inkubacije (koncentracija CO_2; temperatura; vlažnost); - trajanje inkubacije (predtretman, post-tretman).

5) Uslovima ispitivanja ; tretmanu hemikalijom:

- osnova za izbor koncentracija ispitivane hemikalije koje su korišćene u prisustvu i u odsustvu zračenja;
- u slučaju ograničene rastvorljivosti ispitivane hemikalije i odsustva citotoksičnosti:

osnova za najvišu ispitivanu koncentraciju;

- vrsta sastava medijumuma za tretiranje (puferovani rastvor soli); - trajanje hemijskog tretmana.

6) Uslovima ispitivanja[3]; zračenju:

- osnova za izbor izvora svijetlosti koji je korišćen;
- proizvoĐač i vrsta izvora svijetlosti i radiometra;
- karakteristike spektralnog zračenja izvora svijetlosti;
- transmisione i apsorpcione karakteristike korišćenih filtera;
- karakteristike radiometra i pojedinosti o kalibraciji;
- razmak svijetlosnog izvora od ispitivanog sistema;
- UVA zračenje pri ovom razmaku, izraženo u mW/cm^2;
- trajanje izlaganja UV/vis svijetlosti;
- UVA doza (zračenje x vrijeme), izražena u J/cm^2;
- temperatura ćelijskih kultura tokom zračenja i ćelijskih kultura koje se istovrijemeno drže u mraku.

7) Uslovima ispitivanja[4]; Neutral Red testu viabilnosti:

- sastav Neutral Red medijumuma za tretiranje;
- trajanje inkubacije sa Neutral Red;

- uslovi inkubacije (koncentracija CO_2; temperatura; vlažnost);
- uslovi ekstrakcije Neutral Red (ekstrakcija; trajanje);

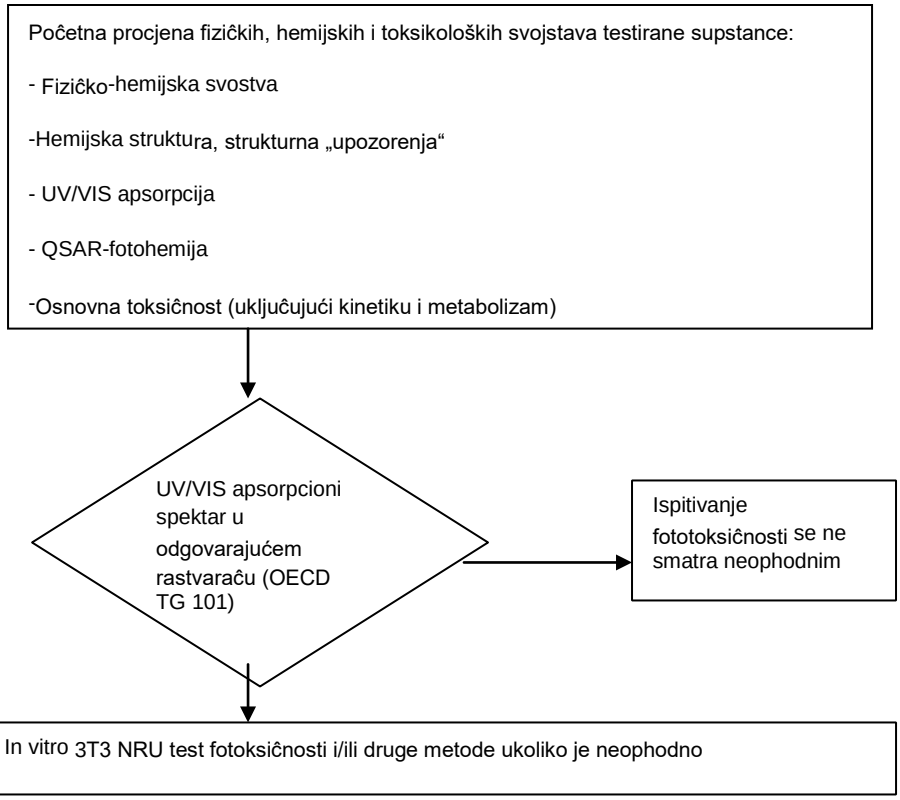
- talasna dužina koja je korišćena za spektrofotometrijsko čitanje optičke gustine Neutral

Red;

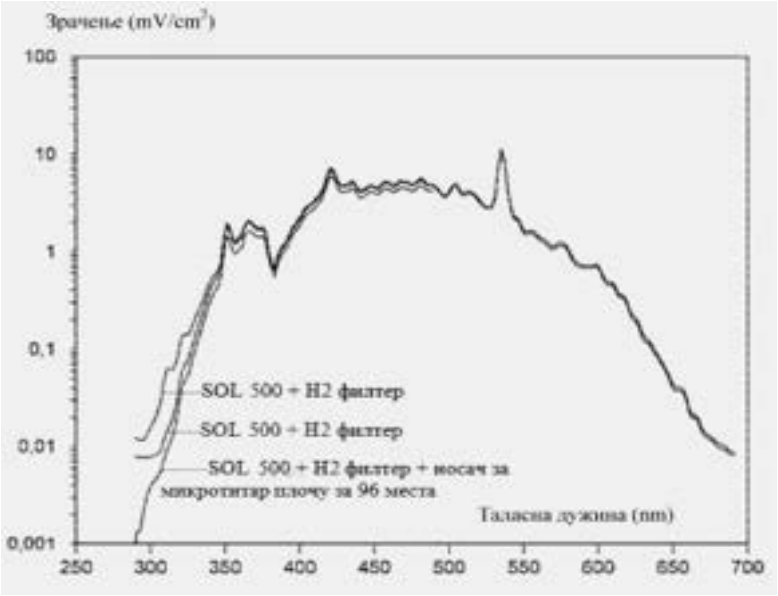
- druga talasna dužina (referentna), ako je korišćena;
- sadržaj slijepe probe spektrofotometra, ako je korišćena. 8) Rezultatima:
- viabilnost ćelija dobijena iz svake koncentracije ispitivane hemikalije, izražena u procentu viabilnosti od srednje vrijednosti istovremene kontrole rastvarača;
- krive koncentracija-odgovor (koncentracija ispitivane supstance prema relativnoj viabilnosti ćelija) dobijene u istovrijemenim +Irr i -Irr ispitivanjima;
- analiza krivih koncentracija-odgovor: ako je moguće, iizračunavanje IC_{50} (+Irr) i IC_{50} (-Irr);
- upoređivanje dve krive koncentracija-odgovor dobijene u prisustvu i u odsustvu zračenja, bilo računanjem foto-iritacionog faktora (PIF), bilo računanjem srednjeg fotoefekta (MPE);
- kriterijumi za prihvatanje testa; istovremena kontrola rastvarača;
- apsolutna viabilnost (optička gustina ekstrakta Neutral Red) ozračenih i neozračenih ćelija;
- istorijski podaci negativne i kontrole rastvarača; srednje vrijednosti i standardne devijacije;
- kriterijumi za prihvatanje testa; istovremena pozitivna kontrola;
- IC_{50}(+Irr) i IC_{50}(-Irr) i PIF/MPE hemikalije koja je korišćena kao pozitivna kontrola;
- istorijski podaci o hemikaliji koja je korišćena kao pozitivna kontrola: IC_{50}(+Irr) i IC_{50}(-Irr) i PIF/MPE; srednje vrijednosti i standardne devijacije.

9) Obrazloženju rezultata. 10) Zaključcima.

ULOGA 3T3 NRU PT U PRISTUPU KORAK PO KORAK ZA ISPITIVANJE FOTOTOKSIČNOSTI HEMIKALIJA
DIO II

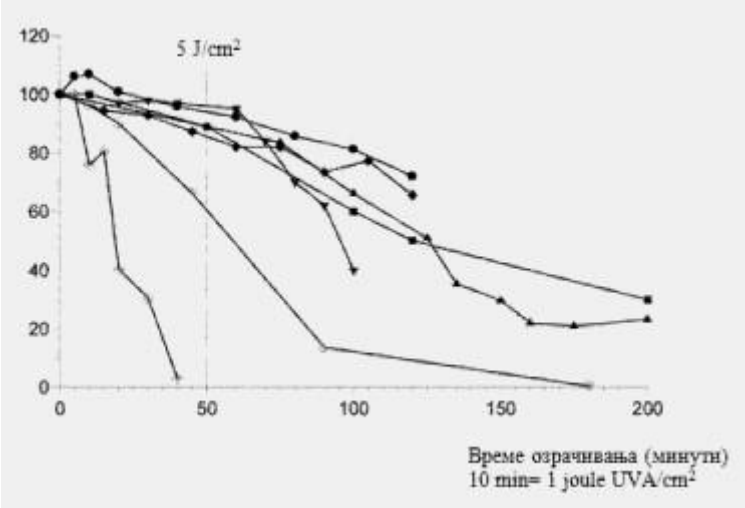


RASPODJELA SPEKTRALNE MOĆI FILTRIRANOG SOLARNOG SIMULATORA DIO III



Slika 1: Raspodjela spektralne moći filtriranog solarnog simulatora

Slika 1. daje primjer prihvatljive raspodjele spektralnog zračenja filtriranog solarnog simulatora. On je od punjenog metal halofenog izvora koji je korišćen u probi validacije 3T3 NRU PT[26]. Prikazani su efekat dva različita filtera i dodatni efekat filtriranja poklopca posude sa 96 bazenčića. Filter H2 je korišćen samo sa test sistemima koji tolerišu veću količinu UVB (test modela kože i test foto-hemolize eritrocita). U 3T3 NRU PT korišćen je H1 filter. Slika pokazuje da je dodatni efekat filtriranja poklopca posude uglavnom uočen u opsegu UVB, ali i dalje ostavljajući dovoljno UVB spektar zračenja da se pobude hemikalije koje tipično apsorbuju UVB opseg, kao što je amjodaron (Tabela 1.).



Slika 2: Osjetljivost na zračenje Balb/c 3T3 ćelija (izmjereno u opsegu UVA)

Viabilnost ćelija (% preuzimanja Neutral Red od strane kontrola u mraku) tačka 1.4.1.5.2. tač. 1.4.2.2.1. i 1.4.2.2.2. ove metode)

Osjetljivost Balb/c 3T3 ćelija na zračenje sa solarnim simulatorom koji je korišćen u probi validacije 3T3 NRU testa fototoksičnosti, mjerena u UVA opsegu. Slika pokazuje rezultate dobijene u sedam različitih laboratorijaa u prevalidacionoj studiji[27]. Zbog toga što su obe krive sa otvorenim znacima dobijene sa ostarelim ćelijama (veliki broj prolaza), one su zamijenjene novim sa zadebljanim oznakama koje pokazuju prihvatljivu toleranciju na zračenje, koje su dobijene na novim ćelijama. Iz ovih podataka izvedena je najviša doza zračenja koja nije toksična, od 5 J/cm^2. Horizontalna isprekidana linija dodatno pokazuje maksimalno prihvatljiv efekat zračenja dat u dijelu 1.4.2.2. ove metode.

B.42. SENZIBILIZACIJA KOŽE: TEST LOKALNIH LIMFNIH ČVOROVA

[26] Bronaugh R.L. and Maibach H.I., (1991) In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications. CRC Press, Boca Raton I Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W., (1999)
Test Guidelines for In vitro Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, p. 191-205.

[27] Testing Method B.44. Skin Absorption: In vivo Method

1. Metoda ispitivanja

Ova eksperimentalna metoda odgovara metodi OECD: TG 429 (2002).

1.1. Uvod

Test lokalnih limfnih čvorova (Local Lymph Node Assay, u daljem tekstu: LLNA) je proveren i prihvaćen da se opravda njegovo prihvatanje kao nove metode. Ovo je druga metoda za ocjenjivanje potencijala hemikalije da izazove senzibilizaciju kože kod životinja. Druga metoda (V.6. koja je data u ovom prilogu) koristi zamorce, prije svega test maksimizacije i Buehlerov test[4].

LLNA daje alternativnu metodu za identifikaciju hemikalija koje izazivaju senzibilizaciju kože i za potvrĐivanje da hemikalije nemaju značajan potencijal da uzrokuju senzibilizaciju kože. Ovo ne znači da se LLNA koristi umjesto ispitivanja na zamorcima, već da je ovaj test jednako dobar i da se primjenjuje kao alternativa u kojoj pozitivni i negativni rezultati uglavnom ne zahtijevaju dalju potvrdu.

LLNA pruža određene prednosti u odnosu na naučni napred i dobrobit životinja.Test proučava fazu indukcije senzibilizacije kože i daje kvantitativne podatke pogodne za procjenu odnosa doza-odgovor. Detalji validacije LLNA i pregled rada u vezi s tim su objavljeni. Imati u vidu da su blagi/umjereni senzibilizatori koji su pogodne supstance za pozitivnu kontrolu za testove na zamorcima, takoĐe pogodni za korišćenje u LLNA.

LLNA je in vivo metoda i ne eliminiše korišćenje životinja u ocjenjivanju aktivnosti kontaktne senzibilizacije. Ona ima potencijal da smanji broj životinja koji je potreban za ovu svrhu. LLNA nudi značajno poboljšanje u načinu na koji se životinje koriste za testiranje kontaktne senzibilizacije. LLNA se zasniva na razmatranju imunoloških pojava koje su stimulisane hemikalijama za vrijeme indukcione faze senzibilizacije. Za razliku od ispitivanja na zamorcima, LLNA ne zahtijeva primjenu dermalnih reakcija preosjetljivosti. Ova metoda ne zahtijeva korišćenje adjuvansa, kao što je slučaj kod testa maksimizacije na zamorcima. Zbog toga LLNA smanjuje stres kod životinja. Uprkos prednostima ove metode u odnosu na tradicionalne testove na zamorcima, postoje određena ograničenja koja mogu zahtijevati tradicionalna ispitivanja na zamorcima (npr. lažno negativni rezultati LLNA sa nekim metalima, lažno pozitivni rezultati sa nekim iritansima kože).

1.2. Princip metode

Osnovni princip u LLNA je da senzibilišuće supstance dovode do primarne proliferacije limfocita u limfnom čvoru koji drenira mjesto primjene hemikalije. Ova proliferacija je proporcionalna primjenjenoj dozi (i potenciji alergena) i predstavlja jednostavno sredstvo za dobijanje objektivne, kvantitativne mjere senzibilizacije. LLNA procjenjuje ovu proliferaciju kao odnos doza-odgovor u kojem se proliferacija u ispitivanim grupama uporeĐuje sa onom kod kontrola tretiranih rastvaračem. Odnos proliferacije u tretiranim grupama prema onima u kontrolama rastvarača, nazvana "indeks stimulacije", određuje se i najmanje je tri, prije nego što se ispitivana supstanca dalje ocjenjuje kao potencijalno senzibilišuća za kožu. Ovde opisane metode zasnivaju se na korišćenju radioaktivnog obilježavanja kako bi se izmjerila proliferacija

ćelija. Drugi pokazatelji ispitivanja za ocjenjivanje proliferacije se primjenjuju ukoliko postoji opravdanje i odgovarajuća naučna podrška, uključujući potpune navode i opis metodologije.

1.3. Opis metode

1.3.1. Pripreme

1.3.1.1. Uslovi smještaja i ishrane

Životinje su smještene pojedinačno. Temperatura prostorija za eksperimentalne životinje je 22°C (±3°C). Relativna vlažnost je najmanje 30% i ne prelazi 70% osim za vrijeme čišćenja prostorija. Ciljna vlažnost je 50% do 60%. Svijetlo je vještačko sa sekvencama od 12 sati svijetla i 12 sati mraka. Koristi se konvencionalna laboratorijaska ishrana uz slobodan pristup vodi za piće.

1.3.1.2. Priprema životinja

Životinje se biraju nasumice i označavaju da bi se omogućila identifikacija jedinki (ali ne označavanjem ušiju na bilo koji način) i drže se u kavezima najmanje pet dana prije početka doziranja kako bi se aklimatizovale na laboratorijaske uslove. Prije početka tretmana sve životinje se pregledaju da se utvrdi da nemaju vidljivih lezija na koži.

1.3.2. Uslovi ispitivanja

1.3.2.1. Eksperimentalne životinje

Za ovaj test koristi se miš. Ispitivanje se izvodi na mladim odraslim ženskama miševa soja CBA/Ca ili CBA/J, koje nisu ranije rađale i nisu gravidne. Na početku studije životinje su između 8 i 12 nedjelja stare i varijacija u tjelesnoj masi životinja je minimalna i ne prelazi 20% prosječne tjelesne mase. Drugi sojevi i mužjaci se koriste kada se prikupi dovoljno podataka da se pokaže da ne postoje značajne razlike u LLNA odgovoru između određenih sojeva i/ili polova.

1.3.2.2. Provjera pouzdanosti

Pozitivne kontrole se koriste kako bi se pokazale odgovarajuće osobine testa i kompetentnost laboratorijae da uspješno obavi studiju. Pozitivna kontrola dovodi do pozitivnog LLNA odgovora pri nivou ekspozicije za koji se očekuje da da povećanje indeksa stimulacije (SI) >3 u odnosu na negativnu kontrolnu grupu. Doza pozitivne kontrole se bira tako da indukcija bude jasna ali ne prekodnosna. Poželjno je primjeniti supstance: heksil cinamin aldehid (CAS broj 101-86-0, EINECS broj 202-983-3) i merkaptobenzotiazol (CAS broj 149-30-4, EINECS broj 205-736-8). Postoje okolnosti u kojima se, uz dovoljno opravdanje, koriste druge kontrolne supstance koje zadovoljavaju gore navedene kriterijume. Grupa pozitivne kontrole je potrebna u svakom testu, postoje situacije u kojima će laboratorijae imati istorijske podatke pozitivne kontrole koji pokazuju konzistentnost zadovoljavajućeg efekta tokom šestomjesečnog ili dužeg perioda. U tim slučajevima je pogodno reĐe testiranje s pozitivnim kontrolama u periodima kraćim od 6 mjeseci.

Mada se pozitivna kontrolna supstanca ispituje u vehikulumu za koje je poznato da izaziva konzistentan odgovor (npr. aceton: maslinovo ulje), dolazi do nekih propisanih situacija u kojima je potrebno testiranje nestandardnog vehikuluma (klinički/hemijski relevantna formulacija). U takvim situacijama ispitati moguću interakciju pozitivne kontrole sa ovim nekonvencionalnim vehikulumom.

1.3.2.3. Broj životinja, dozni nivoi i izbor vehikuluma

Ispitivanje se vrši na najmanje četiri životinje po doznoj grupi, sa najmanje tri koncentracije ispitivane supstance, plus grupa negativne kontrole koja se tretira samo vehikulumom za ispitivanu supstancu i, ako odgovara, pozitivna kontrola. U slučajevima u kojima se prikupljaju podaci o pojedinačnim životinjama, koristi se najmanje pet životinja po doznoj grupi. Osim u slučaju odsustva tretmana ispitivanom supstancom, sa životinjama u kontrolnoj grupi postupati na isti način kao i sa životinjama u tretiranim grupama.

Izbor doze i vehikuluma je zasnovan na preporukama iz literaure. Doze se biraju iz niza koncentracija: 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2.5%, 1%, 0.5%, itd. Kada su dostupni, razmotriti postojeće podatke o akutnoj toksičnosti i iritaciji kože prilikom izbora tri uzastopne koncentracije tako da najveća koncentracija maksimizuje izlaganje uz izbjegavanje sistemske toksičnosti i prekodnosne lokalne iritacije kože.

Vehikulum se bira na osnovu maksimizacije ispitivanih koncentracija i rastvorljivosti uz pravljenje rastvora/suspenzije koja odgovara za primjenu ispitivane supstance. Preporučeni vehikulumi (navedeni od više ka manje odgovarajućim) su aceton/maslinovo ulje (4:1 v/v), dimetilformamid, metil etil keton, propilen glikol i dimetil sulfoksid, ali se mogu koristiti i drugi uz zadovoljavajuće naučno obrazloženje. U određenim situacijama je neophodno da se koristi klinički relevantni rastvarač ili komercijalna formulacija u kojoj se ispitivana supstanca stavlja na tržište kao dodatna kontrola. Pažnju posvetiti da se obezbjedi da se hidrofilni materijali inkorporiraju u sistem vehikuluma, koji vlaži kožu i ne skida se trenutno. Ne koriste se potpuno vodeni vehikulumi.

1.3.3. Postupak ispitivanja

1.3.3.1. Eksperimentalni raspored Eksperimentalni raspored studije:

Dan 1:

Pojedinačno se identifikuju životinje i bilježi se tjelesna masa svake životinje. Započinje se aplikaciju 25 µl odgovarajućeg rastvora ispitivane supstance, samog vehikuluma ili pozitivne kontrole (kako je odgovarajuće) na poleĐinu svakog uha.

Dani 2 i 3:

Ponavlja se postupak aplikacije koji je primjenjen dana 1.

Dani 4 i 5:

Bez tretmana.

Dan 6:

Bileži se tjelesna masa svake životinje. Ubrizgava se 250 µl rastvora soli sa fosfatnim puferom (u daljem tekstu: PBS) koja sadrži 20 µCi (7.4e + 8 Bq) 3H -metil timidina svim ispitivanim i kontrolnim miševima putem repne vene. Alternativno se ubrizgava 250 µl PBS koji sadrži 2 µCi (7.4e + 7 Bq) 125I jododeoksiuridina i 10-5 M fluorodeoksiuridina svim miševima putem repne vene.

Poslije pet sati životinje se žrtvuju. Isjeku se ušni drenažni limfni čvorovi svakog uha i sakupljaju u PBS za svaku eksperimentalnu grupu (pristup zbirne tretirane grupe). Alternativno se sjeku parovi limfnih čvorova pojedinačnih životinja i stavljaju u PBS za svaku životinju (individualni pristup).

1.3.3.2. Priprema suspenzija ćelija

Jedna suspenzija ćelija limfnih čvorova (u daljem tekstu: LNC) od zbirnih tretiranih grupa ili obostrano od pojedinačnih životinja priprema se mehaničkim razdavanjem kroz gazu od nerĐajućeg čelika mrežice 200 µm. Ćelije limfnog čvora dva puta se ispiraju s preostalim PBS i talože sa 5% trihlorsirćetnom kiselinom (u daljem tekstu: TCA) na 4 °C tokom 18 sati. Zrnca se ponovno suspenduju u 1 ml TCA i prenose u scintilacijske bočice koje sadrže 10 ml scintilacione tečnosti za ^{3}H-brojanje ili se direktno prenose u epruvete za gama brojenje za ^{125}I-prebrojavanje.

1.3.3.3. Određivanje proliferacije ćelija (inkorporirana radioaktivnost)

Inkorporiranje 3H-metil timidina se mjeri β-scintilacionim brojanjem kao raspadanje po minuti (u daljem tekstu: DPM). Inkorporiranje ^{125}I-jododeoksiuridina se mjeri ^{125}I-brojanjem i izražava kao DPM. Zavisno od pristupa, dodavanje se izražava kao DPM/tretirana grupa (pristup zbirne tretirane grupe) ili DPM/životinja (individualni pristup).

1.3.3.4. Zapažanja

1.3.3.4.1. Klinička zapažanja

Životinje pregledati jednom dnevno zbog kliničkih znakova, bilo lokalne iritacije na mjestu aplikacije ili zbog sistemske toksičnosti. Sva zapažanja se sistematično bilježe u pojedinačnim dokumentima koji se vode za svaku životinju.

1.3.3.4.2. Tjelesna masa

Kako je navedeno u dijelu 1.3.3.1. ove metode, individualne tjelesne mase životinja izmjeriti na početku ispitivanja i prilikom planiranog žrtvovanja životinja.

1.3.4. Izračunavanje rezultata

Rezultati su izraženi kao indeks stimulacije (u daljem tekstu: SI). Kada se koristi pristup zbirne tretirane grupe, SI se dobija dijeljenjem zbirne radioaktivne inkorporacije za svaku tretiranu grupu sa inkorporacijom zbirne grupe kontrole vehikuluma. Na ovaj način se dobija srednji SI. Prilikom korišćenja individualnog pristupa, SI se dobija dijeljenjem srednje DPM/životinja unutar svake grupe ispitivane supstance i grupe pozitivne kontrole srednjom DPM/životinja za kontrolnu grupu rastvarača/vehikuluma. Srednji SI za kontrole tretirane vehikulumom je tada 1.

Korišćenje individualnog pristupa za iizračunavanje SI omogućava statističku analizu podataka. Prilikom izbora odgovarajuće metode statističke analize istraživač vodi računa o mogućim nejednakostima varijansi i drugim relevantnim problemima koji mogu da zahtijevaju transformaciju podataka ili neparametarske statističke analize. Adekvatni pristup za interpretaciju podataka je da se ocjene svi individualni podaci tretiranih i kontrola vehikuluma i da se iz njih izvede najbolja kriva doza-odgovor, uzimajući u obzir granice pouzdanosti. Istraživač vodi računa o mogućim "nepodobnim" reakcijama kod pojedinih životinja unutar grupe koje zahtijevaju korišćenje alternativne mjere odgovora (npr. mediana, a ne srednja vrijednost) ili eliminaciju nepodobnih rezultata.

Proces donošenja odluka u pogledu pozitivnog odgovora uključuje indeks stimulacije ≥3 zajedno sa razmatranjem odnosa doza-odgovor i, kada odgovara, statistički značaj.

Ukoliko je neophodno razjasniti dobijene rezultate, razmotriti razna svojstva ispitivane supstance, uključujući i to da li ima strukturne sličnosti sa supstancama za koje je poznato da su senzibilišuće za kožu, da li uzrokuje prekodnosnu iritaciju kože i prirodu opaženog odnosa doze i odgovora.

2. Podaci

Podaci se navode tabelarno. Navode se srednje i pojedinačne DPM vrijednosti i indeksi stimulacije za svaku doznu grupu (uključujući kontrolu vehikuluma).

3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o: 1) Ispitivanoj supstanci:

- identifikacioni podaci (npr. CAS broj, ukoliko je dostupan; izvor; čistoću; poznate nečistoće; broj serije);
- fizičku prirodu i fizička i hemijska svojstva (npr. isparljivost, stabilnost, rastvorljivost);
- u slučaju smješe, sastav i relativna zastupljenost (procenat) sastojaka.

2) Vehikulumu:

- identifikacioni podaci (čistoća; koncentracija, gde odgovara; korišćena zapremina);
- opravdanje za izbor vehikuluma.

3) Eksperimentalnim životinjama:

- soj korišćenih miševa;
- mikrobiološki status životinja, kada je poznat;
- broj, starost i pol životinja;
- izvor životinja, uslovi smještaja, ishrana, itd.

4) Uslovima ispitivanja:

- detalji o pripremi ispitivane supstance i primjeni;
- opravdanje za izbor doze, uključujući rezultate studije raspona, ukoliko je obavljena; korišćen vehikulum i koncentracije ispitivne supstance i ukupna količina primjenjene supstance;
- detalji o kvalitetu hrane i vode (uključujući vrstu ishrane/izvor, izvor vode).

5) K- sažetak rezultata zadnje provjere pouzdanosti uključujući podatke o supstanci, koncentraciji i korišćenom vehikulumu;

- podaci o istovrijemenoj i/ili istorijskoj pozitivnoj i negativnoj kontroli za laboratorijau koja vrši ispitivanje.

6) Rezultatima:

- pojedinačna tjelesna masa životinja na početku doziranja i u vrijeme planiranog žrtvovanja;
- tabela srednjih (pristup zbirne tretirane grupe) i individualnih (individualni pristup) DPM vrijednosti kao i raspon vrijednosti za oba pristupa i stimulacioni indeksi za svaku doznu grupu (uključujući kontrolu vehikuluma);

- statistička analiza, kad to odgovara;

- vrijeme pojave i znaci toksičnosti, uključujući iritaciju kože na mjestu primjene, ukoliko ih ima, za svaku životinju.

7) Obrazloženju rezultata:

- kratak komentar rezultata, analiza odnosa doza-odgovor i statističke analize, kada odgovara, sa zaključkom da li treba da se ispitivana supstanca smatra senzibilišućom za kožu.

B.43. STUDIJA NEUROTOKSIČNOSTI KOD GLODARA

1. Metoda ispitivanja

Ova metoda odgovara metodi OECD: TG 424 (1997).

Ova metoda ispitivanja je osmišljena za dobijanje podataka potrebnih za potvrdu ili dalju karakterizaciju potencijalne neurotoksičnosti hemikalija kod odraslih životinja. Kombinuje se sa postojećim metodama ispitivanja za studije toksičnosti ponovljene doze ili obavljati kao posebna studija. Konsultuje se OECD vodič oko pomoći pri osmišljavanju studije zasnovane na ovoj metodi ispitivanja. Navedeno je važno kod razmatranja modifikacija opažanja i postupaka ispitivanja kao što se preporučuje za rutinsku primjenu ove metode. Pripremljen je dokument sa smjernicama kako bi omogućio izbor drugih postupaka ispitivanja za upotrebu u posebnim okolnostima.

Procjena razvojne neurotoksičnosti nije predmet ove metode.

1.1. Uvod

U procjeni i evaluaciji toksičnih karakteristika hemikalija uzeti u obzir potencijal za neurotoksične efekte. Metoda za sistemsku toksičnost, ponovljena doza već uključuje posmatranja koja se

odnose na potencijalnu neurotoksičnost. Ova metoda ispitivanja koristi se pri osmišljavanju studije za dobijanje daljih podataka o ili za potvrdu neurotoksičnih efekata opaženih u studijama za sistemske toksičnost, ponovljena doza. Razmatranje potencijalne neurotoksičnosti određenih grupa hemikalija ukazuje na to da se one ocjenjuju ovom metodom bez prethodnih indikacija potencijalne neurotoksičnosti iz studija sistemske toksičnosti, ponovljena doza. Takva razmatranja npr. uključuju:

- posmatranje neuroloških znakova ili neuropatoloških lezija u studijama toksičnosti različitih od onih iz studija sistemsku toksičnost, ponovljena doza ili

- strukturnu vezu ili druge podatke koji ih povezuju sa poznatim neurotoksikantima.

Može da bude i drugih slučajeva u kojima je korišćenje ove metode ispitivanja prikladno. Ova metoda je razvijena da se prilagodi da zadovolji posebne potrebe za potvrdom specifične histopatološke i bihevioralne neurotoksičnosti hemikalije, kao i da obezbijedi karakterizaciju i kvantifikaciju neurotoksičnih reakcija.

U prošlosti se neurotoksičnost izjednačavala sa neuropatijom uključujući neuropatološke lezije ili neurološke disfunkcije kao što su napadi, paraliza ili tremor. Iako je neuropatija važna manifestacija neurotoksičnosti, jasno je da postoje mnogi drugi znaci toksičnosti za nervni sistem (npr. gubitak motorne koordinacije, deficiti čula, disfunkcije učenja i pamćenja) koji se ne moraju oslikavati u neuropatiji ili drugim vrstama studija.

Ova metoda ispitivanja neurotoksičnosti je osmišljena da detektuje glavne neurobihevioralne i neuropatološke efekte kod odraslih glodara. Bihevioralni efekti, čak i odsustvu morfoloških promjena, mogu da održavaju štetni uticaj na organizam, ali nisu sve bihevioralne promjene specifične za nervni sistem. Zbog toga, bilo koje promjene koje su opažene treba ocjeniti u vezi sa korelativnim histopatološkim, hematološkim ili biohemijskim podacima kao i sa podacima o drugim tipovima sistemske toksičnosti. Ispitivanje koje se obavlja u ovoj metodi je usmjereno na davanje karakterizacije i kvantifikacije neurotoksičnih efekata što uključuje specifične histopatološke i bihevioralne postupke koji mogu biti nadalje podržani elektrofiziološkim i/ili biohemijskim istraživanjima.

Neurotoksikanti mogu da Dijeluju na brojna ciljna mjesta u okviru nervnog sistema i putem različitih mehanizama. Nijedan sistem ispitivanja ne može u potpunosti da procjeni neurotoksični potencijal svih supstanci, pa može biti korisno iskoristiti druga in vivo ili in vitro ispitivanja koja su specifična za tip opažene ili predviĐene neurotoksičnosti.

Ova metoda ispitivanja može da se koristi zajedno sa smjernicama datim u OECD vodiču kako bi se osmislile studije čija je namjera da dalje karakterišu ili povećaju osjetljivost kvantifikacije odnosa doza-odgovor kako bi bolje ocjenili dozu bez štetnog efekta ili potvrdili poznatu ili verovatnu opasnost od hemikalije. Mogu se osmisliti studije koje identifikuju i ocjenjuju neurotoksični mehanizam (mehanizme) ili potkrepljuju već rapoložive podatke korišćenjem postupaka neurobihevioralne i neuropatološke opservacije. Takve studije ne treba da kopiraju podatke koji bi bili generisani korišćenjem standardnih postupaka preporučenih u ovoj metodi. Podaci su već dostupni i nisu neophodni za tumačenje rezultata studije.

Ova metoda ispitivanja neurotoksičnosti, kad se primjenjuje sama ili u kombinaciji, daje rezultate koji mogu:

- da identifikuju da li je nervni sistem trajno ili reverzibilno pod uticajem ispitivane hemikalije;

- da doprinesu karakterizaciji promjena nervnog sistema koje se povezuju sa izlaganjem hemikaliji i razumevanju relevantnog mehanizma;

- da odrede odnose doza-odgovor i vrijeme-odgovor kako bi se procjenila doza bez štetnog efekta (koja se može koristiti pri uspostavljanju bezbednosnih kriterijuma za hemikaliju).

Ova eksperimentalna metoda koristi oralnu primjenu ispitivane supstance. Drugi putevi primjene (npr. dermalni ili inhalacioni) mogu biti prikladniji i mogu zahtijevati modifikaciju preporučenih postupaka. Razmatranja o izboru puta primjene zavise od profila ljudskog izlaganja i rapoloživih toksikoloških ili kinetičkih informacija.

1.2. Definicije

Štetni efekat jeste bilo koja promjena u odnosu na osnovno stanje koja je povezana sa tretmanom i koja umanjuje sposobnost organizma da preživi, razmnožava se ili se prilagodi životnoj sredini.

Doza jeste količina primjenjene ispitivane supstance. Doza se izražava kao masa (g, mg) ili kao masa ispitivane supstance po jedinici mase eksperimentalne životinje (npr. mg/kg) ili kao konstantna koncentracija u hrani (ppm).

Doziranje jeste opšti pojam koji se sastoji od doze, njene frekvencije i trajanja doziranja.

Neurotoksičnost jeste štetna promjena u strukturi ili funkciji nervnog sistema koja je poslijedica izlaganja hemijskom, biološkom ili fizičkom agensu.

Neurotoksikant jeste bilo koja hemikalija, biološki ili fizički agens koji ima potencijal da uzrokuje neurotoksičnost.

NOAEL jeste skraćenica za dozu bez štetnog efekta (no-observed-adverse effect level) i predstavlja najviši nivo doze pri kome nisu opaženi štetni efekti povezani sa tretmanom.

1.3. Princip metode

Ispitivana supstanca se primjenjuje oralnim putem u rasponu doza na nekoliko grupa laboratorijaskih glodara. Obično su potrebne ponovljene doze i režim doziranja može biti 28 dana, subhronično (90 dana) ili hronično (1 godina ili duže). Postupci opisani u ovoj eksperimentalnoj metodi mogu se koristiti i u studiji akutne neurotoksičnosti. Ispitivanje na životinjama vrši se kako bi se omogućila detekcija ili karakterizacija bihevioralnih i/ili neuroloških abnormalnosti. Raspon ponašanja na koje utiču neurotoksikanti procjenjuje se tokom perioda posmatranja. Na kraju ispitivanja, podgrupa životinja oba pola iz svake grupe uzorkuje se in situ i pripremaju se i ispituju preseci mozga, kičmene moždine i perifernih nerava.

Tokom izvoĐenja studije kao samostalne studije za skrining neurotoksičnosti ili za karakterizaciju neurotoksičnih efekata, životinje u svakoj grupi koje se ne koriste za uzorkovanje i kasnija histopatološka ispitivanja (Tabela1.) Mogu biti korišćene za specifične neurobihevioralne, neuropatološke, neurohemijske ili elektrofiziološke postupke koji mogu zameniti podatke dobijene standardnim ispitivanjima koje zahtijeva ova metoda. Ovi dodatni postupci mogu biti posebno korisni kada empirijska posmatranja ili očekivani efekti ukazuju na specifičnu vrstu ili ciljno mjesto neurotoksičnosti hemikalije. Preostale životinje se mogu koristiti za procjene kao što su one koja zahtijevaju metode ispitivanja za studije toksičnosti, ponovljena doza kod glodara.

Kad se postupci iz ove metode ispitivanja kombinuju sa onima iz drugih metoda, potreban je dovoljan broj životinja kako bi se zadovoljili zahtjevi za posmatranja iz obe studije.

1.4. Opis metode

1.4.1. Izbor životinjske vrste

Preporučena vrsta glodara je pacov, mada se uz opravdanje mogu koristiti i druge vrste. Treba koristiti uobičajene laboratorijaske sojeve zdravih mladih odraslih životinje. Koriste se ženke koje nisu ranije raĐale i koje nisu trudne. Doziranje uobičajeno treba početi što je ranije moguće nakon odbijanja od sise, najbolje ne kasnije nego što životinje navrše šest nedjelja i u svakom slučaju pre nego životinje navrše devet nedjelja. Kada se ova studija kombinuje sa drugim studijama, ova starost se može prilagoditi. Na početku studije varijacija u tjelesnoj masi životinja ne smije da prelazi ± 20 % srednje mase za svaki pol. Kada se obavlja kratkoročna studija ponovljene doze kao preliminarna dugoročnoj studiji, u obe studije treba koristiti životinje istog soja i iz istog izvora.

1.4.2. Uslovi smještaja i ishrane

Temperatura prostorija za eksperimentalne životinje treba da bude 22°C (± 3 °C). Relativna vlažnost treba treba da bude najmanje 30% i da ne prelazi 70% osim za vrijeme čišćenja prostorija. Ciljna vlažnost treba da bude 50% do 60%. Svetlo treba da bude vještačko sa sekvencama od 12 sati svijetla i 12 sati mraka. Buku treba smanjiti na minimum. Može se koristiti konvencionalna laboratorijaska ishrana uz neograničene količine vode za piće.

Izbor ishrane može biti uslovljen potrebom da se obezbjedi odgovarajuća smješa ispitivane supstance koja se primjenjuje ovom metodom. Životinje se smještaju pojedinačno ili se drže u malim grupama istog pola.

1.4.3. Priprema životinja

Zdrave mlade životinje se slučajnim izborom raspoređuju u grupe. Kaveze treba rasporediti na način da se svedu na minimum mogući efekti zbog njihovog rasporeda. Životinje se jedinstveno identifikuju i drže u kavezima najmanje pet dana pre početka ispitivanja kako bi se aklimatizovale na laboratorijaske uslove.

1.4.4. Put primjene i priprema doza

Ova metoda ispitivanja posebno se odnosi na oralnu primjenu ispitivane supstance. Oralna primjena može biti putem prisilnog hranjenja, putem hrane, vode za piće ili kapsulama. Drugi putevi primjene (npr. dermalni ili inhalacioni) mogu se koristiti ali zahtijevaju modifikaciju preporučenih postupaka. Razmatranja o izboru puta primjene zavise od profila izlaganja ljudi i rapoloživih toksikoloških ili kinetičkih podataka. Treba naznačiti objašnjenje za izbor puta primjene kao i modifikacije postupaka ove metode ispitivanja.

Kad je neophodno, ispitivana supstanca se može rastvoriti ili suspendovati u odgovarajućem vehikulumu. Preporučuje se korišćenje vodenog rastvora/suspenzije kao prvi izbor, zatim razmatranje primjene rastvora/suspenzije u ulju (npr. kukuruzno ulje) i zatim mogući rastvori/suspenzije u drugom vehikulumu. Toksične karakteristike vehikuluma moraju biti poznate. Treba razmotriti i sljedeće karakteristike vehikuluma: efekti vehikuluma na apsorpciju, raspoDijelu, metabolizam ili zadržavanje ispitivane supstance koji mogu izmjeniti njene toksične karakteristike; kao i efekte unosa hrane ili vode ili nutritivni status životinja.

1.5. Postupci

1.5.1. Broj i pol životinja

Kada se studija izvodi kao posebna studija, treba koristiti najmanje 20 životinja (10 ženki i 10 mužjaka) u svakoj doznoj i kontrolnoj grupi za ocjenjivanja detaljnih kliničkih i funkcionalnih opažanja. Od najmanje pet mužjaka i pet ženki odabranih od tih 10 mužjaka i 10 ženki, treba uzeti uzorke in situ i iste koristiti za detaljnu neurohistopatologiju na kraju studije. U slučajevima kada se na znake neurotoksičnih efekata posmatra samo ograničen broj životinja u datoj doznoj grupi, treba razmotriti da se te životinje uključe među one odabrane za uzorkovanje. Kada se studija obavlja u kombinaciji sa studijom toksičnosti sa ponovljenom dozom, treba koristiti odgovarajući broj životinja kako bi se zadovoljili ciljevi obe studije. Minimalni broj životinja po grupi za razne kombinacije ispitivanja je prikazan u Tabeli 1. Ukoliko se planiraju žrtvovanja tokom ispitivanja ili ukoliko se planiraju grupe za oporavak za posmatranje reverzibilnosti, perzistencije ili odložene pojave toksičnih efekata nakon tretmana ili kada se razmatraju dodatna posmatranja, broj životinja mora biti povećan kako bi se obezbjedilo da bude dostupan dovoljan broj životinja potrebnih za posmatranje i histopatologiju.

Tabela 1: Minimalni broj životinja po grupi kada se studija neurotoksičnosti izvodi odvojeno ili u kombinaciji sa drugim studijama

	Studija neurotoksičnosti sprovedena kao			
	Posebna studija	Kombinovana sa 28-dnevnom studijom	Kombinovana sa 90-dnevnom studijom	Kombinovana sa studijom hronične toksičnosti
Ukupan broj životinja po grupi	10 mužjaka i 10 ženki	10 mužjaka i 10 ženki	15 mužjaka i 15 ženki	25 mužjaka i 25 ženki
Broj životinja odabranih za funkcionalna ispitivanja uključujući detaljno kliničko posmatranje	10 mužjaka i 10	10 mužjaka i 10 ženki	10 mužjaka i 10 ženki	10 mužjaka i 10 ženki

	ženki			
Broj životinja odabranih za uzorkovanje in situ u neurohistopatologiju	5 mužjaka i 5 ženki	5 mužjaka i 5 ženki	5 mužjaka i 5 ženki	5 mužjaka i 5 ženki
Broj životinja odabranih za posmatranja toksičnosti ponovljene doze/subhronične/hronične, hematologiju, medicinsku biohemiju, histopatologiju itd. Kako je naznačeno u Vodiču		5 mužjaka i 5 11 ženki	10 mužjaka i 10 ženki	20 mužjaka i 20 ženki
Dodatna posmatranja kada je odgovarajuće	5 mužjaka i 5 ženki			

1.5.2. Tretirana i kontrolna grupa

Treba koristiti najmanje tri dozne i jednu kontrolnu grupu, ali ukoliko se iz procjene drugih podataka ne očekuju efekti pri ponovljenoj dozi od 1.000 mg/kg tjelesna masa/dan, može se obaviti ispitivanje granične doze. Ukoliko nema rapoloživih odgovarajućih podataka, može se izvesti studija traženja raspona kao pomoć pri odreĐivanju doza koje bi se koristile. Osim tretiranja ispitivanom supstancom, sa životinjama u kontrolnoj grupi treba postupati isto kao sa onima iz ispitivane grupe. Ukoliko se pri primjeni ispitivane supstance koristi vehikulum, kontrolna grupa treba da primi vehikulum u najvećoj zapremini koja se koristi.

1.5.3. Provjera pouzdanosti

Laboratorijaa koja obavlja studiju treba da navede podatke kojima dokazuje svoju mogućnost da izvede ispitivanje i osjetljivost korišćenih postupaka. Takvi podaci treba da pruže dokaze o mogućnosti detekcije i kvantifikacije, kako odgovara, promjenama u različitim pokazateljima ispitivanja preporučenim za posmatranje, kao što su autonomni znaci, senzorska reaktivnost, snaga hvatanja i motorna aktivnost. Podaci o hemikalijama koji uzrokuju različite vrste neurotoksičnih efekata i koji se mogu koristiti kao supstance pozitivne kontrole..Istorijski podaci mogu se koristiti ukoliko ključni aspekti eksperimentalnih postupaka ostanu isti. Periodično ažuriranje istorijskih podataka se preporučuje. Novi podaci koji pokazuju neprekidnu osjetljivost postupaka treba da budu razvijeni kada se promjeni neki ključni element izvoĐenja ispitivanja ili postupka od strane laboratorijae.

1.5.4. Izbor doza

Nivoe doza treba izabrati uzimajući u obzir bilo koju ranije uočenu toksičnost i rapoložive kinetičke podatke za ispitivano jedinjenje ili slične materijale. Najvišu dozu treba izabrati sa ciljem izazivanja neurotoksičnih efekata ili jasnih sistemskih toksičnih efekata. Potom treba izabrati opadajući niz doznih nivoa sa ciljem dokazivanja bilo kog odgovora koji je u vezi sa dozom i NOAEL pri najnižem doznom nivou. Doze treba odrediti tako da primarni toksični efekti na nervni sistem mogu da se razlikuju od efekata koji se povezuju sa sistemskom toksičnošću.

Dva do tri intervala su često optimum i pored četvrte ispitivane grupe, često se preporučuje da se koriste vrlo veliki intervali (npr. više od faktora 10) između doza. Kada postoji dobra procjena ljudske izloženosti, to takođe treba uzeti u obzir.

1.5.5. Ispitivanje granične doze

Ukoliko studija korišćenjem jedne doze od najmanje 1.000 mg/kg TM/dan, korišćenjem opisanih postupaka, ne pokaže nikakve neurotoksične efekte, i ako se toksičnost ne može očekivati na osnovu podataka o strukturno sličnim jedinjenjima, studija u kojoj bi se koristile tri doze ne mora se smatrati neophodnom. Očekivana izloženost ljudi može indikovati potrebu za korišćenjem veće oralne doze u ispitivanju granične doze. Uključuje 5 životinja odabranih za funkcionalna ispitivanja I detaljno kliničko posmatranje kao dio studije neurotoksičnosti maksimalni nivo izlaganja. Za izvođenje studije akutne oralne toksičnosti, doza za ispitivanje granične doze treba da bude najmanje 2.000 mg/kg.

1.5.6. Primjena doza

Životinje se svakodnevno doziraju ispitivanom supstancom, sedam dana nedeljno, tokom perioda od najmanje 28 dana. Korišćenje petodnevnog režima doziranja ili kraćeg izlaganja treba da bude opravdano. Kad se ispitivana supstanca primjenjuje prisilnim hranjenjem, isto treba učiniti u jednoj dozi korišćenjem trbušne cijevi ili odgovarajućom intubacionom kanulom. Maksimalna zapremina tečnosti koji može biti primjenjena zavisi od veličine eksperimentalne životinje. Zapremina ne sme da prelazi 1 ml/100 g TM. Ipak, u slučaju vodenih rastvora može se uzeti u obzir korišćenje do 2 ml/100 g TM. Osim kod iritativnih i korozivnih supstanci koje će uobičajeno pokazati intenzivnije efekte pri višim koncentracijama, varijabilnost u ispitivanoj zapremini treba minimizirati podešavanjem koncentracije kako bi se osigurao konstantna zapremina pri svim nivoima doze.

Za supstance koje se primjenjuju putem hrane ili vode za piće, važno je osigurati da količine ispitivane supstance ne ometaju normalnu prehranu ili ravnotežu vode. Kada se ispitivana supstanca primjenjuje u hrani bilo kao konstantna prehrambena koncentracija (ppm) ili kada se koristi konstanti dozni nivo u smislu tjelesne mase životinja, alternativu treba naznačiti. Za supstance koje se primjenjuju prisilnim hranjenjem, doza se primjenjuje u slično vrijeme svakog dana i prilagođena je kako bi se zadržao konstantan dozni nivo u smislu tjelesne mase životinje. Kada se koristi ispitivanje sa ponovljenom dozom kao prethodno ispitivanje za dugoročnu studiju, onda u obe studije treba koristiti sličnu prehranu. Za studije akutne toksičnosti ako nije moguće dati jednu dozu, doza se može davati u manjim delovima tokom perioda koji ne prelaze 24 sata.

1.6. Posmatranja

1.6.1. Učestalost posmatranja i ispitivanja

Kod studija sa ponovljenom dozom, period posmatranja treba da pokrije period doziranja. Kod studija akutne toksičnosti, treba posmatrati 14-dnevni period nakon tretmana. Kod životinja u pratećim grupama koje se drže bez izlaganja za vrijeme nakon tretmana, posmatranja treba da pokriju i ovaj period.

Posmatranja treba obavljati dovoljno često kako bi se povećala vjerovatnost detekcije bilo kojih bihevioralnih i/ili neuroloških abnormalnosti. Posmatranja treba obavljati po mogućstvu u isto vrijeme svakog dana uzimajući u obzir period u kome se očekuje pojava efekata nakon doziranja. Frekvencija kliničkih posmatranja i funkcionalnih testova je data u Tabeli 2. Ukoliko kinetički ili drugi podaci koji su dobijeni u prethodnim studijama ukazuju na potrebu posmatranja u drugačijim periodima, treba usvojiti alternativni raspored kako bi se prikupio maksimalan broj informacija. Treba dati objašnjenje za promjenu rasporeda.

1.6.1.1. Posmatranja opšteg zdravstvenog stanja i mortaliteta/morbiditeta

Zdravstveno stanje svih životinja treba pažljivo posmatrati najmanje jednom dnevno, a dva puta dnevno posmatraju se mortalitet i morbiditet.

1.6.1.2. Detaljna klinička posmatranja

Na životinjama koje su izabrane za tu svrhu obavljaju se detaljna klinička opažanja (Tabela 1.) jednom pre prvog izlaganja (kako bi se omogućila upređivanja kod jedne jedinke) i u različitim intervalima u zavisnosti od trajanja studije (Tabela 2.). Detaljna klinička posmatranja na pratećim grupama treba obaviti na kraju perioda oporavka. Detaljna klinička opažanja se obavljaju izvan kaveza u standardnoj areni. Opažanja se pažljivo bilježe korišćenjem sistema ocjenjivanja koji uključuje kriterijume ili skale za svaku mjeru. Laboratorijaa jasno definiše kriterijume ili skale. Treba uložiti napor kako bi se obezbjedilo da varijacije u uslovima ispitivanja budu minimalne (ne sistematično povezane sa tretmanom) i da posmatranja obavljaju obučeni posmatrači koji nisu upoznati sa tretmanom.

Tabela 2: Frekvencija kliničkog posmatranja i funkcionalnih ispitivanja

Vrste posmatranja		Trajanje studije			
		Akutno	28-dana	90-dana	Hronično
Kod svih životinja	Opšte zdravstveno stanje	dnevno	dnevno	dnevno	dnevno
	Mortalitet	Dva puta	Dva puta	Dva puta	Dva puta
	Morbititet	dnevno	dnevno	dnevno	dnevno

Kod životinja odabranih za funkcionalna posmatranja	Detaljna klinička posmatranja	- prije prvog izlaganja - 8 sati poslije doziranja u očekivano vrijeme najvećeg efekta - na dan 7 i 14 poslije doziranja	- prije prvog izlaganja - poslije toga jednom nedeljno	- prije prvog izlaganja -jednom za vrijeme prve ili druge nedelje izlaganja - poslije toga mjesečno	- prije prvog izlaganja - jednom na kraju prvog mjeseca izlaganja -poslije toga svaka tri mjeseca
	Funkcionalna ispitivanja	- prije prvog izlaganja - 8 sati poslije doziranja u očekivano vrijeme najvećeg efekta - na dan 7 i 14 poslije doziranja	- prije prvog izlaganja - za vrijeme četvrte nedelje tretmana što je moguće bliže kraju perioda izlaganja	- prije prvog izlaganja - jednom za vrijeme prve ili druge nedelje izlaganja - poslije toga mjesečno	- prije prvog izlaganja - jednom na kraju prvog mjeseca izlaganja -poslije toga svaka tri mjeseca

Preporučljivo je struktuirano obavljati posmatranja po dobro definisanim kriterijuma (uključujući definiciju "normalnog raspona") i sistematično ih primjeniti na svaku životinju u svakom periodu posmatranja. "Normalni raspon" treba adekvatno da se dokumentuje. Bilježe se svi uočeni znaci. Kad god je moguće treba zabilježiti i veličinu uočenih znakova. Klinička opažanja treba da uključuju, ali ne i da budu ograničena na, promjene na koži, krznu, očima, sluznicama, pojava sekreta i ekskreta i autonomne aktivnosti (npr. lakrimacija, piloerekcija, veličina zenice, neobičan način disanja i/ili disanje na usta, bilo koje neobične znake uriniranja ili defekacije i bezbojni urin).

Bilježe se i bilo koji neuobičajeni efekti u pogledu položaja tijela, nivoa aktivnosti, (npr. povećano ili smanjeno istraživanje standardne arene) i koordinacije pokreta. Promjene u držanju (npr. klaćenje, ataksija), stavu (npr. pogrbljenost) i reakciji na postepene, smještanje ili drugi stimulusi okoline kao i prisustvo kloničnih ili toničnih pokreta, konvulzija ili tremora,

stereotipa (npr. preterano timarenje, neobični pokreti glave, ponavljajuće kretnje u krug) ili čudno ponašanje (npr. griženje ili preterano lizanje, samosakaćenje, hod unazad, vokalizacija) ili agresija takođe se bilježe.

1.6.1.3. Funkcionalna ispitivanja

Slično detaljnim kliničkim posmatranjima, funkcionalna ispitivanja takođe treba obavljati pre izlaganja, kao i često nakon toga, na svim životinjama koje su izabrane za tu svrhu (Tabela 1.). Učestalost funkcionalnih ispitivanja takođe zavisi od trajanja studije (Tabel2 2.). Pored perioda posmatranja iz Tabele 2, treba obavljati funkcionalna ispitivanja na pratećim grupama sve do usmrćenja. Funkcionalna ispitivanja treba da uključuju senzornu reaktivnost na stimuluse raznih vrsta (npr. zvučni, vizuelni i proprioceptivni stimulusi ocjenjivanje snage stiska i ocjenjivanje motorne aktivnosti). Motornu aktivnost treba mjeriti automatskom spravom kojom je moguće detektovati smanjenu i povećanu aktivnost. Ukoliko se koristi drugi definisani sistem, on mora biti kvantitativan i njegova osjetljivost i pouzdanost treba pokazati. Svaki uređaj treba testirati kako bi se obezbijedila pouzdanost tokom vremena i konzistentnost između uređaja. Više detalja o pokolonama koji se mogu pratiti nalazi se u literaturi. Ukoliko nema podataka (npr. struktura - aktivnost, epidemiološki podaci, druge studije toksičnosti) koji bi ukazivali na potencijalne neurotoksične efekte, razmatra se uključivanje specijalizovanijih testova senzorne ili motorne funkcije ili učenja i pamćenja kako bi se detaljnije proučili ti mogući efekti. Više podataka o specijalizovanim testovima dato je u literaturi.

Izuzetno, životinje koje pokazuju znake toksičnosti u obimu koji značajno ometa funkcionalno ispitivanje mogu biti izostavljene iz tog ispitivanja. Treba dati opravdanje za isključivanje tih životinja iz funkcionalnog ispitivanja.

1.6.2. Tjelesna masa i potrošnja hrane/vode

Za studije koje traju do 90 dana sve životinje treba mjeriti najmanje jednom nedeljno i treba izmjeriti potrošnju hrane (potrošnju vode kada se ispitivana supstanca unosi tim putem) takođe najmanje jednom nedeljno. Za dugoročne studije sve životinje treba mjeriti najmanje jednom nedeljno prvih 13 nedjelja, a potom najmanje jednom na svake 4 nedelje. Treba mjeriti potrošnju hrane (potrošnju vode kada se ispitivana supstanca unosi tim putem) takođe najmanje jednom nedeljno tokom prvih 13 nedjelja, a kasnije u približno tromesečnim intervalima osim ukoliko zdravstveno stanje ili promjena tjelesne mase ne nalažu drugačije.

1.6.3. Oftalmološka ispitivanja

Za studije koje traju duže od 28 dana treba obaviti oftalmološki pregled uz korišćenje oftalmoskopa ili sličnog odgovarajućeg instrumenta, prije primjene ispitivane supstance i po završetku studije, najbolje na svim životinjama, ali najmanje na onima iz grupa visoke doze i iz kontrolne grupe.

Ukoliko se primjete promjene u očima ili ukoliko klinički znaci ukazuju na potrebu, treba pregledati sve životinje. Kod dugoročnih studija oftalmološki pregled treba obavljati u 13. nedeljiu

Oftalmološki pregledi se ne moraju obavljati ukoliko su ovi podaci već dostupni iz drugih studija sličnog trajanja i sličnih doznih nivoa.

1.6.4. Hematološka i medicinsko-biohemijska ispitivanja

Kada se izvodi studija neurotoksičnosti u kombinaciji sa studijom sistemske toksičnosti sa ponovljenom dozom, treba uraditi hematološka ispitivanja i medicinsko-biohemijska određivanja kako je izloženo u metodi ispitivanja sistemske toksičnosti. Prikupljanje uzoraka treba obaviti tako da bilo koji potencijalni efekti na neuropatologiju budu svedeni na minimum.

1.6.5. Histopatološka ispitivanja

Neuropatološki pregled treba da bude osmišljen tako da dopuni i proširi opažanja iz in vivo faze studije. Tkiva najmanje 5 životinja/pol/grupa (Tabela 1.) treba fiksirati in situ, korišćenjem opštepriznatih tehnika perfuzije i fiksacije. Bilo koje uočljive promjene treba zabilježiti. Kad se studija izvodi kao samostalna studija za provjeru neurotoksičnosti ili za karakterizaciju neurotoksičnih efekata, preostale životinje mogu biti korišćene bilo za specifične neurobihevioralne, neuropatološke, neurohemijske ili elektrofiziološke postupke kao dopuna pokolonama i ispitivanjima koji su ovde opisani ili za povećanje broja jedinki pregledanih za histopatologiju. Ovi dodatni postupci su od posebne koristi kad empirijska opažanja ili očekivani efekti ukazuju na specifični tip ili ciljno mjesto neurotoksičnosti. Alternativno, preostale životinje mogu da se podvrgnu rutinskom patološkom ocjenjivanju kako je opisano u metodi za studije sa ponovljenom dozom.

Opšti postupak bojenja kao što je hematoksilin i eozin (u daljem tekstu: H&E) treba obaviti za sve uzroke tkiva u parafinu i treba izvesti mikroskopski pregled. Ukoliko se uoče znaci periferne neuropatije ili ako se na iste sumnja, potrebno je ispitati uzorke perifernog nervnog tkiva u plastici. Klinički znaci takođe mogu naznačiti dodatna mjesta za ispitivanje ili korišćenje posebnih postupaka bojenja. Odgovarajuće specijalne boje za pokazivanje specifičnih tipova patoloških promjena mogu biti od pomoći.

Na reprezentativnim presjecima centralnog i perifernog nervnog sistema treba izvršiti histološki pregled. Ispitivana područja obično uključuju: prednji mozak, središte cerebruma, uključujući presjek kroz hipokampus, srednji mozak, cerebelum, pons, produžena moždina, oko sa optičkim nervom i retinom, kičmenu moždinu i cervikalna i lumbalna zadebljanja, dorzalni koren ganglia, dorzalna i ventralna vlakna korenova, proksimalni išijasni nerv, proksimalni tibijalni nerv (u kolenu) i grane tibijalnog nerva za mišić lista. Presjeci kičmene moždine i perifernih nerava treba da uključe i poprečne ili transverzalne i uzdužne prejseke. Treba obratiti pažnju na vaskulaturu nervnog sistema. Uzorak skeletnog mišića, posebno mišića lista, takođe treba pregledati. Posebnu pažnju treba obratiti na mjesta sa celularnom ili fibroznom strukturom i uzorak CNS i PNS za koji se zna da je posebno pogođen neurotoksikantima.

Preporučuje se postepeno ispitivanje uzoraka tkiva u kome se preseci grupe visoke doze prve upoređuju sa onima iz kontrolne grupe. Ukoliko se ne uoče neuropatološke promjene u uzorcima iz ovih grupa, dalja analiza nije potrebna. Ukoliko se uoče neuropatološke promjene u grupi visoke doze, uzorak svakog potencijalno pogođenog tkiva iz srednjih i nižih doznih grupa treba kodirati i redom ispitati.

Ukoliko se pronađu bilo kakve neuropatološke promjene u kvalitativnoj analizi, treba obaviti drugo ispitivanje na svim područjima nervnog sistema koji pokazuju takve promjene. Presjeke iz svih doznih grupa svih potencijalno zahvaćenih regija treba kodirati i ispitati nasumice bez poznavanja koda. Frekvenca i ozbiljnost svake lezije treba da budu zabilježene. Pošto se ocjene sve regije iz svih grupa kod se može dešifrovati i može se obaviti statistička analiza kako bi se ocjenio odnos doza-odgovor. Primjere različitih stepena ozbiljnosti svake lezije treba opisati. Neuropatološki nalazi treba da se ocjene u kontekstu bihejvioralnih posmatranja i mjerenja, kao i drugih podataka iz prethodnih i istovrijemenih studija sistemske toksičnosti ispitivane supstance.

2. Podaci

2.1. Obrada rezultata

Navode se pojedinačni podaci. Svi podaci se navode tabelarno. Za svaku ispitivanu ili kontrolnu grupu navode se: broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje su pronađene mrtve za vrijeme ispitivanja ili usmrćene iz humanih razloga, kao i vrijeme smrti ili humanog žrtvovanja, broj koji pokazuje znake toksičnosti, opis znakova toksičnosti koji su uočeni, uključujući vijreme nastanka, trajanje, vrstu i ozbiljnost bilo kojih toksičnih efekata, broj životinja koje pokazuju lezije, uključujući vrstu i ozbiljnost lezije (lezija).

2.2. Procjena i tumačenje rezultata

Nalazi studije se procjenjuju u pogledu incidence, ozbiljnosti i korelacije neurobihevioralnih i neuropatoloških efekata (neurohemijskih ili elektrofizioloških efekata takođe, ukoliko su uključena dodatna ispitivanja) ili bilo kojih drugih uočenih štetnih efekata. Kada je moguće, numerički rezultati se procjenjuju odgovarajućom opšteprihvaćenom statističkom metodom. Statističke metode se biraju prilikom osmišljavanja studije.

3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o: 1) Ispitivanoj supstanci:

- fizička priroda (uključujući izodnosiju, čistoću i fizička i hemijska svojstva); - identifikacioni podaci.

2) Vehikulumu (ako odgovara):

- opravdanje za izbor vehikuluma.

3) Eksperimentalnim životinjama:

- korišćena vrsta/soj;
- broj, starost i pol životinja;
- izvor, uslovi smještaja, aklimatizacija, ishrana, itd.;
- pojedinačne mase životinja na početku ispitivanja.

4) Uslovima ispitivanja:

- detalji o formulaciji ispitivane supstance/priprema ishrane, postignuta koncentracija, stabilnost i homogenost preparata:
- specifikacija primjenjenih doza, uključujući detalje o vehikulumu, zapremini i fizičkom obliku primjenjenog materijala;
- detalji o primjeni ispitivane supstance;

- obrazloženje za izabrane nivoe doza;
- obrazloženje za put primjene i trajanje izlaganja;
- konverzija koncentracije ispitivane supstance (ppm) iz ishrane/vode za piće u stvarnu dozu (mg/kg tjelesna masa / dan), ukoliko je primjenjivo;
- detalji o kvalitetu hrane i vode.

5) Pokolonama ispitivanja i posmatranja:
- detalji o svrstavanju životinja svake grupe u podgrupe za perfuziju;
- detalji o sistemu bodovanja, uključujući kriterijume i skale za svako mjerenje u detaljnim kliničkim posmatranjima;
- detalji o funkcionalnim ispitivanjima za senzornu reaktivnost na stimuluse različitih vrsta (npr. zvučni, vizuelni i proprioceptivni), za ocjenjivanje snage stiska, za ocjenjivanje motorne aktivnosti (uključujući detalje o automatskim spravama za detekciju aktivnosti), i drugim korišćenim pokolonama;
- detalji o oftalmološkim pregledima i ako odgovara hematološkim ispitivanjima i medicinsko-biohemijskim ispitivanjima sa relevantnim osnovnim vrijednostima;
- detalji specifičnih neurobihevioralnih, neuropatoloških, neurohemijskih ili elektrofizioloških postupaka.

6) Rezultatima:

- tjelesna masa/promjene tjelesne mase, uključujući tjelesnu masu pri žrtvovanju;
- potrošnja hrane i vode, ukoliko je primjenjivo;
- podaci o toksičnim efektima po polu i doznom nivou, uključujući znake toksičnosti ili smrtnost;
- priroda, ozbiljnost i trajanje (vrijeme nastanka i kasniji tok) detaljnih kliničkih nalaza (prolaznih ili ne);
- detaljan opis svih rezultata funkcionalnih ispitivanja;
- nalazi obdukcije;
- detaljan opis svih specifičnih neurobihevioralnih, neuropatoloških, neurohemijskih ili elektrofizioloških nalaza, ukoliko je primjenjivo;
- podaci o apsorpciji i metabolizmu, ukoliko su dostupni;
- statistička obrada rezultata, kad je primjenjivo.

7) Obrazloženju rezultata:
- podatke o efektu doze;
- odnos drugih toksičnih efekata do zaključka o neurotoksičnom potencijalu ispitivane supstance;
- doza bez štetnog efekta (NOAEL).

8) Zaključku:
- preporučuje specifičan Izvještaj o cjelokupnoj neurotoksičnosti ispitivane hemikalije.

B.44. APSORPCIJA PREKO KOŽE: IN VIVO METODA

1. Metoda ispitivanja

Ova metoda odgovara metodi OECD: TG 427 (2004).

1.1. Uvod

Ekspozicija mnogim hemikalijama se dešava putem kože dok se većina studija izvodi na laboratorijaskim životinjama peroralnom primjenom. In vivo ispitivanje perkutane apsorpcije navedeno u ovoj smjernici obezbjeđuje vezu koja je neophodna za ekstrapolaciju iz studija oralne toksičnosti kada se radi procjena bezbijednosti nakon dermalne ekspozicije.

Supstanca prolazi veliki broj slojeva ćelija kože prije nego što dospije u cirkulaciju. Za većinu supstanci sloj koji ograničava brzinu prolaza kroz kožu je stratum corneum koji se sastoji od mrtvih ćelija. Permeabilnost kroz kožu zavisi kako od lipofilnosti hemikalije tako i od debljine poljašnjeg sloja epidermisa, kao i od faktora kao što su molekulska masa i koncentracija supstance. Koža pacova i zečeva je permeabilnija od ljudske, dok je permeabilonost kože zamorčića i majmuna sličnija ljudskoj.

Metode za mjerenje perkutane apsorpcije se dijele u dvije kategorije: in vivo i in vitro. In vivo metoda obezbijeĐuje dobre podatke o apsorpciji kroz kožu kod različitih vrsta.

Nedavno su razvijene in vitro metode. One koriste transport kroz cio ili djelimični sloj životinjske ili ljudske kože u rezervoar sa tečnošću. In vitro metoda se opisuje u posebnoj metodi ispitivanja. Koristi se OECD vodič kao pomoć u izboru odgovarajuće metode ispitivanja apsorpcije kroz kožu za datu situaciju s obzirom da se u ovom vodiču nalaze detalji o pogodnosti kako in vitro tako i in vivo metoda.

In vivo metoda opisana u ovoj metodi omogućava određivanje penetracije ispitivane supstance kroz kožu u sistemski dio. Iako se u mnogim slučajevima in vitro studije perkutane apsorpcije pogodne, postoje mnoge situacije u kojima samo in vivo studije obezbjeđuju neophodne podatke.

Prednost in vivo metode je da koristi fiziološki i metabolički intaktan sistem, koristi vrste uobičajene za mnoge studije toksičnosti i modifikuje se za primjenu na drugim vrstama. Nedostaci su korišćenje živih životinja, potreba za korišćenjem radioaktivno obilježenog materijala da bi se dobili pouzdani rezultati, teškoće u odreĐivanju rane faze apsorpcije i razlike u permeabilnosti kože vrsta koja se najčešće koristi (pacova) i kože čovijeka.

Životinjska koža je permeabilnija i zbog toga na osnovu ovih ispitivanje se precjenjuje apsorpcija kroz kožu čovijeka. Kausitične/korozivne supstance ne ispitivati na živim životinjama.

1.2. Definicije

Neapsorbovana doza predstavlja dozu koja je isprana sa površine kože nakon ekspozicije i dio koji je prisutan na neokluzivnom pokrivaču, uključujući i dozu za koju je pokazano da je isparila sa kože tokom ispitivanja.

Apsorbovana doza (in vivo) obuhvata dozu koja se nalazi u urinu, u ispirku kaveza, fecesu, izdahnutom vazduhu (ako je mjereno), krvi, tkivima (ako su sakupljana) i u lešu životinje nakon uklanjanja dijela kože na koju je primjenjena supstanca.

Apsorbabilna doza predstavlja dozu u ili na koži nakon ispiranja.

1.3. Princip metode

Ispitivana supstanca (poželjno je da bude radioaktivno obilježena) primjenjuje se na ošišanu kožu životinja u jednom ili više doznih nivoa u obliku reprezentativnih preparata u upotrebi. Ispitivani preparati se ostavljaju u kontaktu sa kožom određeno vrijeme pod odgovarajućim pokrivačem (ne-okluzivni, semi-okluzivni ili okluzivni) da bi se spriječila ingestija ispitivanog preparata. Na kraju ekspozicije pokrivač se uklanja i koža čisti odgovarajućim sredstvom za čišćenje, pokrivač i materijal za čišćenje se čuvaju za analizu, a na kožu se nanosi novi pokrivač. Životinje se smještaju u pojedinačne metaboličke kaveze i ekskreti i izdahnuti vazduh se skupljaju za analizu, prije, tokom i nakon perioda ekspozicije. Sakupljanje izdahnutog vazduha se izostavlja ako postoji dovoljno podataka da je formiranje ispraljivih radioaktivnih metabolita minimalno ili se uopšte ne javlja. Svaka studija uključuje nekoliko grupa životinja koje će biti izložene ispitivanom preparatu. Jedna grupa će biti žrtvovana na kraju perioda ekspozicije. Potom će druge grupe biti žrtvovane u planiranim intervalima. Na kraju perioda sakupljanja uzoraka, ostatak životinja se žrtvuje, sakuplja se krv za analizu, uklanja se i čuva za analizu dio kože na koju je ispitivana supstanca primjenjena, a leševi se analiziraju za svaki neizlučeni materijal. Uzorci se analiziraju na odgovarajuće načine i određuje se stepen perkutane apsorpcije.

1.4. Opis metode

1.4.1. Izbor životinjske vrste

Koristi se pacov, ali sojevi bez dlake i vrste koje imaju brzine apsorpcije sličnije onoj kod ljudi takođe se koriste . Uključuju se mlade, odrasle i zdrave životinje istog pola (obično muškog pola) uobičajenih laboratorijaskih sojeva. Na početku studije odstepene u tjelesnoj masi životinje nije veće od ± 20% od prosječne mase. Na primjer, mužjaci pacova od 200 g do 250 g, na gornjoj polovini ovog raspona.

1.4.2. Broj i pol životinja

Grupa od najmanje četiri životinje istog pola se koriste za svaki ispitivani preparat i svako planirano vrijeme žrtvovanja. Svaka grupa životinja će biti žrtvovana nakon različitih vremenskih intervala, npr. na kraju perioda ekspozicije (obično 6 ili 24 sata) i u narednim prilikama (npr. 48 i 72 sata). Ako postoje podaci koji pokazuju suštinske razlike u dermalnoj toksičnosti između mužjaka i ženki, koristi se osjetljivi pol. Ako ne postoje takvi podaci, koristi se bilo koji od polova.

1.4.3. Uslovi smještaja i ishrane

Temperatura u prostoru za čuvanje eksperimentalnih životinja treba da bude 22 °C (± 3 °C). Relativna vlažnost treba da bude najmanje 30% i da ne prekoračuje 70% osim za vrijeme čišćenja prostora. Ciljna vlažnost treba da bude 50% do 60%. Osvjetljenje treba da bude vještačko sa periodom svijetlosti od 12 sati i periodom mraka od 12 sati.

Za ishranu može da se koristi uobičajena hrana za eksperimentalne životinje, koja treba da bude slobodno dostupna životinjama uz neograničen pristup vodi za piće. Za vrijeme studije, a po mogućstvu i za vrijeme aklimatizacije, životinje se smještaju u pojedinačne metaboličke kaveze. S obzirom da prosipanje hrane i vode mogu da kompromituju rezultate, vjerovatnoća za ovakve dogaĐaje treba da se minimalizuje.

1.4.4. Priprema životinja

Životinje se označavaju da bi mogle da se pojedinačno identifikuju i čuvaju se u kavezima najmanje pet dana prije početka studije da bi se aklimatizovale na laboratorijaske uslove.

Nakon aklimatizacije i približno 24 sata prije doziranja, region ramena i leĐa svake životinje se ošiša. Propustljivost oštećene kože je različita od one kod intaktne kože i zbog toga se izbjegava abrazija kože. Nakon šišanja i približno 24 sata prije primjene ispitivane supstance na kožu
(tačka 1.4.7. ove metode), površina kože se briše acetonom da bi se uklonio sebum. Dodatno pranje sapunima i vodom se ne sprovodi zbog toga što rezidue sapuna promovišu apsorpciju ispitivane supstance. Površina kože je dovoljno velika da obezbijedi pouzdano iizračunavanje apsorbovane količine ispitivane hemikalije po cm^2 kože, najmanje 10 cm^2. Ova površina je praktična za pacove od 200 g do 250 g TM. Nakon pripreme životinje se vraćaju u metaboličke kaveze.

1.4.5. Ispitivana supstanca

Ispitivana supstanca je entitet čija penetracione karakteristike se ispituju. Ispitivana supstanca je radioaktivno obilježena.

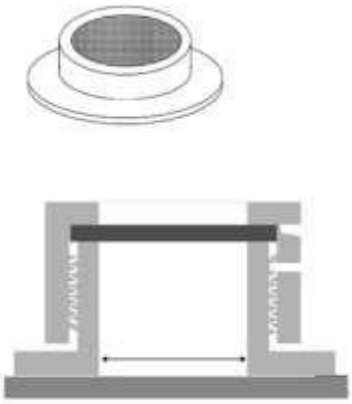
1.4.6. Ispitivani preparat

Preparat ispitivane supstance (npr. čista, razblažena hemikalija ili formulisani materijal koji sadrži ispitivanu hemikaliju koja se primjenjuje na kožu) je isti (ili realni surogat) kao onaj kojem će biti izloženi ljudi ili druga ciljna vrsta. Svako odstepene od preparata u upotrebi se opravdava. Kada je neophodno, ispitivna supstanca se rastvara ili suspenduje u odgovarajućem vehikulumu. Za vehikulume koji nisu voda upoznati apsorpcione karakteristike i moguće interakcije sa ispitivanom supstancom.

1.4.7. Primjena na kožu

Na koži se definiše određeni dio površine za aplikaciju. Poznata količina ispitivanog preparata se ravnodnosno nanosi na to mjesto. Ova količina imitira moguću ekpoziciju kod ljudi, tipično 1 mg/cm^2 do 5 mg/cm^2 za čvrste ili do 10 $\mu l/cm^2$ za tečnosti. Sve druge količine se opravdavaju uslovima očekivane primjene, ciljevima studije ili fizičkim svojstvima ispitivanog preparata. Nakon aplikacije, tretirano mjesto je zaštićeno od lizanja. Primjer tipične sprave dat je na Slici 1. Mjesto primjene se zaštiti neokluzivnim pokrivačem (npr. pokrivač od permeabilne najlonske gaze). Za dužu primjenu mjesto primjene je pokriveno. U slučaju isparavanja poluisparljivih ispitivanih supstanci, dolazi do neprihvatljivog smanjenja vrijednosti za ispitivanu supstancu (tačka 1.4.10. ove metode), isparena supstanca se uhvati filterom od medicinskog uglja koji pokriva spravu za primjenu (Slika 1). Ni jedna sprava ne oštećuje kožu, niti da apsorbuje, niti reaguje sa ispitivanim preparatom. Životinje se vraćaju u pojedinačne metaboličke kaveze da bi se sakupljali ekskreti.

Slika 1: Primjer dizajna naprave koja se koristi da odredi i zaštiti mjesto dermalne primjene za vrijeme in vivo studija perkutane apsorpcije



1.4.8. Trajanje ekspozicije i uzorkovanje

Trajanje ekspozicije je vremenski interval između primjene i uklanjanja pranjem ispitivanog preparata sa kože. Koristiti odgovarajući period ekspozicije (obično 6 ili 24 sata), što se zasniva na očekivanoj dužini ekspozicije kod ljudi. Nakon perioda ekspozicije, životinje se zadržavaju u metaboličkim kavezima sve do unaprijed planiranog žrtvovanja. Životinje se posmatraju u redovnim intervalima tokom studije da bi se utvrdili znaci toksičnih/abnormalnih odgovora. Na kraju perioda ekspozicije, tretiranu kožu pregledati da bi se provjerilo da li postoje vidljivi znaci iritacije.

Metabolički kavezi omogućavaju odvojeno sakupljanje urina i fecesa tokom studije. Oni obezbijeĐuju i sakupljanje ^{14}C -ugljendioksida i isparljivih ^{14}C- ugljenikovih jedinjenja koja se analiziraju kada su proizvedena u dovoljnoj količini (više od 5%). Urin, feces i tečnost za hvatanje (npr. ^{14}C- ugljendioksida i isparljivih ^{14}C- ugljenikovih jedinjenja) pojedinačno sakupljati od svake grupe u svako vrijeme uzimanja uzoraka. Ako postoji dovoljno podataka da se formira malo ili nimalo isparljivog, radioaktivnog metabolita, koriste se otvoreni kavezi.

Ekskreti se sakupljaju za vrijeme perioda ekspozicije i do 24 sata nakon inicijalnog kontakta sa kožom, a potom svakodnevno do kraja ispitivanja. Mada su tri intervala sakupljanja ekskreta dovoljna, predviĐena namjena ispitivanog preparata ili postojeći kinetički podaci ukazuju na to da je za studiju pogodnije da se uključi dodatno vrijeme i intervali.

Na kraju perioda ekspozicije, zaštitna naprava se uklanja sa svake životinje i odvojeno zadržava za analizu. Tretirana koža svih životinja se opere najmanje tri puta odgovarajućim sredstvom za čišćenje koristeći pogodne ubruse. To se čini pažljivo da bi se izbjegla kontaminacija drugih djelova tijela životinje. Sredstvo za čišćenje je dio uobičajene higijenske prakse, npr. vodeni rastvor sapuna. Na kraju se koža osuši. Svi ubrusi i ispirci se čuvaju za analizu. Prije vraćanja u kaveze, primjeniti nov pokrivač da bi se zaštitilo tretirano mjesto kod životinja koje su predviĐene za kasnije ispitivanje.

1.4.9. Postupci žrtvovanja

Za svaku grupu, pojedinačne životinje se žrtvuju u predviđeno vrijeme i krv se sakuplja za analizu. Zaštitna naprava ili pokrivač se uklone za analizu. Koža sa mjesta aplikacije i sličnog dijela nedozirane, ošišane kože se ukloni od svake životinje za odvojenu analizu. Mjesto primjene može da se razdijeli da bi se odvojio stratum corneum od epidermisa kako bi se dobio podatak o dispoziciji ispitivane hemikalije. Određivanje ove raspodjele tokom vremena, nakon perioda ekspozicije ukazuje na sudbinu ispitivane hemikalije u stratum cornerumu. Da bi se olakšalo razdjeljivanje kože (nakon završenog pranja kože i žrtvovanja životinje), svi zaštitni pokrivači se uklanjaju. Koža mjesta aplikacije sa prstenom okolne kože se odvaja od pacova i pričvršćuje iglama za podlogu. Parče adhezivne trake se primjenjuje na površinu kože uz blagi pritisak, a potom se traka uklanja zajedno sa dijelom stratum corneuma.

Zatim se primjenjuju novi komadi adhezivne trake sve dok se traka više ne lijepi za površinu kože, kada je sav stratum corneum uklonjen. Za svaku životinju svi djelovi adhezivne trake se čuvaju u jednom kontejneru kome je dodat tkivni digestant da bi se solubilizovao stratum corneum. Sva potencijalno ciljna tkiva se uklonjaju za posebna mjerenja prije nego što se ostaci analiziraju za apsorbovanu lešnu dozu. Leševi pojedinačnih životinja se čuvaju za analizu. Obično je dovoljna analiza ukupnog sadržaja. Ciljni organi se uklanjaju za odvojene analize (ako su na to ukazale druge studije). Urin koji se nalazi u mokraćnoj bešici pri žrtvovanju, se dodaje u prethodno sakupljen urin. Nakon skupljanja ekskreta iz metaboličkih kaveza u vrijeme žrtvovanja životinja, kavezi i uređaji za sakupljanje se operu odgovarajućim rastvaračem. Drugi djelovi opreme koji su kontaminirani takođe se analiziraju.

1.4.10. Analize

U svim studijama postići odgovarajuću recovery vrijednost (npr. srednju vrijednost od 100% ± 10% radioaktivnosti). Recovery vrijednosti van ovih se opravdavaju. Količina primjenjene doze u svakom uzorku se analizira odgovarajućim validovanim pokolonama.

Statistička razmatranja uključuju mjeru varijacije za ponavljanja za svaku primjenu.

2. Podaci

Sljedeća mjerenja se izvrše za svaku životinju, za svako vrijeme uzorkovanja, za ispitanu hemikaliju i/ili metabolite (uz pojedinačne podatke, podaci grupisani prema vremenu uzorkovanja se prikazuju kao srednje vrijednosti):
- količina udružena sa zaštitnim napravama;
- količina koja se ukljanja sa kože;
- količina u/na koži koja se ne ispira sa kože;
- količina u uzorcima krvi;
- količina u ekskretima i izdahnutom vazduhu (ako je primjenljivo);
- količina koja ostane u lešu ili u organima koji su uklonjeni za odvojenu analizu.

Količina ispitivane supstance i/ili metabolita u ekskretima, izdahnutom vazduhu, krvi i lešu omogućava određivanje ukupne apsorbovane količine u svakoj vremenskoj instanci. Izračunava se i količina ispitivane hemikalije koja je apsorbovana po cm^2 izložene kože za vrijeme perioda ekspozicije.

3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži zahtjeve predviđene u protokolu, uključujući opravdanost sistema za ispitivanje koji je korišćen, a sadrži i podatke o:

1) Ispitivanoj supstanci:

- podaci za identifikaciju (npr. CAS broj ako je dostupan, izvor, čistoća (radiohemijska čistoća), poznate nečistoće, broj serije);
- fizička svojstva, fizička i hemijska svojstva (npr. pH, isparljivost, rastvorljivost, stabilnost, molekulska masa i log Pow).

2) Ispitivanom preparatu:

- formulacija i opravdanost primjene;
- detalji o ispitivanom preparatu, primjenjena količina, postignuta koncentracija, vehikulum, stabilnost i homogenost.

3) Eksperimentalnim životinjama:

- korišćena vrsta/soj;
- broj, starost i pol životinja;
- izvor životinja, smještaj, ishrana i itd.;
- Individualne tjelesne mase životinja na početku testa. 4) Uslovima ispitivanja:
- detalji primjene ispitivanog preparata (mjesto primjene, analitičke metode, okluzija/neokluzija, zapremina, ekstrakcija, detekcija); - detalji o kvalitetu hrane i vode. 5) Rezultatima:
- svi znaci toksičnosti;
- tabelarni podaci o apsorpciji (izraženi kao brzina, količina ili procenat);
- ukupni recovery u eksperimentu;
- tumačenje rezultata, poređenje sa rapoloživim rezultatima perkutane apsorpcije ispitivanog jedinjenja.

6) Obrazloženju rezultata. 7) Zaključcima.

B.45. APSORPCIJA PREKO KOŽE: IN VITRO METODA

1. Metoda ispitivanja

Ova metoda odgovara metodi OECD: TG 428 (2004).

1.1. Uvod

Ova metoda je namijenjena da obezbijedi podatke o apsorpciji ispitivane supstance koja je primjenjena na odsječak kože. Ona se kombinuje sa in vivo metodom za apsorpciju kroz kožu ili se izvodi odvojeno. Koristi se OECD vodič za izvođenje ispitivanja apsorpcije kroz kožu kao pomoć u dizajniranju studije zasnovane na ovoj metodi. Vodič je pripremljen da olakša izbor odgovarajućih in vitro postupaka za korišćenje u specifičnim okolnostima, da bi se obezbijedila pouzdanost rezultata dobijenih ovom metodom.

Metode za mjerenje apsorpcije kroz kožu i dermalnog transporta se dijele u dvije kategorije: in vivo i in vitro. In vivo metode obezbjeđuju dobar farmakokinetički podatak o apsorpciji kroz kožu kod različitih vrsta životinja. In vivo metoda je opisana u posebnoj metodi. In vitro metode se godinama koriste za mjerenje apsorpcije kroz kožu. In vitro metode mjere difuziju hemikalija u i

kroz kožu do rezervoara tečnosti i koriste neživu kožu za mjerenje difuzije ili svježu, metabolički aktivnu kožu za istovrijemeno mjerenje difuzije i metabolizma kože. Ove metode su pogodne kao skrining za poređenje transporta hemikalija u i kroz kožu iz različitih formulacija i obezbjeđuju korisne modele za procjenu perkutane apsorpcije kod ljudi.

In vitro metoda nije primjenjiva u svim situacijama i za sve klase hemikalija. Moguće je koristiti in vitro metodu ispitivanja za inicijalnu kvalitativnu evaluaciju penetracije kroz kožu. U određenim slučajevima neophodno da se ovo isprati podacima dobijenim u in vivo ispitivanjima.

Ova metoda prikazuje opšte principe za mjerenje dermalne apsorpcije i transporta ispitivane supstance uz upotrebu isječka kože. Koristi se koža mnogih vrsta sisara uključujući i ljudsku. Karakteristika permeabilnosti kože se zadržava i nakon isjecanja zato što je glavna difuziona barijera mrtvi stratum corneum, a aktivni transport hemikalija kroz kožu nije do sada identifikovan. Za kožu je pokazano da metaboliše neke hemikalije tokom perkutane apsorpcije, ali ovaj proces nije ograničavajući u smislu apsorbovane doze, mada utiče na prirodu materijala koji ulazi u cirkulaciju.

1.2. Definicije

Neapsorbovana doza je doza koja je isprana sa površine kože nakon ekspozicije i dio koji je prisutan na neokluzivnom pokrivaču, uključujući i dozu za koju je pokazano da je isparila sa kože tokom ekspozicije.

Apsorbovana doza (in vivo) je količina ispitivane supstance koja je dospjela u prijemnu tečnost ili sistemsku cirkulaciju tokom navedenog vremenskog perioda.

Apsorbabilna doza je doza na ili u koži nakon ispiranja.

1.3. Princip metode

Ispitivana supstanca, najbolje radioaktivno obilježena, primjenjuje se na površinu uzorka kože koja razdvaja dvije komore difuzione ćelije. Hemikalija ostaje na koži određeno vrijeme sa kožom pod određenim uslovima, prije uklanjanja odgovarajućim postupkom čišćenja. Uzorci prijemne tečnosti se uzimaju u određenim vremenskim instancama tokom eksperimenta i analiziraju se na ispitivanu hemikaliju i/ili metabolite.

Kada se koriste metabolički aktivni sistemi, analiziraju se metaboliti ispitivane hemikalije pomoću odgovarajućih metoda. Na kraju eksperimenta kvantifikuje se distribucija ispitivane hemikalije i njenih metabolita kada to odgovara.

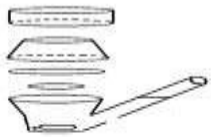
Koristeći odgovarajuće uslove, apsorpcija ispitivane supstance tokom datog perioda se mjeri analizom prijemne tečnosti i tretirane kože. Ispitivana supstanca koja ostaje u koži se smatra apsorbovanom, osim ako se pokaže da se apsorpcija određuje iz vrijednosti u prijemnoj tečnosti. Analiza drugih komponenti (materijal ispran sa kože i onaj koji je ostao u slojevima kože) omogućava dalju evaluaciju podataka, uključujući ukupnu dispoziciju supstance i recovery u procentima.

Da bi pokazali mogućnosti i pouzdanost test sistema u laboratorijai u kojoj se izvodi ispitivanje, rezultati za relevantne referentne hemikalije su dostupni i u skladu sa podacima datim u literaturi za metodu koja se koristi. Ovaj zahtjev se ispunjava ispitivanjem odgovarajuće referentne supstance (lipofilnost je bliska lipofilnosti ispitivane supstance), istovrijemeno sa ispitivanom supstancom ili obezbijeđivanjem odgovarajućih istorijskih podataka o većem broju referentnih supstanci različite lipofilnosti (nrp. kofein, benzoeva kiselina i testosteron).

1.4. Opis metode

1.4.1. Difuziona ćelija

Difuziona ćelija se sastoji od donorske komore i prijemne komore između kojih se postavlja koža (primjer tipičnog dizajna je dat na Slici 1.). Ćelije obezbijeđuju dobro zaptivanje oko kože, omogućuju jednostavno uzorkovanje i dobro miješanje prijemnog rastvora u kontaktu sa donjom stranom kože kao i dobru kontrolu temperature ćelije i njenog sadržaja. Statične i protočne difuzione ćelije su jednako prihvatljive.



Slika 1: Primjer dizajna statičke difuzione ćelije za in vitro studije perkutane apsorpcije

Donorske ćelije se ostavljaju neokludirana za vrijeme ekspozicije određenoj dozi ispitivanog preparata. Za neodređene aplikacije i pojedina scenarija za određene doze, donorske komore okludiraju.

1.4.2. Prijemna tečnost

Koristi se fiziološki pogodna prijemna tečnost, mada se koriste i druge pod uslovom da je to opravdano. Navodi se precizni sastav prijemne tečnosti. Odgovarajuća rastvorljivost ispitivane hemikalije u prijemnoj tečnosti se pokazuje tako da tečnost ne predstavlja barijeru za apsorpciju. Uz to, prijemna tečnost ne utiče na integritet preparata kože. U protočnom sistemu brzina protoka ne utiče na difuziju ispitivane supstance u prijemnu tečnost. U statičnom ćelijskom sistemu, prijemna tečnost se neprekidno miješa i redovno uzorkuje. Ako se ispituje metabolizam, prijemna tečnost obezbjeđuje da koža ostane živa tokom cjelokupnog eksperimenta.

1.4.3. Preparati kože

Koristi koža od ljudi ili životinja. Korišćenje ljudske kože je predmet nacionalnih i internacionalnih etičkih razmatranja i uslova. Mada je živa koža bolja, neživa koža se koristi pod

uslovom da može da se pokaže integritet kože. Prihvatljive su epidermalne membrane (enzimski, toplotno ili hemijski odvojene), ili odvojeni slojevi kože (obično debljine 200-400 µm) pripremljeni sa dermatomom. Puna debljina kože se koristi, ali prekodnosna debljina (približno više od 1 mm) se izbjegava sem u slučaju specifičnog zahtijeva da se odredi ispitivana hemikalija u slojevima kože. Izbor vrste, anatomskog mjesta i tehnika pripreme se opravdava. Potrebni su prihvatljivi podaci od najmanje četiri ponavljanja po ispitivanom preparatu.

1.4.4. Integritet preparata kože

Suštinsko je da se koža dobro pripremi. Neodgovarajuće rukovanje ima za poslijedicu oštećenje stratus corneuma i zbog toga integritet pripremljene kože se provjerava. Kada se ispituje metabolizam kože, svjež isječak kože se koristi što je prije moguće u uslovima za koje se zna da održavaju metabolizam kože. Kao opšte pravilo, svjež isječak kože se koristi u okviru 24 sata, ali prihvatljiv period čuvanja varira zavisno od enzimskog sistema koji je uključen u metabolizam i temperature čuvanja. Kada se preparati kože čuvaju prije upotrebe, postoji dokaz da je funkcija barijere očuvana.

1.4.5. Ispitivana supstanca

Ispitivana supstanca je entitet čiji penetracione karakteristike se ispituju. Idealno, ispitivana supstanca je radioaktivno obilježena.

1.4.6. Ispitivani preparat

Preparat ispitivane supstance (npr. čista, razblažena ili formulisani materijal koji sadrži ispitivanu hemikaliju koja se primjenjuje na kožu), je jednak (ili realna zamjena), kao onaj kojem će biti eksponirani ljudi ili druga moguća ciljna vrsta. Svaka varijacija od preparata u upotrebi se opravdava.

1.4.7. Koncentracije ispitivane supstance i formulacije

Obično više od jedne koncentracije ispitivane supstance koristi se odražavajući gornju ili potencijalnu ekspoziciju ljudi. Razmotriti ispitivanje različitih tipičnih formulacija.

1.4.8. Primjena na kožu

U uobičajenim uslovima ljudske ekspozicije hemikalijama sreću se određene doze. Količina koja se primjenjuje imitira moguću ekspoziciju kod ljudi, tipično 1 mg/cm^2 do 5 mg/cm^2 kože za čvrste ili 10 µl/cm^2 za tečnosti.

Količine se opravdaju očekivanim uslovima primjene, ciljevima studije ili fizičkim svojstvima ispitivanog preparata. Na primjer, primjene na površinu kože su neodređene u slučajevima gdje se nanose velike zapremine po jedinici površine.

1.4.9. Temperatura

Na pasivnu difuziju hemikalija (i apsorpciju kroz kožu) utiče temperatura. Difuzionu komoru i kožu održavati na konstantnoj temperaturi koja je bliska temperaturi kože od 32 °C ± 1 °C.

Različiti dizajn ćelija ima različite uslove vodenog kupatila ili temperaturnog bloka za obezbijeĐivanje održavanja temperature prijemnika i kože u fiziološkim granicama. Vlažnost je između 30% i 70%.

1.4.10. Trajanje ekspozicije i uzorkovanje

Ekspozicija kože ispitivanom preparatu je tokom cjelokupnog eksperimenta ili kraćeg perioda (tj. da bi se imitirala specifična vrsta ekspozicije ljudi). Koža se ispira od viška ispitivanog preparata odgovarajućim sredstvom za čišćenje, a ispirak skupljen za analizu. Postupak uklanjanja ispitivanog preparata zavisi od očekivanog uslova kod primjene i opravdava se. Period uzorkovanja od 24 sata je uobičajen da bi se obezbijedila adekvatna karakterizacija profila apsorpcije. S obzirom da se integritet kože nakon 24 sata narušava, vremena uzorkovanja nisu duža od 24 sata. Za ispitivane supstance koje prodiru u kožu brzo, ovo nije neophodno, ali za supstance koje prodiru sporo je potrebno duže vrijeme. Učestalost uzimanja uzoraka prijemne tečnosti obezbjeđuje grafičko prikazivanje apsorpcionog profila ispitivane supstance.

1.4.11. Završni postupci

Svi djelovi ispitivanog sistema se analiziraju i određuje se recovery. Ovo uključuje donorsku komoru, ispirak površine kože, preparat kože i prijemnu tečnost/komoru. U nekim slučajevima koža se razdvaja na izloženi dio i dio kože ispod ćelijskog oboda i na stratum corneum, epidermis i dermis radi zasebnih analiza.

1.4.12. Analiza

U svim studijama postići odgovarajući recovery (npr. 100% ± 10% radioaktivnosti i svako odstepene se opravdava). Količina ispitivane supstance u prijemnoj tečnosti, preparatu kože, ispicima površine kože i ispirak aparature se analizira korišćenjem odgovarajuće tehnike.

2. Podaci

Navode se: analiza prijemne tečnosti, distribucija ispitivane hemikalije u test sistemu i apsorpcioni profil u vremenu. Kada se koriste uslovi određene doze, iizračunava se: količina isprana sa kože, količina združena sa kožom (i u različitim slojevima kože, ako se analizira) i količina prisutna u prijemnoj tečnosti (brzina, i količina ili procenat od primjenjene doze). Apsorpcija kroz kožu se izražava korišćenjem podataka dobijenih analizom prijemne tečnosti. Kada ispitivana supstanca ostane u koži na kraju studije, ta se količina uključuje u ukupnu apsorbovanu količinu. Kada se u ekspoziciji koriste uslovi neodređene doze, podaci će omogućiti iizračunavanje konstante permeabilnosti (u daljem tekstu: Kp). Pod ovim uslovima, procenat koji je apsorbovan nije relevantan.

3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži zahtjeve navedene u protokolu uključujući opravdanost sistema za testiranje koji je korišćen, a sadrži i podatke o:

1) Ispitivanoj supstanci:

- fizička svojstva, fizička i hemijska svojstva (najmanje molekulska masa i log Pow), čistoća (radiohemijska čistoća);

- podaci o identifikaciji (npr. broj serije);
- rastvorljivost u prijemnoj tečnosti.

2) Ispitivanom preparatu:
- formulacija i opravdanost primjene;
- homogenost.

3) Uslovima ispitivanja:
- izvori i predeo kože, metod pripreme, uslovi čuvanja pre upotrebe, pretretman (čišćenje, tretman antibioticima, itd.), mjerenja integriteta kože, metabolički status, opravdanost upotrebe;
- dizajn ćelije, sastav prijemne tečnosti, brzina protoka prijemne tečnosti ili vremena uzorkovanja i postupci;
- detalji primjene ispitivanog preparata i kvantifikacija primjenjene doze;
- trajanje ekspozicije;
- detalji uklanjanja ispitivanog preparata sa kože, tj. ispiranje kože;
- detalji analize kože i tehnika frakcionisanja koje su korišćene da pokažu distribuciju u koži;
- postupci za pranje ćelija i opreme;
- metode za analizu, tehnike ekstrakcije, limiti detekcije i validacija analitičke metode.

4) Rezultatima:
- ukupan recovery eksperimenta (primjenjena doza = ispirci kože + koža + prijemna tečnost + ispirci ćelija);
- tabeliranje individualnih recovery vrijednosti ćelija za svaki kompartman;
- apsorpcioni profil;
- tabelirani podaci o apsorpciji (izraženi kao brzina, količina ili procenat).

5) Obrazloženju rezultata. 6) Zaključcima.

B.46 NADRAŽIVANJE KOŽE IN VITRO: ISPITNA METODA NA MODELU REKONSTRUISANE LJUDSKE EPIDERME

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 439. Nadraživanje kože odnosi se na izazivanje reverzibilnog oštećenja kože nakon primjene ispitivane hemikalije u trajanju do četiri sata. Ovom se ispitnom metodom pruža in vitro postupak koji se može upotrebljavati za identifikovanje opasnosti nadražujućih hemikalija (supstanci i smješa). Ova se ispitna metoda može upotrebljavati kako bi se utvrdilo nadražuje li hemikalija kožu, kao samostalno ispitivanje za in vivo ispitivanje nadraživanja kože ili kao djelimično ispitivanje u okviru strategije ispitivanja.

Procjena nadraživanja kože dosad je obično obuhvatala primjenu laboratorijskih životinja [ispitna metoda B.4., ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 404 koja je izvorno donesena 1981. i revidirana 1992., 2002. i 2015.]. Za ispitivanje nagrizanja donesene su tri validirane ispitne metode in vitro – ispitna metoda EU-a B.40. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 430), ispitna metoda B.40.bis (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 431) i ispitna metoda B.65. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 435). U Smjernicama OECD-a o integrisanim pristupima ispitivanju i procjeni (IATA) za nagrizanje i nadraživanje kože opisano je nekoliko modula u kojima se grupišu izvori informacija i alati za analizu te se

pružaju smjernice o i. načinu integrisanja i upotrebe postojećih podataka o ispitivanju i podataka koji se dobijaju bez ispitivanja za procjenu potencijala hemikalija da uzrokuju nadraživanje i nagrizanje kože te ii. predlaganju pristupa kad je potrebno dalje ispitivanje.

Ova se ispitna metoda bavi konačnim efektom nadraživanja kože na zdravlje ljudi. Bazira se na in vitro ispitnom sistema rekonstruisane ljudske epiderme (RhE) koja vjerno oponaša biohemijska i fiziološka svojstva gornjih slojeva ljudske kože, tj. epiderme. U ispitnom sistema RhE ljudski netransformisani epidermalni keratinociti upotrebljavaju se kao izvor ćelija za rekonstrukciju modela epiderme s reprezentativnom histologijom i citoarhitekturom. Dostupni su zahtjevi izvođenja (PS) kako bi se olakšala validacija i procjena sličnih i izmijenjenih ispitnih metoda koje se baziraju na modelu RhE, u skladu s načelima Smjernice OECD-a br. 34. Odgovarajuća smjernica za ispitivanje izvorno je donesena 2010. i ažurirana 2013. kako bi se uključili dodatni modeli RhE, a 2015. ažurirana je kako bi se uputilo na smjernice o IATA-i i uveo alternativni postupak za mjerenje vijabilnosti.

Za četiri komercijalno dostupna in vitro ispitna modela dovršene su predvalidacione, optimizacione i validacione studije na osnovu ispitnog Sistema RhE (osjetljivost od 80 %, specifičnost od 70 % i tačnost od 75 %). Ta četiri ispitna modela uključena su u ovu ispitnu metodu i navedena su u Dodatku 2, u kojem se navode i informacije o vrsti validacione studije koja je upotrijebljena za validaciju odgovarajućih ispitnih metoda. Kako je navedeno u Dodatku 2, za razvoj ove ispitne metode i zahtjeva izvođenja upotrijebljena je validirana referentna metoda (VRM).

OECD-ovo uzajamno prihvatanje podataka važiće samo za ispitne modele koji su validirani u skladu sa zahtjevima izvođenja ako je OECD pregledao i donio te ispitne modele. Ispitni modeli uključeni u ovu ispitnu metodu i odgovarajuća smjernica OECD-a za ispitivanje mogu se upotrebljavati bez razlike za ispunjavanje zahtjeva zemalja u pogledu rezultata ispitivanja iz ispitnih metoda in vitro za nadraživanje kože, uz ostvarivanje koristi od uzajamnog prihvatanja podataka.

Definicije pojmova upotrijebljenih u ovom dokumentu navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

Ograničenje je ove ispitne metode, kako je pokazala cjelokupna prospektivna validaciona studija u kojoj su procijenjene i okarakterisane ispitne metode RhE, to što ne omogućuje klasifikovanje hemikalija na neobaveznu 3. kategoriju UN GHS-a (blago nadražujuće hemikalije). Za potpunu evaluaciju lokalnih efekata na kožu nakon jednostrukog dermalnog izlaganja potrebno je proučiti Smjernice OECD-a o integrisanim pristupima ispitivanju i procjeni. Podrazumijeva se da upotreba ljudske kože podliježe nacionalnim i međunarodnim etičkim pitanjima i uslovima.

Ova se ispitna metoda bavi konačnim efektom nadraživanja kože na zdravlje ljudi. Iako se ovom ispitnom metodom ne dobijaju primjerene informacije o nagrizanju kože, trebalo bi napomenuti da se ispitna metoda B.40.bis (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 431)

za nagrizanje kože zasniva na istom ispitnom sistema RhE uz upotrebu drugog protokola. Ova se ispitna metoda zasniva na modelima RhE koristeći ljudske keratinocite koji stoga predstavljaju in vitro ciljni organ vrste koja se proučava. Pored toga neposredno uključuje početnu fazu upalne kaskade/mehanizma djelovanja (oštećenje ćelija i tkiva koje dovodi do lokalizirane povrede) koja se javlja tokom nadraživanja in vivo. Tokom validacione studije na kojoj se zasniva ova ispitna metoda ispitan je širok raspon hemikalija, a bazom podataka validacione studije bilo je obuhvaćeno ukupno 58 hemikalija. Ispitna metoda primjenjiva je na čvrste supstance, tečnosti, polučvrste supstance i voskove. Tečnosti mogu biti vodene i bezvodne; čvrste supstance mogu biti rastvorive ili nerastvorive u vodi. Čvrste supstance prije primjene treba samljeti u sitni prah kad je god moguće; nije potrebno nikakvo drugo prethodno tretiranje uzorka. Gasovi i aerosoli još nisu ocijenjeni u validacionoj studiji. Iako je moguće da se oni mogu ispitati upotrebom tehnologije RhE, ispitnom metodom nije omogućeno ispitivanje gasova i aerosola.

Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smješi radi dobijanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smješe. Međutim, budući da smješe obuhvataju široki spektar kategorija i sastava te da su trenutno dostupne samo ograničene informacije o ispitivanju smjesa, u slučajevima u kojima se može dokazati da se ispitna metoda ne može primijeniti za ispitivanje specifične kategorije smjesa (npr. primjenom strategije koju su predložili Eskes i dr., 2012.), ispitnu metodu ne bi trebalo upotrebljavati za tu specifičnu kategoriju smjesa. Slično tome, trebalo bi o tome voditi računa ako se za određene hemijske klase ili fizičko-hemijska svojstva utvrdi da nisu primjenjivi na trenutnu ispitnu metodu.

Ispitivane hemikalije koje apsorbiraju svjetlost u istom rasponu kao i MTT formazan i ispitivane hemikalije koje mogu direktno redukovati vitalnu boju MTT (na MTT formazan) mogu ometati mjerenje vijabilnosti ćelija te se kod njih trebaju upotrebljavati prilagođene kontrole za ispravke.

Jedan ciklus ispitivanja koji obuhvata tri ponovljena uzorka tkiva trebao bi biti dovoljan za ispitivanu hemikaliju ako je klasifikovanje nedvosmisleno. Međutim, u slučajevima graničnih rezultata, kao što su neusklađena ponovljena mjerenja i/ili srednji postotak vijabilnosti od 50 ± 5 %, trebalo bi razmotriti drugi ciklus, a i treći ciklus u slučaju neusklađenih rezultata između prva dva ciklusa.

NAČELO ISPITIVANJA

Ispitivana se hemikalija lokalno nanosi na trodimenzionalni model RhE, koji čine netransformisani ljudski epidermalni keratinociti uzgojeni u svrhu dobijanja višeslojnog, visoko izdiferenciranog modela ljudske epiderme. Sastoji se od organiziranih bazalnih, trnastih i zrnatih slojeva te višeslojnog rožnatog sloja (stratum corneum) koji između ćelija sadrži lamelarne masne slojeve koji predstavljaju glavne klase lipida analogne onima koji se susreću in vivo.

Hemijski indukovano nadraživanje kože, koje se uglavnom registruje u pojavi eritema i edema, rezultat je kaskade događaja koja započinje prodiranjem hemikalija u rožnati sloj gdje mogu oštetiti niže slojeve keratinocita i druge ćelije kože. Oštećene ćelije mogu otpuštati upalne posrednike ili indukovati upalnu kaskadu koja djeluje i na ćelije derme, a posebno stromalne i endotelne ćelije krvnih žila. primijećeni eritemi i edemi posljedica su dilatacije i povećane propusnosti endotelnih ćelija. Tačnije, ako u in vitro ispitnom sistema ne postoji nikakva vaskularizacija, metode na osnovu rekonstruisane ljudske epiderme mjere početne događaje u kaskadi, npr. oštećenje ćelija/tkiva upotrebom vijabilnosti ćelija kao čitanja.

Vijabilnost ćelija u modelima RhE mjeri se enzimskom konverzijom vitalne boje MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid, tiazolil plavo; CAS broj 298-93-1] u so plavog formazana koja se kvantitativno mjeri nakon ekstrakcije iz tkiva. Nadražujuće hemikalije prepoznaju se po tome što smanjuju vijabilnost ćelija ispod definisanih pragova (tj. ≤ 50 % za 2. kategoriju UN GHS-a). Ispitivane hemikalije kod kojih je vijabilnost ćelija iznad definisanog praga mogu se smatrati supstancama koje ne nadražuju (tj. > 50 %, bez kategorije).

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

Prije rutinske primjene bilo kojeg od četiri validiranih ispitnih modela koji su u skladu s ovom ispitnom metodom (Dodatak 2.) laboratorija bi trebala dokazati tehničku osposobljenost upotrebom deset supstanci koje služe za dokazivanje osposobljenosti koje su navedene u tabeli 1. U slučajevima u kojima, na primjer, navedena supstanca nije dostupna, može se upotrijebiti druga supstanca za koju su dostupni primjereni referentni in vivo i in vitro podaci (npr. s listaa referentnih hemikalija) pod uslovom da se primjenjuju isti kriterijumi za izbor kao oni opisani u tabeli 1. Upotrebu alternativne supstance koja služi za dokazivanje osposobljenosti trebalo bi opravdati.

U okviru ispitivanja osposobljenosti preporučuje se da korisnici provjere svojstva barijere tkiva u skladu sa specifikacijama proizvođača modela RhE. To je posebno važno ako se tkiva šalju na velike udaljenosti/tokom dugih vremenskih perioda. Nakon što se metoda uspješno uspostavi te nakon što se stekne i dokaže osposobljenost u pogledu njene upotrebe, takva rutinska provjera neće biti potrebna. Međutim, kod rutinske upotrebe ispitne metode preporučuje se dalje ocjenjivanje svojstava barijere u pravilnim vremenskim intervalima.

Tabela 1. Supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti

Supstanca	CAS br.	Rezultat ocjenjivanja *in vivo*	Agregatno stanje	Kategorija sistema UN GHS-a
Neklasdifikovane supstance (bez kategorije prema UN GHS-u)				
Naftalensirćetna kiselina	86-87-3	0	Čvrsto	Bez kat.
izopropanol	67-63-0	0,3	Tečno	Bez kat.

metil-stearat	112-61-8	1	Čvrsto	Bez kat.
heptilbutirat	5870-93-9	1,7	Tečno	Bez kat. (*Neobavezna 3. kat.*)
heksilsalicilat	6259-76-3	2	Tečno	Bez kat. (*Neobavezna 3. kat.*)
Klasifikovane supstance (2. kategorija sistema UN GHS-a)				
ciklamen-aldehid	103-95-7	2,3	Tečno	2. kat.
1-bromheksan	111-25-1	2,7	Tečno	2. kat.
kalijum hidroksid (5 % aq.)	1310-58-3	3	Tečno	2. kat.
1-metil-3-fenil-1-piperazin	5271-27-2	3,3	Čvrsto	2. kat.
heptanal	111-71-7	3,4	Tečno	2. kat.

POSTUPAK

U nastavku se nalazi opis elemenata i postupaka u vezi s ispitnom metodom RhE za potrebe ocjenjivanja nadraživanja kože (vidjeti i Dodatak 3. za parametre povezane sa svakim ispitnim modelom). Dostupni su standardni operativni postupci za četiri modela koja su usklađena s ovom ispitnom metodom.

ELEMENTI ISPITNE METODE RHE

Opšti uslovi

Za rekonstruisanje epitela treba koristiti netransformisane ljudske keratinocite. Ispod funkcionalnog rožnatog sloja (stratum corneum) nalaze se višestruki slojevi vijabilnih epitelnih ćelija (bazalni sloj, trnasti sloj, zrnati sloj). I sam rožnati sloj je višeslojan te sadrži esencijalni profil lipida kao čvrstu funkcionalnu barijeru koja je sposobna zaustaviti brzi prodor citotoksičnih referentnih hemikalija, npr. natrijum dodecil-sulfat (SDS) ili Triton X-100. Funkciju barijere trebalo bi dokazati i može se ocijeniti određivanjem koncentracije referentne hemikalije pri kojoj se smanjuje vijabilnost tkiva za 50 % (IC50) nakon fiksnog vremena izlaganja ili određivanjem vremena izlaganja koje je potrebno da se vijabilnost ćelija smanji za 50 % (ET50) nakon primjene referentne hemikalije u unaprijed određenoj fiksnoj koncentraciji. Model RhE mora biti dovoljno nepropustan da spriječi prolazak materijala oko rožnatog sloja do vijabilnog tkiva jer bi to dovelo do lošeg modeliranja izlaganja kože. Model RhE ne smije biti kontemineran bakterijama, virusima, mikoplazmama ili gljivicama.

Funkcionalni uslovi

Vijabilnost

Za kvantifikaciju vijabilnosti upotrebljava se MTT test. Vijabilne ćelije modela tkiva RhE mogu redukovati vitalnu boju MTT u talog plavog MTT formazana, koji se zatim ekstrahuje iz tkiva izopropanolom (ili sličnim rastvaračem). Optička gustina (OD) samog ekstrakcionog rastvarača treba biti dovoljno mala, tj. OD < 0,1. Ekstrahovani MTT formazan može se kvantifikovati upotrebom mjerenja standardne apsorbancije (OD) ili postupkom HPLC/UPLC spektrofotometrije. Korisnici modela RhE trebali bi osigurati da svaka šarža modela RhE koji se upotrebljava ispunjava utvrđene kriterijume za negativnu kontrolu. Raspon prihvatljivosti (gornja i donja granica) za vrijednosti optičke gustine negativne kontrole (u uslovima ispitne metode za ocjenjivanje nadraživanja kože) utvrđuje subjekt koji je razvio model RhE ili dobavljač tog modela. Rasponi prihvatljivosti za četiri validirana modela RhE uključena u ovu ispitnu metodu navedeni su u tabeli 2. Korisnik HPLC/UPLC spektrofotometrije trebao bi upotrebljavati raspone optičke gustine negativne kontrole navedene u tabeli 2. kao kriterijum prihvatljivosti za negativnu kontrolu. Potrebno je dokumentovati da su tkiva obrađena negativnom kontrolom stabilna u kulturi (tj. daju slična mjerenja vijabilnosti) za vrijeme trajanja ispitnog izlaganja.

Tabela 2. Rasponi prihvatljivosti za vrijednosti optičke gustine negativne kontrole ispitnih modela uključenih u ovu ispitnu metodu

	Donja granica prihvatljivosti	Gornja granica prihvatljivosti
EpiSkin™ (standardna metoda)	≥ 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

Funkcija barijere

Rožnati sloj i njegov sastav lipida trebao bi biti sposoban zaustaviti brzi prodor citotoksičnih referentnih hemikalija, npr. SDS ili Triton X-100, procijenjeno na osnovu IC50 ili ET50 (tabela 3.).

Morfologija

U izvođenju histološkog pregleda modela RhE treba se dokazati da je struktura slična strukturi ljudske epiderme (uključujući višeslojni rožnati sloj).

Obnovljivost

Rezultati pozitivne i negativne kontrole ispitne metode trebaju dokazati obnovljivost tokom vremena.

Kontrola kvalitete (KK)

Model RhE trebao bi se upotrebljavati samo ako subjekt koji ga je razvio ili dobavljač dokaže da svaka šarža upotrijebljenog modela RhE ispunjava definisane kriterijume za odobrenje proizvoda, među kojima su najvažniji vijabilnost, funkcija barijere i morfologija. Ti bi se podaci trebali dostaviti korisnicima ispitne metode tako da ih mogu uključiti u izvještaj o ispitivanju. Raspon prihvatljivosti (gornja i donja granica) za IC50 ili ET50 trebao bi utvrditi subjekt koji je razvio model RhE ili dobavljač tog modela. Za pouzdano predviđanje klasifikovanja nadražujućih efekata prihvatljivi su isključivo rezultati dobijeni s tkivima koja ispunjavaju zadate kriterijume. Rasponi prihvatljivosti za četiri ispitna modela uključena u ovu ispitnu metodu navedeni su u tabeli 3.

*Tabela 3. K*riterijumi za kontrolu kvaliteta šarže ispitnih modela uključenih u ovu ispitnu metodu

	Donja granica prihvatljivosti	Gornja granica prihvatljivosti
EpiSkin™ (standardna metoda) (18-satno tretiranje SDS-om) (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-satno tretiranje SDS-om) (35.)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

Primjena ispitivane hemikalije i kontrolnih hemikalija

Mjerenja vijabilnosti ćelija

Za svaku ispitivanu hemikaliju i za kontrole trebalo bi upotrijebiti najmanje tri ponovljena uzorka u svakom ciklusu. I kod tečnosti i hemikalija u čvrstom stanju treba primijeniti dovoljnu količinu ispitivane hemikalije kako bi se ravnodnosno pokrila površina epiderme tako da se izbjegne beskonačna doza, tj. trebalo bi upotrijebiti dozu od 26 do 83 µl/cm2 ili mg/cm2 (vidjeti Dodatak 3.). Kod hemikalija u čvrstom stanju površinu epiderme trebalo bi navlažiti dejonizovanom ili destilovanom vodom prije primjene kako bi se poboljšao kontakt između ispitivane hemikalije i površine epiderme. Kad je god moguće, hemikalije u čvrstom stanju treba ispitivati u obliku sitnog praha. U određenim se slučajevima kao pomoć pri nanošenju može upotrijebiti najlonska mreža (vidjeti Dodatak 3.). Na kraju perioda izlaganja ispitivanu hemikaliju treba pažljivo isprati s površine epiderme vodenom puferskom rastvorom ili 0,9-postotnom NaCl. U zavisnosti o ispitnom modelu RhE koji se upotrebljava, period izlaganja kreće se od 15 do 60 minuta, a temperatura inkubacije od 20 do 37 °C. Taj perioda izlaganja i temperature optimiziraju se za svaku pojedinačnu ispitnu metodu RhE i predstavljaju različita intrinzična svojstva ispitnih modela (npr. funkciju barijere) (vidjeti Dodatak 3.).

U svakom bi se ciklusu trebale upotrebljavati istovremene negativne i pozitivne kontrole kako bi se

dokazalo da su vijabilnost (upotrebom negativne kontrole), funkcija barijere i osjetljivost tkiva (upotrebom pozitivne kontrole) unutar prihvatljivog raspona utvrđenog na osnovu rezultata proslih ispitivanja. Predlaže se da se kao pozitivna kontrola koristi 5-postotna vodena rastvor SDS. Predložene su negativne kontrole voda ili fiziološka rastvor puferisan fosfatnim puferom (PBS).

Prema ispitnom postupku od ključne je važnosti da se mjerenje vijabilnosti ne sprovodi neposredno nakon izlaganja ispitivanoj hemikaliji, već nakon dovoljno dugog perioda inkubacije nakon tretiranja tokom koje se oprana tkiva drže u svježem medijumu. Ova faza ostavlja dovoljno vremena da se tkivo oporavi od blagih citotoksičnih efekata, ali i da se pojave jasni znaci citotoksičnih efekata. U fazi optimizacije testa dvaju ispitnih modela na osnovu RhE na kojima se zasniva ova ispitna metoda pokazalo se da optimalno period inkubacije nakon tretiranja iznosi 42 sata.

MTT test je standardizovana kvantitativna metoda koja bi se trebala upotrebljavati za mjerenje vijabilnosti ćelija na osnovu ove ispitne metode. Taj je test prikladan za trodimenzionalni model tkiva. Uzorak tkiva stavi se u rastvor MTT odgovarajuće koncentracije (npr. 0,3–1 mg/ml) i ostavi u njoj tri sata. Vijabilne ćelije pretvaraju MTT u plavi formazan. Nataloženi plavi formazan zatim se ekstrahuje iz tkiva s pomoću rastvarača (npr. izopropanol, kiseli izopropanol) i koncentracija formazana izmjeri se određivanjem vrijednosti OD na 570 nm uz pojas propuštanja do najviše ±30 nm ili upotrebom postupka HPLC/UPLC spektrofotometrije.

Optička svojstva ispitivane hemikalije ili njeno hemijsko djelovanje na MTT (npr. hemikalije mogu spriječiti ili obrnuti proces nastajanja boje, ali ga i izazvati) mogu ometati test i dovesti do pogrešne procjene vijabilnosti. To se može dogoditi kad se određena ispitivana hemikalija ne spere u potpunosti s tkiva ili prodre u epidermu. Ako ispitivana hemikalija direktno djeluje na MTT (npr. redukcijom MTT-a), prirodno je obojena ili se oboji tokom tretiranja tkiva, treba upotrijebiti dodatne kontrole kako bi se utvrdila i ispravila interferencija ispitivane hemikalije s mjernom tehnikom koja se koristi za mjerenje vijabilnosti. Detaljan opis načina na koji se ispravljaju direktna redukcija MTT-a i interferencije bojila dostupan je u standardnim operativnim pokolonama za četiri validirana modela uključena u ovu ispitnu metodu.

Kako bi se identifikovale hemikalije koje direktno redukuju MTT, svaku bi ispitivanu hemikaliju trebalo dodati u svježe pripremljenu rastvor MTT-a. Ako smjesa MTT-a koja sadrži ispitivanu hemikaliju postane plava/ljubičasta, pretpostavlja se da ispitivana hemikalija direktno redukuje MTT i treba se ssprovesti dalja funkcionalna provjera nevijabilnih tkiva RhE, ne u zavisnosti o upotrebi mjerenja standardne apsorbancije (OD) ili postupka HPLC/UPLC spektrofotometrije. U toj dodatnoj funkcionalnoj provjeri upotrebljavaju se mrtva tkiva kod kojih je prisutna samo preostala metabolička aktivnost, ali koja apsorbuju ispitivanu hemikaliju na sličan način kao vijabilna tkiva. Svaka ispitivana hemikalija koja redukuje MTT primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka mrtvog tkiva koji se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja kako bi se dobila nespecifična redukcija MTT-a (NSMTT). Dovoljna je jedna kontrola NSMTT po ispitivanoj hemikaliji ne u zavisnosti o broju sprovedenih nezavisnih ispitivanja/ciklusa. Prava vijabilnost tkiva zatim se računa kao postotak vijabilnosti tkiva koji se dobija iz živih tkiva izloženih supstanci koja redukuje MTT umanjenom za postotak nespecifične redukcije MTT-a dobijene s mrtvim tkivima izloženima istoj supstanci redukuje MTT, izračunato u odnosu na negativnu kontrolu koja se sprovodi istovremeno kad i ispitivanje koje se ispravlja (%NSMTT).

Kako bi se identifikovala potencijalna interferencija obojenih ispitivanih hemikalija ili ispitivanih hemikalija koje se oboje kad dođu u dodir s vodom ili izopropanolom i odlučilo jesu li potrebne dodatne kontrole, trebalo bi ssprovesti spektralnu analizu ispitivane hemikalije u vodi (životna sredina tokom izlaganja) i/ili izopropanolu (rastvor za ekstrahovanje). Ako ispitivana hemikalija u vodi i/ili izopropanolu apsorbuje svjetlost u rasponu od 570 ± 30 nm, trebalo bi ssprovesti dalje

kontrole bojila ili bi, kao alternativu, trebalo primijeniti postupak HPLC/UPLC spektrofotometrije; u poslednjem slučaju te kontrole nisu potrebne. Pri sprovođenju mjerenja standardne apsorbancije (OD), svaka interferirajuća obojena ispitivana hemikalija primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka vijabilnog tkiva, koji se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja, ali se u koraku inkubacije MTT-a inkubiraju medijem, a ne rastvorom MTT-a, kako bi nastala kontrola nespecifične boje (NSCliving). Kontrolu NSCliving treba obavljati istovremeno s ispitivanjem obojene ispitivane hemikalije, a u slučaju više ispitivanja treba ssprovesti nezavisnu kontrolu NSCliving sa svakim sprovedenim ispitivanjem (u svakom ciklusu) zbog svojstvene biološke varijabilnosti živih tkiva. Prava vijabilnost tkiva zatim se računa kao postotak vijabilnosti tkiva koji se dobija iz živih tkiva izloženih interferirajućoj ispitivanoj hemikaliji i inkubiranih s rastvorom MTT-a, umanjeno za postotak nespecifične boje dobijen sa živim tkivima izloženima interferirajućoj ispitivanoj hemikaliji i inkubiranima s medijem bez MTT-a, što se sprovodi istovremeno kad i ispitivanje koje se ispravlja (%NSCliving).

Za ispitivane hemikalije za koje se utvrdi da uzrokuju i direktnu redukciju MTT-a i interferenciju s bojom pri mjerenju standardne apsorbancije (OD) bi će potreban i treći skup kontrola, uz kontrole NSMTT i NSCliving. To je obično slučaj kod tamno obojenih ispitivanih hemikalija koje interferiraju s MTT testom (npr. plave, ljubičaste ili crne hemikalije) jer njihova intrinzična boja sprečava procjenu njihove sposobnosti da direktno redukuju MTT. Te se ispitivane hemikalije mogu vezati i na živa i na mrtva tkiva te se stoga kontrolom NSMTT može ispraviti ne samo potencijalna direktna redukcija MTT-a ispitivanom hemikalijom, već i interferencija s bojom koja je posljedica vezanja ispitivane hemikalije na mrtva tkiva. To bi moglo dovesti do dvostrukog ispravka za interferenciju s bojom jer se kontrolom NSCliving već ispravlja interferencija s bojom koja je posljedica vezanja ispitivane hemikalije na živa tkiva. Kako bi se izbjegao mogući dvostruki ispravak za interferenciju s bojom, treba sprovesti treću kontrolu za nespecifičnu boju u mrtvim tkivima (NSCkilled). U toj dodatnoj kontroli ispitivana hemikalija primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka mrtvog tkiva, koja se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja, ali se u koraku inkubacije MTT-a inkubiraju medijem, a ne rastvorom MTT-a. Dovoljna je jedna kontrola NSCkilled po ispitivanoj hemikaliji ne u zavisnosti o broju sprovedenih nezavisnih ispitivanja/ciklusa, ali treba je sprovoditi istovremeno s kontrolom NSMTT i, ako je moguće, s istom šaržom tkiva. Prava vijabilnost tkiva zatim se računa kao postotak vijabilnosti tkiva koji se dobija iz živih tkiva izloženih ispitivanoj hemikaliji umanjeno za %NSMTT i %NSCliving te uvećano za postotak nespecifične boje dobijen s mrtvim tkivima izloženima interferirajućoj ispitivanoj hemikaliji i inkubiranima medijem bez MTT-a, izračunano u odnosu na negativnu kontrolu koja se sprovodi istovremeno kad i ispitivanje koje se ispravlja (%NSCkilled).

Važno je napomenuti da nespecifična redukcija MTT-a i nespecifična interferencija s bojom mogu povećati očitanja ekstrakta tkiva izvan raspona linearnosti spektrofotometra. Na osnovu toga svaki bi laboratorij prije početka ispitivanja ispitivanih hemikalija u regulatorne svrhe trebao utvrditi raspon linearnosti svojeg spektrofotometra s MTT formazanom (CAS # 57360-69-7) iz komercijalnog izvora. Mjerenje standardne apsorbancije (OD) upotrebom spektrofotometra primjereno je za procjenu supstanci koje direktno redukuju MTT i ispitivanih hemikalija koje interferiraju s bojom ako je optička gustina ektrakata tkiva dobijena ispitivanom hemikalijom bez ikakvih ispravaka za direktnu redukciju MTT-a i/ili interferencija s bojom unutar linearnog raspona spektrofotometra ili ako je neispravljeni postotak vijabilnosti dobijen ispitivanom hemikalijom već ≤ 50 %. Ipak, rezultate za ispitivane hemikalije koji daju %NSMTT i/ili %NSCliving ≥ 50 % negativne kontrole trebalo bi oprezno tumačiti jer je to granična vrijednost koja se upotrebljava za razlikovanje klasifikovanih i neklasifikovanih hemikalija.

Kod obojenih ispitivanih hemikalija koje nisu kompatibilne s mjerenjem standardne apsorbancije (OD) zbog prejake interferencije s MTT testom, za mjerenje MTT formazana može se upotrijebiti alternativni postupak HPLC/UPLC spektrofotometrije. Sistem HPLC/UPLC spektrofotometrije

omogućuje izdvajanje MTT formazana iz ispitivane hemikalije prije njegove kvantifikacije. Zato pri upotrebi HPLC/UPLC spektrofotometrije nikada nisu potrebne kontrole NSCliving i NSCkilled, neu zavisnosti o hemikaliji koja se ispituje. Kontrole NSMTT ipak bi se trebale upotrijebiti ako se sumnja u to da ispitivana hemikalija direktno redukuje MTT ili ima boju koja sprečava procjenu sposobnosti direktne redukcije MTT-a. Ako se za mjerenje MTT formazana upotrebljava HPLC/UPLC spektrofotometrija, postotak vijabilnosti tkiva računa se kao postotak površine pika MTT formazana dobijen sa živim tkivima izloženima ispitivanoj hemikaliji u odnosu na pik MTT formazana dobijen s istovremenom negativnom kontrolom. Za ispitivane hemikalije koje mogu direktno redukovati MTT prava vijabilnost tkiva računa se kao postotak vijabilnosti tkiva dobijen sa živim tkivima izloženima ispitivanoj hemikaliji umanjen za %NSMTT. Naposljetku, treba napomenuti da se ne mogu procijeniti supstance koje direktno redukuju MTT i koje ujedno mogu interferirati s bojom, koje se zadržavaju u tkivima nakon tretiranja i redukuju MTT toliko jako da dovode do optičke gustine (upotrebom mjerenja standardne optičke gustine) ili površina pika (upotrebom UPLC/HPLC spektrofotometrije) ispitivanih ekstrakata tkiva koji su izvan raspona linearnosti spektrofotometra, iako do toga dolazi samo u isključivo rijetkim slučajevima.

HPLC/UPLC spektrofotometrija može se upotrebljavati i sa svim vrstama ispitivanih hemikalija (obojenima i neobojenima, koje redukuju MTT i koje ga ne redukuju) za mjerenje MTT formazana. Zbog raznolikosti sistema HPLC/UPLC spektrofotometrije, kvalifikaciju sistema HPLC/UPLC spektrofotometrije trebalo bi dokazati prije njegove upotrebe za kvantificiranje MTT formazana iz ekstrakata tkiva tako da sistem ispuni kriterijume prihvatljivosti za skup standardnih parametara kvalifikacije u skladu s parametrima. Ti ključni parametri i njihovi kriterijumi prihvatljivosti prikazani su u Dodatku 4. Kad se ispune kriterijumi prihvatljivosti definisani u Dodatku 4., smatra se da je sistem HPLC/UPLC spektrofotometrije kvalifikovan i spreman za mjerenje MTT formazana u eksperimentnim uslovima opisanima u ovoj ispitnoj metodi.

Kriterijumi prihvatljivosti

U svakoj ispitnoj metodi u kojoj se upotrebljavaju valjane šarže modela RhE vrijednost optičke gustine tkiva tretiranih negativnom kontrolom trebala bi ukazivati na kvalitet tkiva nakon što su dovršeni svi koraci dopreme i preuzimanja te svi postupci protokola. Vrijednosti optičke gustine kontrola ne bi smjele biti ispod proslih propisanih granica. Isto tako, tkiva tretirana pozitivnom kontrolom, tj. 5-postotnom vodenom rastvorom SDS, trebaju pokazivati sposobnost da reagujuju na nadražujuću hemikaliju u uslovima ispitne metode. Povezane i odgovarajuće mjere varijabilnosti između tkiva u ponavljanjima, tj. standardne devijacije, trebaju biti unutar granica prihvatljivosti utvrđenih za ispitni model koji se upotrebljava.

Tumačenje rezultata i model predviđanja

Vrijednosti optičke gustine dobijene sa svakom ispitivanom hemikalijom mogu se koristiti za izračun postotka vijabilnosti normaliziranog u odnosu na negativnu kontrolu, koja je određena kao 100 %. U slučaju upotrebe HPLC/UPLC spektrofotometrije postotak vijabilnosti tkiva računa se kao postotak površine pika MTT formazana dobijen sa živim tkivima izloženima ispitivanoj hemikaliji u odnosu na pik MTT formazana dobijen s istovremenom negativnom kontrolom. Potrebno je jasno utvrditi i dokumentirati graničnu vrijednost postotka vijabilnosti ćelija koja se koristi za razlikovanje nadražujućih hemikalija od neklasifikovanih ispitivanih hemikalija te statistički postupak ili postupke koji su korišteni za ocjenjivanje rezultata i identifikaciju nadražujućih hemikalija te dokazati njihovu prikladnost (informacije potražiti u standardnim operativnim pokolonama ispitnih modela). Granične vrijednosti za predviđanje nadraživanja navedene su u nastavku:

- smatra se da je za ispitivanu hemikaliju potrebno klasifikovanje i označivanje u skladu s UN

GHS-om ili CLP-om (2. kategorija ili 1. kategorija) ako je srednji postotak vijabilnosti tkiva nakon izlaganja i inkubacije nakon tretiranja manji ili jednak (≤) 50 %. Budući da se ispitnim modelima RhE obuhvaćenima ovom ispitnom metodom ne mogu razlikovati 1. i 2. kategorija sistema UN GHS-a ili CLP-a, bit će potrebne dodatne informacije o nagrizanju kože kako bi se odlučilo o konačnom klasifikovanju. Ako se utvrdi da ispitivana hemikalija nije nagrizajuća (npr. na osnovu ispitne metode TM.40., B.40.bis ili B.65.) i pokazuje vijabilnost tkiva nakon izlaganja i inkubacije nakon tretiranja manju od ili jednaku (≤) 50 %, ispitivana hemikalija smatra se nadražujućom za kožu u skladu s 2. kategorijom UN GHS-a ili CLP-a,

- može se smatrati da ispitivana hemikalija nije nadražujuća za kožu u skladu s oznakom „bez kategorije" UN GHS-a ili CLP-a ako je vijabilnost tkiva nakon izlaganja i inkubacije nakon tretiranja viša od (>) 50 %.

PODACI I IZVJEŠTAVANJE

Podaci

Podatke pojedinačnih ponavljanja uzoraka tkiva u svakom ciklusu (npr. vrijednosti OD i podatke o izračunanom postotku vijabilnosti ćelija za svaku ispitivanu hemikaliju, zajedno s klasifikovanjem) treba prikazati u tabličnom obliku, uključujući eventualne podatke iz ponovljenih eksperimenta. Osim toga, trebalo bi prijaviti i srednje vrijednosti ± standardno odstepene za svaki ciklus. Za svaku ispitanu hemikaliju treba navesti zapažene interakcije s MTT reagensom i obojenim ispitivanim hemikalijama.

Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju trebalo bi sadržiti sljedeće informacije:

Ispitivana hemikalija i kontrolne hemikalije:

— supstanca s jednim sastojkom: hemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.,
— supstanca s više sastojaka, UVCB supstanca i smjesa: opis (koliko je to moguće) hemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizičko-hemijskih svojstava sastojaka,
— fizički izgled, rastvorljivost u vodi i bilo koja druga relevantna fizičko-hemijska svojstva,
— izvor, broj serije, ako su dostupni,
— tretiranje ispitivane hemikalije/kontrolnih hemikalija prije ispitivanja, ako je primjenljivo (npr. grijanje, mljevenje),
— stabilnost ispitivane hemikalije, rok upotrebe ili datum za ponovnu analizu ako je poznat,
— uslovi skladištenja.

Model RhE i protokol koji se upotrebljavaju (te obrazloženje izbora, ako je primjenjivo)

Ispitni uslovi:

— model RhE koji se upotrebljava (uključujući broj šarže),
— informacije o kalibraciji mjernog uređaja (npr. spektrofotometar), talasna dužina i pojas propuštanja (ako je primjenjivo) koji se upotrebljavaju za kvantifikaciju MTT formazana te raspon linearnosti mjernog uređaja, opis metode koja se upotrebljava za kvantifikaciju MTT formazana,

— opis kvalifikacije sistema HPLC/UPLC spektrofotometrije, ako je primjenjivo, potpune popratne informacije o konkretnom modelu RhE koji je korišten, uključujući njegove radne karakteristike. To bi, među ostalim, trebalo uključivati:
  1. vijabilnost;
  2. funkciju barijere;
  3. morfologiju;
  4. obnovljivost i prediktivnost;
  5. kontrole kvalitete (KK) modela,
— upućivanje na prošle podatke za predmetni model. To bi, među ostalim, trebalo uključivati prihvatljivost podataka o kontroli kvaliteta s upućivanjem na prošle podatke o šarži,
— dokazivanje osposobljenosti za izvođenje ispitne metode prije rutinske upotrebe ispitivanjem supstanci koje služe za dokazivanje osposobljenosti.

Ispitni postupak:

— pojedinosti o upotrijebljenom ispitnom postupku (uključujući postupke ispiranja upotrijebljene nakon perioda izlaganja), doza upotrijebljene ispitne hemikalije i kontrola,
— trajanje i temperatura izlaganja i perioda inkubacije nakon izlaganja,
— oznake kontrola koje se koriste za supstance koje direktno redukuju MTT i/ili ispitivane hemikalije za bojenje, ako je primjenjivo,
— broj ponavljanja uzoraka tkiva upotrijebljenih po ispitivanoj hemikaliji i kontrolama (pozitivna kontrola, negativna kontrola i NSMTT, NSCliving i NSCkilled, ako je primjenjivo),
— opis primijenjenih kriterijuma za odlučivanje/modela predviđanja na osnovu upotrijebljenog RhE modela,
— opis mogućih izmjena ispitne metode (uključujući postupke ispiranja).

Kriterijumi prihvatljivosti ciklusa i ispitivanja:

— srednje vrijednosti i rasponi prihvatljivosti pozitivnih i negativnih kontrola na osnovu proslih podataka, prihvatljiva varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva za pozitivne i negativne kontrole,
— prihvatljiva varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva za ispitivanu hemikaliju.

Rezultati:

— tablični prikaz podataka za pojedinačnu ispitivanu hemikaliju, za svaki ciklus i svako ponovljeno mjerenje, uključujući optičku gustinu ili površinu pika MTT formazana, postotak vijabilnosti tkiva, srednji postotak vijabilnosti tkiva i standardnu devijaciju,
— ako je primjenjivo, rezultati kontrola upotrijebljenih za supstance koje direktno redukuju MTT i/ili ispitivane hemikalije za bojenje, uključujući optičku gustinu ili površinu pika MTT formazana, %NSMTT, %NSCliving, %NSCkilled, standardnu devijaciju te konačni tačni postotak vijabilnosti tkiva,
— rezultati dobijeni s ispitivanom hemikalijom/hemikalijama i kontrolama u odnosu na utvrđene kriterijume prihvatljivosti za ciklus i ispitivanje,
— opis drugih uočenih efekata,
— utvrđeno klasifikovanje, s upućivanjem na primijenjeni model predviđanja/kriterijume odlučivanja.

Rasprava o rezultatima

Zaključci

Dodatak 2. ISPITNI MODELI UKLJUČENI U OVU ISPITNU METODU

Br.	Naziv ispitnog modela	Vrsta validacione studije	Referentni dokumenti
1	EpiSkin™	Cjelokupna prospektivna validaciona studija (2003.–2007.). Elementi ovog modela upotrijebljeni su kako bi se definisali ključni elementi ispitne metode izvornih i ažuriranih ECVAM-ovih zahtjeva izvođenja (39., 40. i 21.). Osim toga, podaci dobijeni metodom koji se odnose na identifikaciju neklasifikovanih i klasifikovanih supstanci činili su glavnu osnovu za određivanje vrijednosti specifičnosti i osjetljivosti izvornih zahtjeva izvođenja.	(2., 10., 11., 14., 15., 16., 17., 18., 19., 20., 21., 23., 32., 39. i 40.)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*izvorno*): ispitni model prvo je podvrgnut cjelokupnoj prospektivnoj validaciji zajedno s modelom br. 1 iz 2003.–2007. Elementi ovog modela upotrijebljeni su kako bi se definisali ključni elementi ispitnih metoda izvornih i ažuriranih ECVAM-ovih zahtjeva izvođenja (39., 40. i 21.). EpiDerm™ SIT (EPI-200): Izmjena izvornog modela EpiDerm™ validirana je 2008. upotrebom izvornih ECVAM-ovih zahtjeva izvođenja (21.) .	(2., 10., 12., 13., 15., 16., 17., 18., 20., 21., 23., 33., 39. i 40.2., 21., 22., 23. i 33.))
3	SkinEthic™ RHE	Validaciona studija na osnovu izvornih ECVAM-ovih zahtjeva izvođenja (21.) iz 2008.	(2., 21., 22., 23. i 31.)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Validaciona studija (2011.–2012.) na osnovu zahtjeva izvođenja iz Smjernice OECD-a za ispitivanje 439 (8.), koji se baziraju na ažuriranim ECVAM-ovim zahtjevima izvođenja (39. i 40.).	(24., 25., 26., 27., 28., 35., 39. i 40.) te zahtjevima izvođenja ove smjernice za ispitivanje (8.)

SIT : ispitivanje nadraživanja kože

RHE : rekonstruirana ljudska epiderma

Dodatak 3. PARAMETRI PROTOKOLA SPECIFIČNI ZA SVAKI ISPITNI MODEL UKLJUČEN U OVU ISPITNU METODU

Modeli RhE imaju vrlo slične protokole i u svakom se modelu upotrebljava period nakon inkubacije od 42 sata. Varijacije se uglavnom odnose na tri parametra povezana s različitim funkcijama barijere ispitnih modela i navedene su u nastavku: A) vrijeme i volumen prije inkubacije; B) primjena ispitne hemikalije i C) volumen nakon inkubacije.

	EpiSkin™ (standardna metoda)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Predinkubacija				
Vrijeme inkubacije	18–24 h	18–24 h	< 2 h	15–30 h
Volumen medija	2 ml	0,9 ml	0,3 ili 1 ml	0,5 ml
B) Primjena ispitivane hemikalije				
Za tečnosti	10 µl (26 µl/cm^2)	30 µl (47 µl/cm^2)	16 µl (32 µl/cm^2)	25 µl (83 µl/cm^2)
Za čvrste supstance	10 mg (26 mg/cm^2) + DV (5 µl)	25 mg (39 mg/cm^2) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm^2) + DV (10 µl)	25 mg (83 mg/cm^2) + DV (25 µl)
Upotreba najlonske mreže	Ne upotrebljava se	Prema potrebi	Primijenjena	Ne upotrebljava se
Ukupno vrijeme primjene	15 minuta	60 minuta	42 minute	15 minuta

Temperatura primjene	ST	a) na sobnoj temperaturi 25 minuta b) na 37 ^{o}C 35 minuta	ST	ST
C) Volumen nakon inkubacije				
Volumen medija	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
D) Najveća prihvatljiva varijabilnost				
Standardna devijacija između ponovljenih uzoraka tkiva	SD ≤ 18	SD ≤ 18	SD ≤ 18	SD ≤ 18
ST: sobna temperatura DV: destilovana voda DPBS: Dulbeccova fiziološki rastvor puferirana fosfatnim puferom				

Dodatak 4. KLJUČNI PARAMETRI I KRITERIJUMI PRIHVATLJIVOSTI ZA KVALIFIKACIJU SISTEMA HPLC/UPLC SPEKTROFOTOMETRIJE ZA MJERENJE MTT FORMAZANA EKSTRAHUJENOG IZ TKIVA RHE

Parametar	Protokol izveden iz smjernica Uprave za hranu i lijekove (FDA)	Kriterijumi prihvatljivosti
Selektivnost	Analiza izopropanola, slijepe probe na živom tkivu (ekstrakt izopropanola iz živih tkiva RhE bez ikakvog tretiranja), slijepe probe na mrtvom tkivu (ekstrakt izopropanola iz mrtvih tkiva RhE bez ikakvog tretiranja)	Površina$_{interference}$ ≤ 20 % površine$_{LLOQ}$
Preciznost	Kontrole kvalitete (tj. MTT formazan pri 1,6 µg/ml, 16 µg/ml i 160 µg/ml) u izopropanolu (n = 5)	CV ≤ 15 % ili ≤ 20 % za LLOQ
Tačnost	Kontrola kvaliteta u izopropanolu (n = 5)	%Dev ≤ 15 % ili ≤ 20 % za LLOQ
Efekat matrice	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 5)	85 % ≤ efekat matrice kao % ≤ 115 %

Prijenos	Analiza izopropanola nakon standardnog ULOQ	$Površina_{interference}$ ≤ 20 % $površine_{LLOQ}$
Obnovljivost (u danu)	3 nezavisne kalibracijske krive (na osnovu šest uzastopnih razrjeđivanja 1/3 MTT formazana u izopropanolu, počevši s ULOQ-om, tj. 200 µg/ml) Kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 5)	Kalibracijske krive: %Dev ≤ 15 % ili ≤ 20 % za LLOQ Kontrole kvaliteta: %Dev ≤ 15 % i CV ≤ 15 %
Obnovljivost (među danima)	Prvi dan: 1 : kalibraciona kriva i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3) Drugi dan: 1 : kalibraciona kriva i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3) Treći dan: 1 : kalibraciona kriva i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3)	
Kratkoročna stabilnost MTT formazana u ekstraktu tkiva RhE	Kontrole kvaliteta u slijepoj probi na živom tkivu (n = 3) analizirane na dan pripreme i nakon 24 sata skladištenja na sobnoj temperaturi	%Dev ≤ 15 %
Dugoročna stabilnost MTT formazana u ekstraktu tkiva RhE, ako je potrebno	Kontrole kvaliteta u slijepoj probi na živom tkivu (n = 3) analizirane na dan pripreme i nakon nekoliko dana skladištenja na utvrđenoj temperaturi (npr. 4 ^{o}C, –20 ^{o}C, –80 ^{o}C)	%Dev ≤ 15 %

B. 48. METODA ISPITIVANJA NA IZOLOVANIM OČIMA PILIĆA ZA IDENTIFIKACIJU SUPSTANCI NAGRIZAJUĆIH I JAKO NADRAŽUJUĆIH ZA OČI

Uvod

Metoda ispitivanja na izolovanim očima pilića (ICE) je in vitro metoda koja se može primijeniti za klasifikaciju supstanci i smješa kao supstanci nagrizajućih i jako nadražujućih za oči. Jako nadražujuće supstance definisane su kao supstance koje izazivaju okularne lezije koje kod zečeva traju najmanje 21 dan nakon primjene supstance. Iako se ne smatra potpunom zamjenom za in vivo test na očima zečeva, ICE metoda preporučuje se za primjenu kao dio strategije ispitivanja za regulatornu klasifikaciju i označivanje u okviru konkretne primjenjivosti. Supstance I smješe koje se ispituju i koje su pozitivne mogu se bez dodatnog testiranja na zečevima klasifikovati kao supstance korozivno i jako nadražujuće za oči. Supstanca koja daje negativan rezultat na testu se testira na zečevima strategijom sekvencijskog ispitivanja kako je I prikazano u Smjernicama za ispitivanje OECD–a 405.

Cilj metode ispitivanja je da opiše postupke koji se koriste za ocjenjivanje potencijalno korozivnog ili jako nadražujućeg djelovanja supstance koja se ispituje, koje se mjeri

sposobnošću supstance da izazove toksičnost u enukleiranom oku pileta. Toksički efekti na rožnjači mjere se:

- kvalitativnom procjenom zamućenja,
- kvalitativnom procjenom oštećenja epitela zbog primjene fluoresceina na oko (retencija fluoreceina),
- kvantitativnim mjerenjem povećane debljine (otoka) i kvalitativnim ocjenjivanjem makroskopskog morfološkog oštećenja površine.

Zamućenje rožnjače, otok i oštećenja nakon izlaganja supstanci koja se ispituje procjenjuju se pojedinačno, a zatim se kombinuju u cilju utvrĐivanja da li supstancu treba klasifikovati kao nadražujuću za oči.

ICE ispitnom metodom testirane su i supstance nadražujuće za oči koje izazivaju lezije koje nestaju u manje od 21 dan i supstance koje nisu nadražujuće. Međutiim, točnost i pouzdanost ICE ispitne metode za supstance u tim kategorijama nisu formalno ocijenjene.

Identifikovana ograničenja ICE metode baziraju se na postotku lažno pozitivnih rezultata za alkohole i lažno negativnih rezultata za čvrsze supstance i površinski aktivne supstance.

Kod svih postupaka s očima pilića treba poštovati propise laboratorijaa i postupke za rukovanje materijalom dobijenim od ljudi ili životinja koji obuhvata ali se ne ograničava na tkiva i tkivne rastvore.

2. Princip metode

ICE metoda je organotipski model koji kratkoročno obezbjeđuje održavanje pilećeg oka in vitro. Oštećenje koje uzrokuju supstance procjenjuje se određivanjem otoka rožnjače, zamućenja i retencije fluoresceina. Dok posljednja dva parametra podrazumijevaju kvalitativnu procjenu, za analizu otoka rožnjače potrebna je kvantitativna procjena. Svako se mjerenje preSupstancaa bilo u kvantitativni nalaz koji se koristi za izračun sveukupnog indeksa nadraživanja, ili joj se dodjeljuje kvalitativna kategorizacija za klasifikaciju supstance kao in vitro korozivno ili jako nadražujuće za oči. Bilo koji od ta dva rezultata mogu se zatim upotrijebiti za predviĐanje potencijala supstance za korozivno i jako nadražujuće djelovanje na oči in vivo.

2.1. Izvor i starost pilećih očiju

U ICE metodi upotrebljavaju se oči prikupljene od pilića iz klanice gdje su usmrćeni za ljudsku prehranu, čime je eliminisana potreba za laboratorijaskim životinjama. Koriste se oči samo zdravih životinja koje se smatraju pogodnim za lanac prehrane ljudi.

Iako nije sprovedena kontrolna studija za ocjenu optimalnog doba pilića, dob i težina pilića koji se upotrebljavaju u metodi uobičajeni su za mlade piliće koji se preraĐuju u klanici ćivine (tj. približno 7 nedelja stari, 1,5-2,5 kg teški).

2.2. Prikupljanje i prevoz očiju u laboratorijau

Glave treba odstraniti odmah nakon sedacije pilića koja se obično sprovodi elektrošokom i incizijom vrata radi oticanja krvi. Treba naći lokalni izvor pilića u blizini laboratorijaa kako bi se

pileće glave mogle prevesti iz klanice u laboratorijau dovoljno brzo da ne doĐe do kvarenja i/ili bakteriološke kontaminacije. Vrijeme između prikupljanja pilećih glava i upotrebe očiju u ICE metodi treba biti što kraće (obično dva sata) i treba dokazati da nema uticaja na rezultate metode. Ti se rezultati baziraju na kriterijumima izbora očiju kao i na pozitivnim i negativnim kontrolnim reakcijama. Sve oči koje se upotrebljavaju u testu su iz iste grupe očiju prikupljene određenog dana.

Disekcija očiju obavlja se u laboratorijai, intaktne glave prevoze se iz klanice na poljašnjoj temperaturi u plastičnim kutijama sa vlažnim peškirima natopljenim fiziološkim rastvorom.

2.3. Kriterijumi za izbor očiju koje se koriste u metodi ICE

Oči koje imaju visoku polaznu obojenost fluoresceinom (tj. > 0,5) ili visok nalaz zamućenja rožnjače (tj. > 0,5) nakon enukleacije odbacuju se.

Svaka tretirana grupa i paralelna pozitivna kontrola sadrže najmanje tri oka. Negativna kontrolna grupa ili grupa koja se kontroliše rastvorom (ako se kao rastvor ne koristi fiziološka rastvor) sadrži barem jedno oko.

3. Postupak

3.1. Priprema očiju

Očni kapci oprezno se izrežu pazeći da se ne ošteti rožnjača. Integritet rožnjače se brzo procijeni kapljicom 2 %-tnog (w/v) natrijumovog fluoresceina koji se nanese i ostavi na površini rožnjače nekoliko sekundi i zatim ispere fiziološkom rastvorom. Oči tretirane fluoresceinom zatim se pregledaju bio-mikroskopom kako bi se provjerilo da je rožnjača neoštećena (tj. da su nalazi retencije fluoresceina i zamućenja rožnjače ≤ 0,5).

Ako je neoštećeno, oko se zatim dalje enukleira pazeći da se ne ošteti rožnjača. Očna jabučica se izvuče iz orbite, tako da se treći očni kapak čvrsto drži hirurškim forcepsom, a očni živci se prerežu zakrivljenim makazama sa tupim vrhom. Važno je da se prejakim pritiskom ne ošteti rožnjača (tj. treba izbjeći artefakte pritiska).

Kada se oko izvadi iz orbite, na njemu ostaje vidljiv dio očnog živca. Čim je izvaĐeno iz orbite, oko se stavlja na upijajući podložak i odrežu se treći kapak i ostalo vezivno tkivo.

Enukleirano oko se stavi u steznik od nerđajućeg čelika sa rožnjačom postavljenom vertikalno. Steznik se zatim prenese u komoru uređaja za superfuziju. Steznik treba tako postaviti u uređaj za superfuziju da drip fiziološkog rastvora cijelu rožnjaču. Komore uređaja za superfuziju su u uslovima kontrolisane temperature na 32 ± 1,5 °C. U Dijelu III data je shema tipskog uređaja za superfuziju i steznik za oči, koji se mogu komercijalno nabaviti ili izraditi. Uređaj se može prilagoditi da zadovolji potrebe pojedinih laboratorijaa (npr. da može primiti različiti broj očiju). Nakon što su stavljene u uređaj za superfuziju, oči se ponovo pregledaju biomikroskopom kako bi se obezbijedilo da nisu oštećene u postupku disekcije. Za to vrijeme na apeksu rožnjače izmjeriti i debljinu rožnjače pomoću alata za mjerenje dubine na biomikroskopu. Oči sa: nalazom retencije fluoresceina > 0,5; zamućenjem rožnjače > 0,5; ili drugim znacima oštećenja treba zamijeniti.

Za oči koje nisu odbačene zbog bilo kojeg od ovih kriterijuma, treba odbaciti svako oko s debljinom rožnjače koja za više od 10 % odstupa od srednje vrijednosti za sve oči. Korisnik se upozorava da sa različito podešenom širinom procjepa svetiljke mikroskopa, biomikroskopi mogu dati različite rezultate debljine rožnjače. Širina je podešena na 0,095 mm.

Čim su sve oči pregledane i odobrene, oči se inkubiraju približno 45 do 60 minuta da bi se uravnotežile s sistemom koji se ispituje prije doziranja. Nakon uravnoteženja, za debljinu rožnjače i zamućenje kao referentna izmjerena vrijednost bilježi se nula (tj. vrijeme = 0) koja služi kao polazna vrijednost. Nalaz fluoresceina utvrđen kod disekcije koristi se kao polazno mjerenje za taj kriterijum ocjenjivanja.

3.2. Primjena supstance koja se ispituje

Odmah nakon nultih referentnih mjerenja, oko se (u držaču) vadi iz uređaja za superfuziju, postavlja u horizontalni položaj i supstanca se nanosi na rožnjaču.

Supstance u tečnom stanju koje se ispituju obično se ispituju nerazrijeđene, ali se mogu razrijediti ako se to smatra neophodnim. Rastor za razrijeđene supstance je fiziološki rastvor. Međutiim, pod kontrolisanim uslovima mogu se koristiti i alternativni rastvor, ali primjerenost drugih rastvora osim fiziološkog rastvora treba dokazati.

Supstance u tečnom stanju primjenjuju se na rožnjaču tako da je cijela površina rožnjače isto pokriva supstancom; standardni volumen iznosi 0,03 mL.

Ako je moguće, čvrste supstance treba što bolje zdrobiti pomoću tučka ili samljeti. Prah se nanosi na rožnjaču tako da je površina jednako pokrivena supstancom; standardna količina iznosi 0,03 g.

Supstanca koja se ispituje (tečna ili čvrsta) ostavi se da djeluje 10 sekundi i zatim se ispere iz oka fiziološkim rastvorom (približno 20 mL) na poljašnjoj temperaturi. Oko se (u svom držaču) zatim vraća u uređaj za superfuziju u prvobitnom uspravnom položaju.

3.3. Referentne supstance

Paralelne negativne kontrole ili kontrole rastvorom/nosačem i pozitivne kontrole uvrstiti u svaki eksperiment.

Kada se ispituju nerazrijeđene tečnosti ili čvrste supstance, kako bi se otkrile nespecifične promjene u sistemu koji se ispituje i obezbijedilo da uslovi sprovođenja metode ne dovedu do neprimjerene reakcije nadraživanja, kao paralelna negativna kontrola u metodi ICE koristi se fiziološki rastvor.

Kada se ispituju razrijeđene tečnosti, u metodu paralelno se uvodi grupa za kontrolu rastvorom/nosačem kako bi se otkrile nespecifične promjene u sistemu koji se ispituje i osiguralo da uslovi sprovođenja metode ne dovedu do neprimjerene reakcije nadraživanja. Smije se koristiti samo rastvor/nosač za koji nema štetnih efekata na system koji se ispituje.

Supstanca za koju se zna da nadražuje oči uvodi se u svaki eksperiment kao paralelna pozitivna kontrolna supstanca radi verifikacije da je izazvana odgovarajuća reakcija. Budući da

se ICE metoda upotrebljava kao metoda za identifikaciju nagrizajućih ili jako nadražujućih supstanci, pozitivna kontrolna supstanca trebala bi biti referentna supstanca koja u metodi izaziva jaku reakciju. Međutiim, kako bi se obezbijedila mogućnost procjene varijabilnosti reakcije pozitivne kontrolne supstance tokom vremena, jačina reakcije na nadražujuću supstancu ne bi trebala biti prekodnosna. Treba imati dodatne in vitro podatke za pozitivnu kontrolnu supstancu kako bi se za pozitivnu kontrolu mogao izračunati statistički definisani prihvatljivi raspon. Ako za određenu pozitivnu kontrolnu supstancu nisu dostupni odgovarajući podaci iz ICE metoda, možda će biti potrebno ssprovesti studije kako bi se došlo do tih podataka.

Primjeri pozitivnih kontrolnih supstanci za tečne supstance koje se ispituju su 10 %-tna sirćetne kiselina, a primjeri pozitivnih kontrolnih supstanci za čvrste supstance koje se ispituju su natrijum hidroksid ili imidazol.

Etaloni su supstance korisne za ocjenjivanje potencijala nadražujućeg djelovanja na oči nepoznatih hemikalija iz specifične kategorije hemikalija ili proizvoda ili za ocjenjivanje potencijala relativnog nadražujućeg djelovanja supstanci nadražujuće za oči unutar specifičnog raspona nadražujućih reakcija.

3.4. Izmjereni efekti

Tretirane rožnjače ocjenjuju se prije tretiranja i 30, 75, 120, 180 i 240 minuta (± 5 minuta) nakon ispiranja poslije tretiranja. Ti intervali osiguravaju dovoljan broj mjerenja tokom četvorosatnog tretiranja, ostavljajući dovoljno vremena između mjerenja za propisana posmatranja koja treba ssprovesti na svim očima.

Izmjereni efekti koji se ocjenjuju su zamućenje i otok rožnjače, retencija fluoresceina i morfološki efekti (tj. pojava rupica ili slabljenja epitela). Svi efekti, uz izuzetak retencije fluoresceina (koja se određuje samo prije tretiranja i 30 minuta nakon izlaganja supstanci koja se ispituje) određuju se u svakom od gore navedenih intervala.

Preporučuje se fotografijama dokumentovati zamućenje rožnjače, retenciju fluoresceina, morfološke efekte i, ako je sprovedena, histopatologiju.

Poslije zadnjeg pregleda po isteku četiri sata, oči konzervirati u odgovarajućem fiksativu (npr. puferisanom neutralnom formalinu) za eventualnu histopatološku pretragu.

Otok rožnjače određuje se mjerenjima debljine rožnjače optičkim pahimetrom na biomikroskopu. Izražava se kao postotak, a iizračunava se iz prečnika debljine rožnjače prema sljedećoj formuli:

$$\left(\frac{\text{debljina rožnjače u vremenz t} - \text{debljina rožnjače u vrement t}=o}{\text{debljina rožnjače u vremenu t}=0}\right) x 100$$

Srednji posto otoka rožnjače za sve testirane oči iizračunava se za sva vremena posmatranja. Na osnovu najvećeg srednjeg nalaza za otok rožnjače bez obzira u kojem je vremenu posmatranja utvrĐen, dobija se opšti nalaz kategorije za svaku supstancu koja se ispituje.

Za iizračunavanje zamućenja rožnjače uzima se najjače zamućena površina rožnjače. Srednja vrijednost zamućenja rožnjače za sve testirane oči iizračunava se u svim vremenskim tačkama posmatranja. Na osnovu najvećeg srednjeg nalaza zamućenja rožnjače bez obzira u kojoj je vremenskoj tački posmatranja utvrĐen, dobija se opšti nalaz kategorije za svaku supstancu ispitivanja (Tabela 1.).

Tabela 1. Nalazi zamučenja rožnjače

Nalaz	Posmatranja
0	Nema zamućenja
0.5	Vrlo slabo zamućenje
1	Rijetke ili difuzne površine; detalji šarenice jasno zatamnjeni
2	Lako uočljiva napola providna površina, detalji šarenice lagano zatamnjeni
3	Jako zamućenje rožnjače, konkretni detalji šarenice visu vidljivi, veličina zenice jedva je uočljiva
4	Potpuno zamućenje rožnjače, šarenica nije vidljiva

Srednja vrijednost retencije fluoresceina za sve testirane oči iizračunava se samo za 30-minutnu tačku posmatranja i koristi za opšti nalaz kategorije za svaku supstancu koja se ispituje (Tabela
2.).

Tabela 2. Nalazi retencije fluoresceina

Nalaz	Posmatranja
0	Nema retencije fluoresceina
0.5	Vrlo slaba obojenost pojedinačnih ćelija
1	Obojanost rijetkih pojedinačnih ćelija po tretiranoj površini rožnjače
2	Gusta obojanost pojedinaćnih ćelija, fokalno ili konfuetalno
3	Retencija fluoresceina na velikim površinama rožnjače, konfuentalno

Morfološki efekti obuhvatajuu, rupice na epitelnim ćelijama rožnjače, ‚slabljenje epitela', ‚grublju' površinu rožnjače i ‚lijepljenje' supstance koja se isptuje za rožnjaču. Ti nalazi mogu varirati u jačini i mogu se javiti istovremenoo.

4. Podaci i izvještavanje

4.1. Ocjenjivanje podataka

Rezultate zamućenja i otoka rožnjače i retencije fluoresceina treba ocjenjivati odvojeno kako bi se dobila ICE kategorija za svaki mjereni efekat. ICE kategorije za svaki mjereni efekat zatim se kombinuju i zajedno određuju klasifikaciju svake supstance s obzirom na njeno nadražujuće djelovanje.

4.2. Kriterijumi za donošenje odluke

Kada je svaki mjereni efekat ocijenjen, ICE kategorije dodjeljuju se na osnovu unaprijed određenog raspona. Tumačenje debljine rožnjače (Tabela 3.), zamućenja (Tabela 4.) i retencije fluoresceina (Tabela 5.) primjenom četiri ICE kategorije sprovodi se u skladu sa sljedećim ljestvicama:

Tabela 3. ICE kriterijumi klasifikacije za debljinu rožnjače

Srednji otok rožnjače[28]	ICE kategorija
0 do 5	I.
5 do 12	II.
12 do 18 75 minuta nakon tretiranja) (	II.
12 do 18 (≤75 minuta nakon tretiranja)	III.
18 do 26	III.
26 do 32 75 minuta nakon tretiranja) (	III.
26 do 32 (≤75 minuta nakon tretiranja)	IV.
32	IV.

Tabela 4. ICE kriterijumi klasifikacije za zamućenje

Srednja vrijednost maximalnog zamućenja	ICE kategorija
0.0-0.5	I.
0.6-1.5	II.
1.6-2.5	III.
2.6-4.0	IV.
Dato u Tabeli 1.	

Tabela 5. ICE kriterijumi klasifikacije za srednju retenciju fluoresceina

Srednji nalaz retencije fluoresceina 30 minuta nakon tretiranja	ICE kategorija
0.0-0.5	I.
0.6-1.5	II.
1.6-2.5	III.

[28] Nalaz otoka rožnjače je u redu ako je debljina izmjerena biomikroskopom

2.6-30	IV.
Dato u Tabeli 2.	

Klasifikacija nadražujućih efekata supstance koja se ispituje in vitro određuje se nalazom kategorije nadraživanja koja odgovara kombinaciji kategorija dobijenih za otok rožnjače, zamućenje rožnjače i retenciju fluoresceina prema shemi datoj u Tabeli 6.

Tabela 6. Opšte kategorije nadražujućih efekata in vitro

Klasifikacija	Kombinacija 3 mjerna efekta
Nagrizajuća/jako nadražujuća supstanca	3 × IV. 2 × IV., 1 × III. 2 × IV., 1 × II. (*) 2 × IV., 1 × I. (*) Zamućenje rožnjače > 3 nakon 30 min (na najmanje 2 oka) Zamućenje rožnjače = 4 u svakoj vremenskoj tački (na najmanje 2 oka) Jako slabljenje epitela (na najmanje 1 oku)
(*) Manje vjerovatne kombinacije.	

Ako supstanca nije identifikovana kao supstanca koja nagriza ili jako nadražuje oči, za klasifikaciju i označivanje treba ssprovesti dodatna ispitivanja. Za identifikaciju supstance s nagrizajućim i jako nadražujućim djelovanjem na oči ICE metoda ima sveukupnu tačnost od 83 % (120/144) do 87 % (134/154), stopu lažno pozitivnih rezultata od 6 % (7/122) do 8 % (9/116) i stopu lažno negativnih rezultata od 41 % (13/32) do 50 % (15/30) u odnosu na podatke dobijene in vivo metodom na očima zečeva klasifikovane prema sistemima klasifikacije EPA-a, EU-a ili GHS sistemu. Ako se iz baze podataka izbace supstance određenih hemijskih (tj. alkoholi i površinski aktivne supstance) i fizičkih (tj. čvrstoća) kategorija, tačnost ICE metode u sistemima klasifikacije EU-a, EPA-a i GHS sistemu nalazi se u rasponu od 91 % (75/82) do 92 % (69/75), stopa lažno pozitivnih rezultata od 5 % (4/73) do 6 % (4/70) i stopa lažno negativnih rezultata od 29 % (2/7) do 33 % (3/9).

Ako se ovim testom supstanca i ne klasifikuje kao nagrizajuća ili jako nadražujuća za oči, podaci dobijeni ICE metodom, zajedno s podacima iz in vivo ispitivanja na očima zečeva ili iz odgovarajuće validnog in vitro testa, mogu biti korisni za dalje ocjenjivanje koristi i ograničenja ICE metode za identifikaciju Supstancai koje nisu jako nadražujuće ili uopšte nisu nadražujuće.

4.3. Kriterijumi za prihvatanje studije

Test se smatra prihvatljivim ako se njime paralelne negativne kontrole ili kontrole nosačem/rastovorom i paralelne pozitivne kontrole klasifikuju unutar kategorija nenadražujućeg odnosno jako nadražujućeg/korozivnog djelovanja.

4.4. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži sljedeće podatke:

1. Supstance koje se ispituju i kontrolne supstance
   - hemijski naziv, kao što je strukturni naziv iz listaa Chemical Abstract Service (CAS) i ostali nazivi ako su poznati;
   - broj iz listaa CAS ako je poznat;
   - čistoća i sastav supstance ili smješe (maseni udio), do mjere u kojoj je podatak dostupan;
   - fizičko-hemijska svojstva relevantna za sprovođenje studije, npr. agregatno stanje, pH, stabilnost, hemijska kategorija, rastvorljivost u vodi; - obrada supstanci prije ispitivanja (npr. zagrijavanje, mljevenje); - stabilnost, ako je poznata.

2. Podaci koji se odnose na laboratorijau
   - naziv i adresa laboratorijae;
   - identifikacija dobavljača očiju (tj. pogona u kojem su prikupljene);
   - uslovi skladištenja i prevoza očiju (npr. dan i vrijeme prikupljanja očiju, vrijeme proteklo do početka ispitivanja);
   - posebne karakteristike životinja od kojih su oči prikupljene (npr. dob, pol, težina životinje);
3. Opravdanost ispitne metode i primijenjeni protokol
4. Integritet ispitne metode - postupak kojim se obezbjeđuje integritet (tj. tačnost i pouzdanost) metode tokom vremena (npr. periodično testiranje hemikalija za dokazivanje tehničke osposobljenosti, primjena istorijskih podataka o negativnim i pozitivnim kontrolnim supstancama).
5. Kriterijumi za prihvatanje testa
   - prihvatljiv raspon vrijednosti paralelnih kontrolnih etalona, prema ranijim podacima.
6. Uslovi ispitivanja
   - opis sistema koji se koristi;
   - biomikroskop koji se koristi (npr. model);
   - podaci o podešavanju instrumenata biomikroskopa koji se koristi;
   - podaci o pilećim očima koje se koriste, uključujući i izjave u pogledu njihovog kvaliteta;
   - pojedinosti o primijenjenom postupku;
   - koncentracija/koncentracije supstance koja se koristi;
   - opis eventualnih modifikacija postupka;
   - upućivanje na ranije podatke modela (npr. negativne i pozitivne kontrole, hemikalije za dokazivanje tehničke osposobljenosti, etaloni); - opis kriterijuma koji se primjenjuju za ocjenjivanje.
7. Rezultati
   - opis ostalih uočenih efekata;
   - ako je primjereno, fotografije oka;
8. Diskusija o rezultatima
9. Zaključak

HEMIKALIJE ZA DOKAZIVANJE TEHNIČKE OSPOSOBLJENOSTI ZA ICE METODU

DIO II

Prije rutinske primjene metode laboratorijae mogu dokazati tehničku osposobljenost tako da za 10 supstanci preporučenih u Tabeli 1. tačno identifikuju kategoriju korozivnog djelovanja na oči. Te su supstance tako izabrane da predstavljaju niz reakcija na lokalno nadraživanje/nagrizanje očiju koje se zasnivaju na rezultatima in vivo testa na očima zečeva (TG 405) (tj. Kategorije 1., 2.A, 2.B ili, nije klasifikovano ni označeno' prema sistemu GHS UN-a. Međutiim, uzimajući u obzir da je korisnost tih metoda validna (samo za identifikaciju supstanci s nagrizajućim/jako nadražujućim djelovanjem na oči), za dokazivanje tehničke osposobljenosti postoje dva rezultata testa u svrhe klasifikacije supstanci (nagrizajuća/jako nadražujuća ili nije nagrizajuća/nije jako nadražujuća). Drugi kriterijumi za izbor bili su da supstance budu komercijalno dostupne, da su dostupni visokokvalitetni in vivo referentni podaci i da postoje visokokvalitetni podaci iz dvije in vitro metode za koje su izrađene Smjernice za testiranje (Test Guidelines). Iz tog razloga nadražujuće supstance odabrane su s liste od 122 referentne supstance koje ICCVAM preporučuje za validaciju in vitro ispitnih metoda toksičnosti za oči. Referentni podaci dostupni su u dokumentima ICCVAM-a (Background Review Documents) za ispitne metode BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability – Zamućenje i propusnost goveđe rožnjače) i ICE.

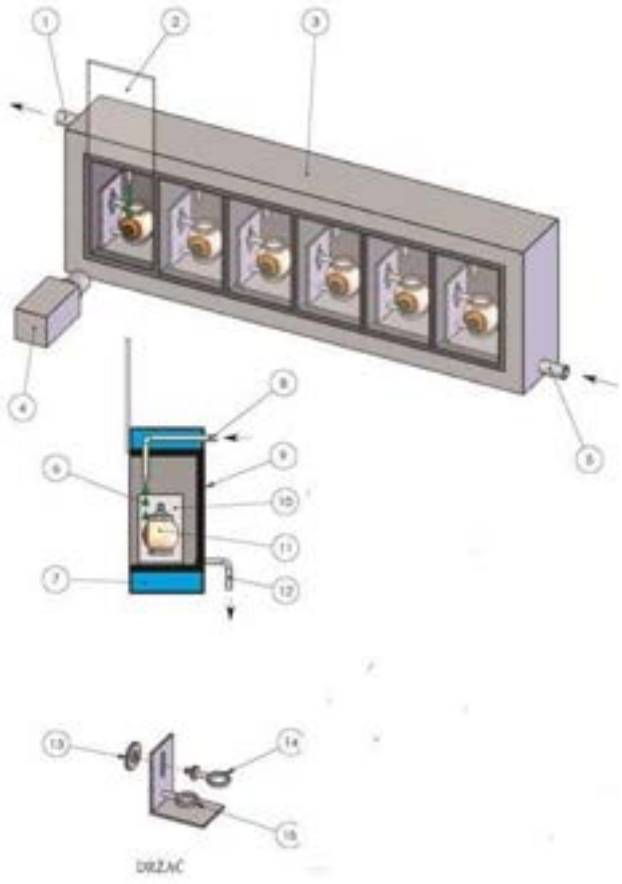
Tabela 1. Preporučene supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti za metodu ICE

Supstanca	CAS broj	Hemijska kategorija	Agregatno stanje	In vivo klasifikacija	In vitro klasifikacija
Benzalkonijum hlorid	8001-54-5	Amonijumovo jedinjenje	Tečnost	Kategorija 1	Nagrizajuća/Jako nadražujuća supstanca
Hlorheksidin	55-56-1	Amin, amidin	Čvrsto	Kategorija 1	Nagrizajuća/Jako nadražujuća supstanca
Dibenzoil-Lvinska kiselina	2743-38-6	Karboksilna kiselina, ester	Čvrsto	Kategorija 1	Nagrizajuća/Jako nadražujuća supstanca
Imidazol	288-32-4	Heterociklični	Čvrsto	Kategorija 1	Nagrizajuća/Jako nadražujuća supstanca
Trihlorsirćetna kiselina	76-03-9	Karboksilna kiselina, ester	Tečno	Kategorija 1	Nagrizajuća/Jako nadražujuća supstanca
2,6-dihlorbenzoil-hlorid	4659-45-4	Acil halid	Tečno	Kategorija	Nije nagrizajuća/nije jako nadražujuća supstanca
Etil-2metilacetoacetat	609-14-3	Keton, ester	Tečno	Kategorija	Nije nagrizajuća/nije jako nadražujuća supstanca

Amonijum nitrat	6484-52-2	Neorganska so	Čvrsto	Kategorija	Nije nagrizajuća/nije jako nadražujuća supstanca
Glicerol	56-81-5	Alcohol	Tečno	Nije označeno	Nije nagrizajuća/nije jako nadražujuća supstanca
n-Heksan	110-54-3	Ugljovodonik	Tečno	Nije označeno	Nije nagrizajuća/nije jako nadražujuća supstanca

SHEMATSKI PRIKAZ UREĐAJA ZA SUPERFUZIJU I STEZNIKA ZA OKO

DIO III



Slika uređaja za superfuziju i steznika za oko gdje 1-izlaz tople vode, 2-klizna vrata, 3-uređaj za superfuziju, 4-optički mjerni uređaj, 5-ulaz tople vode, 6-fozioloski rastvor, 7-topla voda, 8-ulaz fiziološkog rastvora, 9-dio, 10-držač oka, 11-pileće oko, 12-izlaz fiziološkog rastvora, 14podesiva gornja ručica, 15-nepomična donja ručica.

Dodatni opisi uređaja za superfuziju i steznika za oko dati su u Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The in vitro assessment of severe irritants. Fd. Cosmet.- Toxicol.- 19, 471480.

B.63. TEST IZBORA ZA REPRODUKTIVNU/RAZVOJNU TOKSIČNOST

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 421 (TG) (2016.). Smjernice OECD-a za ispitivanje hemikalija periodično se preispituju uzimajući u obzir naučni napred. Izvorna smjernica za test izbora 421 donesena je 1995. na osnovu protokola za preliminarni test izbora za reproduktivnu toksičnost o kojem se raspravljalo na dva sastanka stručnjaka u Londonu 1990. i Tokiju 1992.

Ova je ispitna metoda ažurirana relevantnim krajnjim efektima endokrinih distruptora, kao djelovanje na aktivnost visokog prioriteta koju je OECD pokrenuo 1998. kako bi revidirao postojeće smjernice za ispitivanje i razvio nove smjernice za izbor i ispitivanje potencijalnih endokrinih distruptora. Na primjer, Smjernica OECD-a za ispitivanje 407 (28-dnevno ispitivanje oralne toksičnosti na glodarima uz primjenu ponovljenih doza, poglavlje B.7. ovog Priloga) poboljšana je 2008. parametrima koji su primjereni za otkrivanje endokrine aktivnosti ispitivanih hemikalija. Ažuriranjem Smjernice za ispitivanje 421 nastojalo se uključiti određene relevantne krajnje efekte endokrinih distruptora u ispitne smjernice za izbor ako perioda izlaganja obuhvataju neka od osjetljivih perioda tokom razvoja (prenatalni period ili rana postnatalna period).

Odabrani dodatni relevantni krajnji efekti endokrinih distruptora, koji su i dio Smjernice za ispitivanje 443 (produžena studija reproduktivne toksičnosti na jednoj generaciji, poglavlje B.56. ovog Priloga), uključeni su u Smjernicu za ispitivanje 421 na osnovu studije izvodljivosti koja se bavi naučnim i tehničkim pitanjima povezanima s njihovim uključivanjem te mogućim prilagođavanjima plana ispitivanja koje su potrebne za njihovo uključivanje.

Ova je ispitna metoda osmišljena za dobijanje ograničenih informacija o efektima ispitivane hemikalije na reproduktivnost mužjaka i ženki kao što su funkcija gonada, ponašanje kod parenja, začeće, razvoj zametka i parturicija. Ona nije alternativa i ne zamjenjuje postojeće ispitne metode B.31., B.34., B.35. ili B.56.

POČETNA RAZMATRANJA

Ova se ispitna metoda za izbor može upotrebljavati za dobijanje početnih informacija o mogućim efektima na reprodukciju i/ili razvoj, u ranoj fazi procjene toksikoloških svojstava hemikalija ili za zabrinjavajuće hemikalije. Može se upotrebljavati i kao dio testova početnog izbora za postojeće hemikalije za koje je dostupno malo ili nimalo toksikoloških informacija, kao istraživanje o utvrđivanju raspona doze za opsežnije reproduktivne/razvojne studije ili ako se smatra relevantnom iz drugih razloga. Pri sprovođenju istraživanja treba slijediti opšta načela i

razmatranja navedena u OECD-ovoj Smjernici br. 19 o priznavanju, procjeni i korištenju kliničkih znakova kao humanih krajnjih tačaka za eksperimentalne životinje koje se upotrebljavaju u ocjenama sigurnosti.

Ovom se ispitnom metodom ne dobijaju potpune informacije o svim aspektima reprodukcije i razvoja. Tačnije, metoda pruža samo ograničena sredstva za otkrivanje postnatalnih manifestacija prenatalnog izlaganja ili efekata koji se mogu indukovati tokom postnatalnog izlaganja. Zbog (među ostalim) relativno malog broja životinja u grupama koje primaju dozu, selektivnosti krajnjih efekata i kratkog trajanja istraživanja ovom metodom neće se dobiti dokazi za konačne tvrdnje o nepostojanju efekata. Osim toga, ako ne postoje podaci iz drugih ispitivanja reproduktivne/razvojne toksičnosti, pozitivni rezultati korisni su za početnu procjenu opasnosti i doprinose odlukama u pogledu potrebe za dodatnim ispitivanjem i njegovog vremenskog okvira.

Rezultate dobijene parametrima povezanima s endokrinim sistemom treba posmatrati u kontekstu „OECD-ova konceptualnog okvira za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih hemikalija" . U tom Konceptualnom okviru poboljšana Smjernica OECD-a za ispitivanje 421 nalazi se na nivou 4. kao in vivo test i pruža podatke o štetnim efektima na relevantne endokrine krajnje tačke. Međutim, endokrini signal ne mora se sam po sebi smatrati dovoljnim dokazom da je ispitivana hemikalija endokrini disruptor.

U ovoj ispitnoj metodi pretpostavlja se oralna primjena ispitivane hemikalije. Ako se upotrebljavaju drugi načini izlaganja, mogu biti potrebna prilagođavanja.

Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smješi radi dobijanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smješe.

NAČELO ISPITIVANJA

Ispitivana hemikalija primjenjuje se u gradiranim dozama na nekoliko grupa mužjaka i ženki. Na mužjake treba primjenjivati dozu najmanje četiri nedelje te do dana i uključujući dan prije planiranog usmrćivanja (to uključuje najmanje dvije nedelje prije parenja, tokom perioda parenja i približno dvije nedelje poslije parenja). S obzirom na ograničeni period doziranja prije parenja u mužjaka, plodnost možda neće biti naročito osjetljiv pokazatelj testikularne toksičnosti. Stoga je od ključne važnosti detaljan histološki pregled testisa. Kombinacija perioda doziranja prije parenja od dvije nedelje i naknadno posmatranje parenja/plodnosti s ukupnim periodima doziranja od najmanje četiri nedelje, nakon čega slijedi detaljna histopatologija muških gonada smatraju se dovoljnima da bi se omogućilo otkrivanje većine efekata na plodnost mužjaka i spermatogenezu.

Ženkama dozu treba davati tokom cijelog istraživanja. To uključuje dvije nedelje prije parenja (pri čemu je cilj obuhvatiti najmanje dva cijela ciklusa estrusa), promjenjivo vrijeme do začeća, trajanje graviditeta i najmanje 13 dana nakon okota, do dana i uključujući dan prije planiranog usmrćivanja.

Trajanje istraživanja, nakon aklimatizacije i procjene ciklusa estrusa prije doziranja, zavisi o ponašanju ženki i iznosi približno 63 dana [najmanje 14 dana prije parenja, (do) 14 dana parenja, 22 dana gestacije, 13 dana laktacije].

Tokom perioda primjene životinje se svakodnevno pažljivo posmatraju radi uočavanja znakova toksičnosti. Životinje koje uginu ili su usmrćene tokom perioda ispitivanja podvrgavaju se obdukciji, a na kraju ispitivanja preživjele se životinje usmrćuju i podvrgavaju obdukciji.

OPIS METODE

Izbor životinjske vrste

Ova ispitna metoda osmišljena je za upotrebu na glodarima. Ako se parametri navedeni u ovoj ispitnoj metodi istražuju na drugoj vrsti glodara, treba pružiti detaljno obrazloženje. U međunarodnom validacionom programu za određivanje endokrinih distruptora u Smjernici OECD-a za ispitivanje 407 (koja odgovara poglavlju B.7. ovog Priloga) primjenjivali su se samo štakori. Sojeve slabe plodnosti ili poznate po velikoj učestalosti razvojnih defekata ne bi trebalo koristiti. Treba koristiti zdrave životinje koje se prethodno nisu parile i nisu učestvovale u eksperimentima. Ispitne životinje treba opisati u pogledu vrste, soja, pola, mase i dobi. Na početku istraživanja razlike u tjelesnoj masi korištenih životinja trebale bi biti minimalne i ne bi trebale prelaziti 20 % srednje vrijednosti tjelesne mase svakog pola. Kad se istraživanje sprovodi kao preliminarno istraživanje u odnosu na dugotrajno istraživanje ili istraživanje cijele generacije, prednost se daje primjeni životinja istog soja i porijekla u oba istraživanja.

Smještaj i hranjenje

Svi postupci trebaju biti usklađeni s lokalnim standardima brige o životinjama u laboratoriji. Temperatura u prostoriji u kojoj se drže eksperimentalne životinje treba biti 22 °C (±3 o). Iako bi relativna vlaga trebala biti najmanje 30 %, a poželjno je da ne prelazi 70 %, osim tokom čišćenja prostorije, cilj bi trebao biti 50–60 %. Rasvjeta treba biti vještačka uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Za hranjenje se može upotrebljavati konvencionalna laboratorijska hrana uz neograničenu količinu vode za piće. Na izbor prehrane može uticati potreba da se osigura odgovarajuća mješavina ispitivane hemikalije kad se ona daje na taj način.

Životinje trebaju biti smještene u malim grupama istoga pola; ako je to naučno opravdano, životinje se mogu držati u posebnim prostorijama. U slučaju grupnog smještaja, u jednom kavezu ne smije biti smješteno više od pet životinja. Postupci parenja trebali bi se odvijati u kavezima koji odgovaraju toj svrsi. Gravidne ženke treba smjestiti u posebne kaveze i treba im osigurati materijale za izradu gnijezda. Ženke se tokom laktacije smještaju pojedinačno s njihovom mladunčadi.

Treba redovno analizirati ima li u hrani kontaminanata. Uzorak hrane treba sačuvati do kraja izrade izvještaja.

Priprema životinja

Zdrave, mlade odrasle životinje nasumce se raspoređuju u kontrolne grupe i grupe za tretiranje. Kaveze bi trebalo rasporediti tako da se efekti do kojih bi moglo doći zbog položaja kaveza svedu na minimum. Životinje se označavaju na jedinstven način i drže u kavezima najmanje pet dana prije početka istraživanja kako bi se prilagodile laboratorijskim uslovima.

Priprema doza

Preporučuje se da se ispitivana hemikalija daje oralno osim ako se neki drugi načini primjene smatraju prikladnijima. Ako se odabere oralna primjena, ispitivana hemikalija obično se

primjenjuje oralnom intubacijom; međutim, u određenim slučajevima, ispitivane hemikalije mogu se primijeniti i s hranom ili vodom za piće.

Prema potrebi, ispitivana se hemikalija rastvara ili suspenuje u odgovarajućem nosaču. Preporučuje se da se, kad je god moguće, u obzir najprije uzme vodeni rastvor/suspenzija pa zatim rastvor/emulzija u ulju (npr. kukuruzno ulje) te zatim mogući rastvor u drugim nosačima. Za nosače koji nisu voda moraju biti poznata toksična svojstva nosača. Treba utvrditi stabilnost i homogenost ispitivane hemikalije u nosaču.

POSTUPAK

Broj i pol životinja

Preporučuje se da se u svakoj grupi započne s najmanje deset mužjaka i 12–13 ženki. Ženke će se prije izlaganja procijeniti u pogledu ciklusa estrusa i životinje koje ne pokažu uobičajeni ciklus od četiri do pet dana neće se uključiti u istraživanje; stoga se preporučuje više ženki kako bi se dobilo deset ženki po grupi. Osim u slučaju znatnih toksičnih efekata, očekuje se da će se tako dobiti najmanje osam gravidnih ženki po grupi, a to je obično najmanji prihvatljivi broj gravidnih ženki po grupi. Cilj je dobiti dovoljno gravidnih životinja i potomaka kako bi se osigurala valjana procjena potencijala ispitivane hemikalije da utiče na plodnost, gravidnost, ponašanje ženki (majki) i potomaka koji sišu te rast i razvoj potomstva F1 od začeća do 13. dana nakon okota.

Doziranje

Generalno, treba upotrijebiti najmanje tri ispitne grupe i jednu kontrolnu grupu. Visine doze mogu se bazirati na informacijama iz ispitivanja akutne toksičnosti ili na rezultatima istraživanja s ponovljenim dozama. Osim tretiranja ispitivanom hemikalijom, sa životinjama u kontrolnoj grupi treba postupati na isti način kao sa životinjama iz ispitne grupe. Ako se pri primjeni ispitivane hemikalije koristi nosač, volumen nosača koji primi kontrolna grupa treba biti jednak najvećem upotrijebljenom volumenu.

Visine doza treba odabrati uzimajući u obzir sve postojeće podatke o toksičnosti i (toksiko) kinetici koji su dostupni. Treba uzeti u obzir i da je moguća razlika u osjetljivosti između gravidnih ženki i ženki koje nisu gravidne. Najvišu dozu treba odabrati s ciljem indukovanja toksičnih efekata, ali ne i smrti ili velike patnje životinja. Nakon toga treba odabrati slijed postupnog smanjivanja visine doze kako bi se dokazali svi odgovori povezani s doziranjem te da se kod najniže doze ne uočavaju štetni efekti (NOAEL). Za određivanje sve nižih doza često su najpogodniji dvostruki do četvorostruki intervali, i često je bolje dodati četvrtu ispitnu grupu nego da između doziranja budu jako veliki intervali (npr. iznad faktora 10).

Ako se uoče znaci opšte toksičnosti (npr. smanjena tjelesna masa, efekti na jetri, srcu, plućima ili bubrezima itd.) ili druge promjene koje ne moraju biti toksični odgovori (npr. smanjeno uzimanje hrane, povećanje jetre), uočene efekte na endokrinim krajnjim tačkama treba tumačiti s oprezom.

Granični test

Ako istraživanje ssprovedeno oralnom primjenom jedne doze od najmanje 1 000 mg/kg tjelesne mase na dan, ili kod davanja doze s hranom ili vodom za piće, primjenom doze koja se u ekvivalentnom postotku daje s hranom ili vodom za piće, u skladu s pokolonama opisanima u

ovom istraživanju, ne proizvede uočljive toksične efekte i ako na osnovu podataka iz strukturno srodnih supstanci ne treba očekivati toksičnost, može se smatrati da ssprovođenje potpune studije s nekoliko visina doza nije neophodno. Granični test je relevantan samo ako izloženost ljudi ne ukazuje na potrebu za primjenom veće oralne doze. Za druge vrste primjene doza, kao što su inhalacija ili dermalna primjena, maksimalna koncentracija koja se može postići često je određena fizičko-hemijskim svojstvima ispitivanih hemikalija.

Primjena doza

Životinjama se svakodnevno daje ispitivana hemikalija sedam dana nedeljno. U slučaju primjene oralnom intubacijom ispitivanu hemikaliju treba životinjama dati u jednoj dozi pomoću zeludačne sonde ili prikladne intubacione kanile. Maksimalni volumen tečnosti koji se može jednokratno dati zavisi od veličine ispitne životinje. Taj volumen ne smije biti veći od 1 ml/100 g tjelesne mase, osim kad se radi o vodenim rastvorima koje dopuštaju primjenu volumena od 2 ml/100 g tjelesne mase. Osim u slučaju nadražujućih ili nagrizajućih ispitivanih hemikalija kod kojih se štetni efekti obično javljaju pri višim koncentracijama, varijabilnost ispitnog volumena treba prilagođavanjem koncentracije svesti na najmanju moguću mjeru kako bi se zagarantovao stalni volumen pri svim visinama doza.

Kod ispitivane hemikalije koja se primjenjuju s hranom ili vodom za piće važno je osigurati da količine ispitivane hemikalije ne utiču na uravnoteženi unos hrane ili vode. Kad se ispitivana hemikalija daje s hranom, može se koristiti ili stalna koncentracija u odnosu na količinu hrane (ppm) ili stalna visina doze u odnosu na tjelesnu masu životinje; treba navesti iskorištenu opciju. Za ispitivanu hemikaliju koja se primjenjuje oralnom intubacijom, dozu treba davati u podjednako vrijeme ili vremena svakog dana i prilagoditi je najmanje jednom nedeljno kako bi se održala stalna visina doze s obzirom na tjelesnu masu životinje.

Plan eksperimenta

Doziranje životinja oba pola trebalo bi započeti najmanje dvije nedelje prije parenja, nakon aklimatizacije od najmanje pet dana te nakon što se ženke proberu u pogledu normalnog ciklusa estrusa (u razdoblju od dvij enedelje prije tretiranja). Istraživanje treba planirati tako da procjena ciklusa estrusa počne ubrzo nakon što životinje postignu punu polnu zrelost. To se može malo razlikovati za različite sojeve pacova u različitim laboratorijima, npr. deset nedelja kod pacova soja Sprague Dawley i 12 nedelja kod soja Wistar. Ženke (majke) s potomstvom trebalo bi usmrtiti 13. dana nakon okota ili ubrzo nakon toga. Dan okota (tj. kad se dovrši parturicija) definiše se kao nulti dan nakon okota. Ženke koje ne pokazuju znake kopulacije usmrćuju se 24–26 dana nakon posljednjeg dana perioda parenja. Doziranje se nastavlja kod oba pola tokom perioda parenja. Mužjake bi i dalje trebalo dozirati nakon perioda parenja barem dok ne istekne ukupno period doziranja od 28 dana. Zatim se usmrćuju ili se zadržavaju i nastavljaju dozirati radi mogućeg ssprovođenja drugog parenja ako se to smatra primjerenim.

Svakodnevno doziranje roditeljskih ženki trebalo bi se nastaviti tokom cijele gravidnosti i najmanje do 13. dana nakon okota, uključujući i taj dan, ili dan prije usmrćivanja. Kod istraživanja u kojima se ispitivana hemikalija primjenjuje inhalacijom i/ili dermalnim putem doziranje bi se trebalo nastaviti barem do 19. dana gestacije, uključujući i taj dan, i s doziranjem bi se trebalo ponovno početi što prije, a najkasnije na 4. postnatalni dan (PND).

Dijagram plana eksperimenta prikazan je u Dodatku 2.

Postupak parenja

U ovom bi se istraživanju obično trebalo upotrebljavati parenje 1:1 (jedan mužjak na jednu ženku). Izuzeci se mogu javiti ako dođe do smrti mužjaka. Ženku bi trebalo smjestiti s istim mužjakom dok se ne uoče znaci kopulacije ili dok ne isteknu dvije nedelje. Svako jutro ženke treba pregledati s obzirom na prisutnost sperme ili vaginalnog čepa. Nultim danom graviditeta smatra se dan kad je potvrđeno parenje (pronađen je vaginalni čep ili sperma). Ako je parenje neuspješno, može se razmotriti mogućnost ponovnog parenja ženki s dokazanim mužjacima iste grupe.

Veličina legla

Četiri dana nakon okota veličina svakog legla može se prilagoditi nasumičnim selekcionim uklanjanjem suvišnih mladunaca tako da se po jednom leglu po mogućnosti ostavi četiri ili pet mladunaca svakog pola u zavisnosti o uobičajenoj veličini legla soja pacova koji se upotrebljavaju. Uzorke krvi treba prikupiti od dva dodatna mladunca, objediniti ih i upotrijebiti za određivanje nivoa seruma T4. Nije prihvatljivo selektivno uklanjanje mladunaca, npr. prema tjelesnoj masi ili anogenitalnom razmaku. Kad je god broj muških ili ženskih mladunaca takav da nije moguće imati četiri ili pet mladunaca svakog pola po leglu, prihvatljivo je djelimično prilagođavanje (npr. šest mužjaka i četiri ženke). Mladunci se ne uklanjaju ako bi se veličina legla time smanjila ispod cilja izdvajanja mladunaca (osam ili deset mladunaca po leglu). Ako je dostupan samo jedan mladunac povrh cilja izdvajanja mladunaca, uklanja se samo jedan mladunac i od njega se uzima krv za moguću procjenu seruma T4.

Ako se veličina legla ne prilagođava, 4. dana nakon okota usmrćuju se dva mladunca po leglu i uzimaju se uzorci krvi radi mjerenja koncentracija seruma hormona štitne žlijezde. Ako je moguće, ta dva mladunca po leglu trebale bi biti ženke kako bi se mužjaci sačuvali za procjenu zadržavanja bradavica osim ako uklanjanjem tih mladunaca više ne bi ostalo ženki za procjenu pri završetku ispitivanja. Mladunci se neće uklanjati ako bi se time veličina legla smanjila na manje od osam ili deset mladunaca po leglu (u zavisnosti od uobičajene veličine legla kod soja pacova koji se upotrebljava). Ako je dostupan samo jedan mladunac povrh uobičajene veličine legla, uklanja se samo jedan mladunac i od njega se uzima krv za moguću procjenu seruma T4.

Zapažanja uživo

Klinička zapažanja

Tokom cijelog perioda ispitivanja treba sprovoditi opšta klinička zapažanja barem jednom dnevno te češće ako se uoče znaci toksičnosti. Poželjno ih je sprovoditi u isto vrijeme ili vremena svakog dana vodeći računa o razdoblju najvećeg intenziteta očekivanih efekata nakon doziranja. Treba zabilježiti značajne promjene ponašanja, znake otežane ili produžene parturicije i sve znake toksičnosti, uključujući smrtnost. Te bi bilješke trebale uključivati vrijeme početka, stepen i trajanje znakova toksičnosti.

Tjelesna masa i unos hrane/vode

Mužjake i ženke treba vagati prvog dana primjene doze, a zatim najmanje jednom nedeljno i zadnji dan. Tokom graviditeta ženke bi trebalo vagati 0., 7., 14. i 20. dana te u roku od 24 sata od parturicije (0. ili 1. dan nakon okota) te barem 4. i 13. dana nakon okota. Ta zapažanja treba unijeti u izvještaj za svaku odraslu životinju posebno.

Tokom perioda prije parenja, graviditeta i laktacije unos hrane trebalo bi mjeriti najmanje jednom nedeljno. Mjerenje unosa hrane tokom parenja nije obavezno. Trebalo bi mjeriti i unos vode tokom tih perioda ako se ispitivana hemikalija primjenjuje s vodom za piće.

Ciklusi estrusa

Cikluse estrusa trebalo bi pratiti prije početka tretiranja kako bi se za studiju izabrale ženke s uobičajenim ciklusom. Svakodnevno bi se trebali pratiti i vaginalni brisevi od početka perioda tretiranja do pojave znakova parenja. Ako postoji zabrinutost u pogledu efekata akutnog stresa koji bi mogli izmijeniti cikluse estrusa kad se počnu primjenjivati doze, laboratorija može izlagati ispitne životinje dvije nedelje, zatim svaki dan prikupiti vaginalne briseve kako bi pratili ciklus estrusa najmanje dvije nedelje tokom perioda prije parenja, uz stalno praćenje tokom perioda parenja do pojave znakova parenja. Ako se uzimaju vaginalne/cervikalne ćelije, treba paziti da se ne poremeti mukoza jer to može indukovati lažnu trudnoću.

Parametri potomaka

Vrijeme gestacije treba zabilježiti i računati od nultog dana graviditeta. Svako leglo nakon okota treba što prije pregledati kako bi se utvrdio broj i pol mladunaca, mrtvorođenih, živorođenih, patuljastih životinja (mladunci koji su znatno manji od odgovarajućih kontrolnih mladunaca) i prisutnost velikih abnormalnosti.

Žive mladunce trebalo bi prebrojati i odrediti njihov pol te bi legla trebalo izvagati u roku od 24 sata od parturicije (0. ili 1. dan nakon okota) te barem 4. i 13. dana nakon okota. Trebalo bi zabilježiti i svako abnormalno ponašanje potomaka.

Treba izmjeriti anogenitalni razmak u svakog mladunca na isti postnatalni dan, od nultog do 4. postnatalnog dana. Tjelesnu masu mladunaca treba utvrditi na dan mjerenja anogenitalnog razmaka, a njega treba normalizirati u odnosu na veličinu mladunca (najbolje kubni korijen tjelesne mase. Broj bradavica/areola u mužjaka mladunaca trebalo bi utvrditi 12. ili 13. postnatalnog dana, kako se preporučuje u Smjernici OECD-a 151.

Klinička biohemija

Uzorci krvi uzimaju se s utvrđenog mjesta na osnovu sljedećeg rasporeda:

- od najmanje dva mladunca po leglu 4. dana nakon okota ako broj mladunaca to omogućuje,
- od svih ženki (majki) i najmanje dva mladunaca po leglu pri završetku ispitivanja 13. dana, i
- od svih odraslih mužjaka pri završetku ispitivanja.

Svi uzorci krvi čuvaju se u odgovarajućim uslovima. Uzorci krvi mladunaca i odraslih mužjaka uzeti 13. dana procjenjuju se u pogledu nivoa seruma hormona štitne žlijezde (T4). Dalja procjena hormona T4 u uzorcima krvi ženki (majki) i mladunaca uzetih 4. dana obavlja se po potrebi. Moguće je i mjerenje drugih hormona ako je to relevantno. Krv mladunaca može se izvaditi po leglu radi analiza hormona štitne žlijezde. Hormone štitne žlijezde (T4 i TSH) po mogućnosti bi trebalo mjeriti kao „ukupni broj”.

Sljedeći faktori mogu uticati na varijabilnost i apsolutne koncentracije za određivanje hormona:

- vrijeme usmrćivanja zbog dnevne varijacije koncentracije hormona,

— metoda usmrćivanja radi izbjegavanja pretjeranog stresa za životinje koji može uticati na koncentraciju hormona,
— pribori za određivanje hormona koji se mogu razlikovati po njihovim standardnim krivama.

Uzorke plazme koji su posebno namijenjeni određivanju hormona treba uzeti u uporedivo doba dana. Brojčane vrijednosti dobijene analizom koncentracija hormona razlikuju se u zavisnosti od različitogm, komercijalno dostupnom priboru**.**

Patologija

Makroskopska nekropsija

U trenutku usmrćivanja ili u slučaju smrti tokom istraživanja, odrasle životinje treba makroskopski pregledati radi otkrivanja bilo kakvih abnormalnosti ili patoloških promjena. Posebnu pažnju treba obratiti na organe reproduktivnog sistema. Broj mjesta za implantaciju treba zabilježiti. Vaginalne briseve treba pregledati ujutro na dan nekropsije kako bi se utvrdila faza ciklusa estrusa i omogućila korelacija s histopatologijom jajnika.

Testise i sjemene kanaliće (epididimis) te prostatu i sjemene mjehuriće s koagulacionim žlijezdama, kao cjelinu, svih odraslih mužjaka treba po potrebi obrezivanjem osloboditi od svih prianjajućih tkiva te ih treba izvagati u mokrom stanju što prije nakon seciranja kako bi se spriječilo njihovo sušenje. Osim toga, mase neobaveznih organa mogle bi uključivati kompleks anusnog podizača i bulbokavernoznog mišića, Cowperove žlijezde i glans penisa kod mužjaka te jajnike u paru (mokra masa) i maternicu (uključujući cerviks) kod ženki; ako se uključuju, te bi mase trebalo prikupiti što prije nakon seciranja.

Mrtve mladunce i mladunce koji se usmrte 13. dana nakon okota, ili ubrzo nakon toga, trebalo bi pažljivo pregledati kako bi se utvrdile barem spoljašnje velike abnormalnosti. Posebnu pažnju treba posvetiti spoljašnjim reproduktivnim genitalijama koje se pregledava kako bi se utvrdili mogući znaci promijenjenog razvoja. Na 13. bi se dan trebala sačuvati štitna žlijezda jednog muškog i jednog ženskog mladunca po leglu.

Treba sačuvati jajnike, testise, sekundarne polne organe (maternica i cerviks, sjemeni kanalići, prostata, sjemeni mjehurići zajedno s koagulirajućim žlijezdama), štitnu žlijezdu i sve organe koji pokazuju makroskopske lezije svih odraslih životinja. Za rutinski pregled testisa i sjemenih kanalića ne preporučuje se fiksiranje u formalinu. Za ta je tkiva prihvatljiva metoda upotreba Bouinova fiksativa ili izmijenjenog Davidsonova fiksativa. Vezivna ovojnica može se nježno i plitko punktirati na oba pola organa iglom koja omogućuje brzu penetraciju fiksativa**.**

Histopatologija

Treba obaviti detaljan histološki pregled jajnika, testisa i sjemenih kanalića (uz poseban naglasak na faze spermatogeneze i histopatologiju strukture intersticijskih ćelija testisa) životinja iz grupe koja je primala najveću dozu i iz kontrolne grupe. Po potrebi se mogu pregledati i ostali sačuvani organi, uključujući štitnu žlijezdu mladunaca i odraslih životinja. Masa štitne žlijezde može se odrediti nakon fiksacije. Obrezivanje također treba obaviti vrlo pažljivo te samo nakon fiksacije kako bi se izbjeglo oštećenje tkiva. Oštećena tkiva mogu kompromitovati histopatološku analizu. Ispitivanja treba proširiti na životinje iz drugih grupa doziranja ako su u grupi s najvećom dozom uočene promjene. Smjernice o histopatologiji pružaju dodatne detaljne informacije o sekciji, fiksaciji, seciranju i histopatologiji endokrinih tkiva.

PODACI I IZVJEŠTAVANJE

Podaci

Treba navesti podatke za svaku pojedinačnu životinju. Osim toga, sve podatke treba sažeti u obliku tabele, tako da se za svaku ispitnu grupu navede broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje su uginule tokom ispitivanja ili su usmrćene iz humanih razloga, vrijeme smrti ili humanog usmrćenja, broj plodnih životinja, broj gravidnih ženki, broj životinja koje pokazuju znake toksičnosti, opis uočenih znakova toksičnosti, uključujući vrijeme prve pojave, trajanje i ozbiljnost toksičnih efekata, vrste histopatoloških promjena i sve relevantne podatke o leglu. Format sažetog izvještaja u obliku tabele koji se pokazao vrlo korisnim za procjenu reproduktivnog/razvojnog efekta naveden je u Dodatku 3.

Zbog ograničenih dimenzija istraživanja, statističke analize kojima se nastoji ispitati važnost rezultata imaju ograničenu vrijednost za mnoge krajnje tačke, naročito za reproduktivne krajnje tačke. Ako se upotrebljavaju statističke analize, odabrana metoda trebala bi biti primjerena za distribuciju varijable koja se ispituje i treba je odabrati prije početka istraživanja. Statistička analiza anogenitalnog razmaka i zadržavanja bradavica trebala bi se bazirati na podacima za pojedinačne mladunce, uzimajući u obzir efekte na leglo. Ako je primjereno, jedinicu analize čini leglo. Statistička analiza tjelesne mase mladunaca trebala bi se bazirati na podacima za pojedinačne mladunce, uzimajući u obzir veličinu legla. Zbog toga što su grupe male, kao pomoć u tumačenju istraživanja mogu biti korisni podaci iz prošlih kontrola (npr. za veličinu legla) ako su dostupni.

Ocjena rezultata

Nalaze ovog istraživanja toksičnosti treba ocijeniti s obzirom na uočene efekte, nekropsiju i mikroskopske nalaze. Evaluacija treba obuhvatiti odnos između doze ispitivane hemikalije i prisutnosti ili izostanka, učestalosti i ozbiljnosti abnormalnosti, uključujući makrolezije, identifikovane ciljne organe, neplodnost, kliničke abnormalnosti, promjene sposobnosti reprodukcije i legla, promjene tjelesne mase, efekte na smrtnost i sve ostale toksične efekte.

Zbog kratkog perioda tretiranja mužjaka, pri procjeni efekata na reprodukciju mužjaka uz podatke o plodnosti trebalo bi razmotriti histopatologiju testisa i sjemenih kanalića. Kao pomoć u tumačenju istraživanja može biti korisna i upotreba podataka o prošlim kontrolama u vezi s reprodukcijom/razvojem (npr. za veličinu legla, anogenitalni razmak, zadržavanje bradavica, nivoa seruma T4) ako su dostupni.

Radi kontrole kvaliteta predlaže se da se prikupljaju podaci o prošlim kontrolama te da se izračunaju koeficijenti varijacije za brojčane podatke, posebno za parametre povezane s otkrivanjem endokrinih distruptora. Ti se podaci mogu upotrijebiti za upoređivanje kad se ocjenjuju konkretna istraživanja.

Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju trebalo bi da sadrži sljedeće informacije:

Ispitivana hemikalija:

- izvor, broj serije, rok upotrebe, ako su dostupni,
- stabilnost ispitivane hemikalije, ako je poznata.

Supstanca s jednim sastojkom:

— fizički izgled, rastvorljivost u vodi i druga relevantna fizičko-hemijska svojstva,
— hemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.

Supstanca s više sastojaka, UVCB supstance i smješe:

— opis (koliko je to moguće) hemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizičko-hemijskih svojstava sastojaka.

Nosač (po potrebi):

— obrazloženje izbora nosača ako nije riječ o vodi.

Ispitne životinje:

— korištena vrsta/soj,
— broj, dob i pol životinja,
— porijeklo, uslovi smještaja, prehrana itd.,
— pojedinačna tjelesna masa životinja na početku ispitivanja,
— obrazloženje izbora vrste ako se ne radi o glodarima.

Ispitni uslovi:

— obrazloženje izbora visine doze,
— pojedinosti o formulaciji ispitivane hemikalije/pripremanju hrane, postignuta koncentracija, stabilnost i homogenost smješa,
— pojedinosti o primjeni ispitivane hemikalije,
— preračunavanje koncentracije ispitivane hemikalije u hrani/vodi za piće (ppm) u stvarnu dozu (mg/kg tjelesne težine/dan), prema potrebi,
— pojedinosti o kvaliteti hrane i vode,
— detaljan opis postupka nasumičnog izbora mladunaca za izdvajanje ako se ono obavlja.

Rezultati:

— tjelesna masa/promjene tjelesne mase,
— unos hrane i unos vode, ako su dostupni,
— podaci o toksičnom odgovoru po polu i dozi, uključujući plodnost, gestaciju i sve druge znake toksičnosti,
— dužina gestacije,
— toksični ili drugi efekti na reprodukciju, potomstvo, rast nakon rođenja itd.,
— vrsta, stepen i trajanje uočenih kliničkih promjena (reverzibilne ili ireverzibilne),
— broj odraslih ženki s normalnim ili abnormalnim ciklusom estrusa i trajanje ciklusa,
— broj živorođenih i gubitaka nakon implantacija,
— podaci o tjelesnoj masi mladunaca,
— anogenitalni razmak svih mladunaca (i tjelesna masa na dan mjerenja anogenitalnog razmaka),
— zadržavanje bradavica kod mužjaka mladunaca,
— nivoa hormona štitne žlijezde, u mladunaca starih 13 dana i odraslih mužjaka (i u ženki (majki) i mladunaca starih 4 dana ako se mjeri),

— broj mladunaca s jako izraženim abnormalnostima, ukupna procjena spoljašnjih genitalija, broj patuljastih životinja,
— vrijeme smrti tokom istraživanja ili je li životinja preživjela do kraja,
— broj implantacija, veličina i masa legla u trenutku evidentiranja,
— tjelesna masa u trenutku usmrćenja i podaci o masi organa za roditeljske životinje,
— nalazi nekropsije,
— iscrpan opis histopatoloških nalaza,
— podaci o apsorpciji (ako su dostupni),
— statistička obrada rezultata, prema potrebi.

Rasprava o rezultatima.

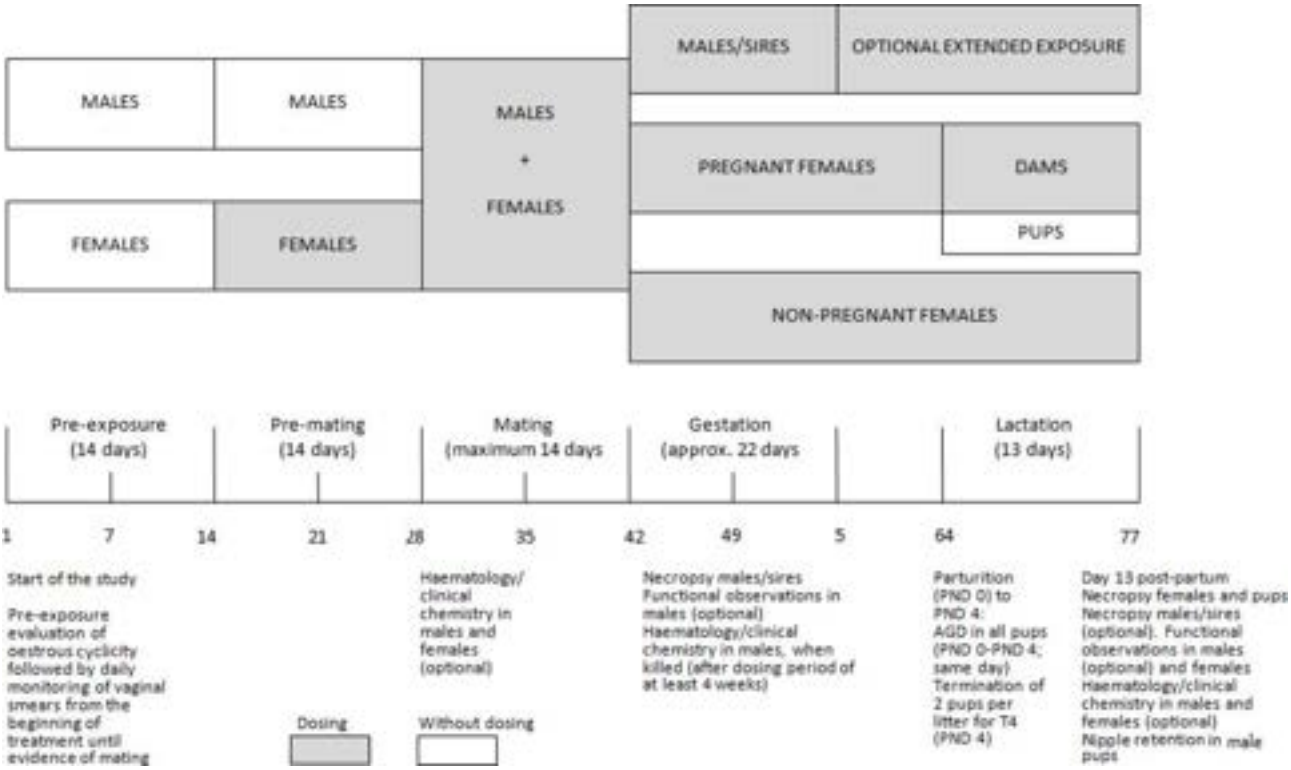
Zaključci.

Tumačenje rezultata

Istraživanjem će se pružiti procjene reproduktivne/razvojne toksičnosti povezane s primjenom ponovljenih doza. Ono bi moglo dati naznaku u vezi s tim treba li ssprovesti dalja ispitivanjima te daje smjernice za osmišljavanje naknadnih istraživanja. Za pomoć pri tumačenju rezultata u pogledu reprodukcije i razvoja treba pogledati Smjernicu OECD-a 43. U Smjernici OECD-a br. 106 o histološkoj procjeni endokrinih i reproduktivnih ispitivanja na glodarima navedene su informacije o pripremi i procjeni (endokrinih) organa i vaginalnih briseva koje mogu biti korisne za ovu smjernicu za ispitivanje.

Dodatak 2.

DIJAGRAM PLANA EKSPERIMENTA IZ KOJEG SE VIDI MAKSIMALNO TRAJANJE STUDIJE, NA OSNOVU CIJELOG 14-DNEVNOG PERIODA PARENJA



Dodatak 3.

SAŽETO IZVJEŠTAJ U OBLIKU TABELE O EFEKTIMA NA REPRODUKCIJU/RAZVOJ

ZAPAŽANJA	**VRIJEDNOSTI**				
Doziranje (jedinice)	**0 (kontrola)**	**…**	**…**	**…**	**…**
Formirani parovi (N)					
Ciklus estrusa (barem srednja vrijednost dužine i učestalost nepravilnih ciklusa)					
Ženke koje pokazuju znake kopulacije (N)					
Ženke koje su postale gravidne (N)					
Dani začeća 1–5 (N)					
Dani začeća 6–… (N)					
Graviditet ≤ 21 dan (N)					
Graviditet = 22 dana (N)					
Graviditet ≥ 23 dana (N)					
Ženke (majke) sa živim mladuncima (N)					
Ženke (majke) sa živim mladuncima 4. dana nakon okota (N)					
Implantati po ženki (majci) (srednja vrijednost)					
Živi mladunci po ženki (majci) pri okotu (srednja vrijednost)					
Živi mladunci po ženki (majci) 4. dana (srednja vrijednost)					
Odnos polova (m/ž) pri okotu (srednja vrijednost)					
Odnos polova (m/ž) 4. dana (srednja vrijednost)					

Masa legla pri okotu (srednja vrijednost)					
Masa legla 4. dana (srednja vrijednost)					
Masa mladunaca pri okotu (srednja vrijednost)					
Masa mladunaca u trenutku mjerenja anogenitalnog razmaka (srednja vrijednost za mužjake i srednja vrijednost za ženke)					
Anogenitalni razmak na isti postnatalni dan, dan okota – 4. dan (srednja vrijednost za mužjake i ženke, naznaka postnatalnog dana)					
Masa mladunaca 4. dana (srednja vrijednost)					
Zadržavanje bradavica kod mužjaka mladunaca 13. dana (srednja vrijednost)					
Masa mladunaca 13. dana (srednja vrijednost)					
ABNORMALNI MLADUNCI					
Ženke (majke) s 0					
Ženke (majke) s 1					
Ženke (majke) s ≥ 2					
GUBITAK POTOMAKA					
Prenatalno/nakon implantacije (implantacije umanjene za broj živorođenih)					
Ženke s 0					
Ženke s 1					
Ženke s 2					
Ženke s ≥ 3					

Postnatalno (broj živorođenih umanjen za broj živih mladunaca 13. dana nakon okota)					
Ženke s 0					
Ženke s 1					
Ženke s 2					
Ženke s ≥ 3					

B.64. KOMBINUJENO ISTRAŽIVANJE TOKSIČNOSTI S PONOVLJENIM DOZAMA S TESTOM IZBORA ZA REPRODUKTIVNU/RAZVOJNU TOKSIČNOST

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 422 (TG) (2016.). Smjernice OECD-a za ispitivanje hemikalija periodično se preispituju uzimajući u obzir naučni napred. Izvorna smjernica za test izbora 422 donesena je 1996. na osnovu protokola za kombinovani test s ponovljenim dozama i testa izbora za reproduktivnu/razvojnu toksičnost o kojem se raspravljalo na dva sastanka stručnjaka u Londonu 1990. i Tokiju 1992.

U ovoj se ispitnoj metodi kombinuje dio koji se odnosi na izbor za reproduktivnu/razvojnu toksičnost, koji se zasniva na iskustvu koje su zemlje članice stekle upotrebom izvorne metode o postojećim hemikalijama koje se proizvode u velikim količinama i na osnovu istraživačkih ispitivanja s supstancama za pozitivnu kontrolu, te dio koji se odnosi na toksičnost s ponovljenim dozama, u skladu sa Smjernicom OECD-a za ispitivanje 407 (28-dnevno ispitivanje oralne toksičnosti na glodarima uz primjenu ponovljenih doza; odgovara poglavlju B.7. ovog Priloga).

Ova je ispitna metoda ažurirana relevantnim krajnjim tačkama endokrinih distruptora, kao nastavno djelovanje na aktivnost visokog prioriteta koju je OECD pokrenuo 1998. kako bi revidirao postojeće smjernice za ispitivanje i razvio nove smjernice za izbor i ispitivanje potencijalnih endokrinih distruptora. U tom kontekstu Smjernica za ispitivanje 407 (koja odgovara poglavlju B.7. ovog Priloga) poboljšana je 2008. parametrima koji su primjereni za otkrivanje endokrine aktivnosti ispitivanih hemikalija. Ažuriranjem Smjernice za ispitivanje 422 nastojalo se uključiti određene relevantne krajnje tačke endokrinih distruptora u ispitne smjernice za izbor kod kojih perioda izlaganja obuhvataju neka od osjetljivih perioda tokom razvoja (prenatalna perioda ili rana postnatalna perioda).

Odabrane dodatne relevantne krajnje tačke endokrinih distruptora, koje su i dio Smjernice za ispitivanje 443 (produžena studija reproduktivne toksičnosti na jednoj generaciji, koja odgovara poglavlju B.56. ovog Priloga), uključeni su u Smjernicu za ispitivanje 422 na osnovu studije izvodivosti koja se bavi naučnim i tehničkim pitanjima povezanima s njihovim uključivanjem te mogućim prilagođavanjima plana ispitivanja koje su potrebne za njihovo uključivanje.

Ova je ispitna metoda osmišljena za dobijanje ograničenih informacija o efektima ispitivane hemikalije na reproduktivnost mužjaka i ženki, kao što su funkcija gonada, ponašanje kod

parenja, začeće, razvoj zametka i parturicija. Ona nije alternativa i ne zamjenjuje postojeće ispitne metode B.31., B.34., B.35. ili B.56.

POČETNA RAZMATRANJA

Pri procjeni i ocjenjivanju toksičnih svojstava ispitivane hemikalije određivanje oralne toksičnosti uz primjenu ponavljanih doza može se ssprovesti nakon dobijanja početnih informacija o toksičnosti iz ispitivanja akutne toksičnosti. To istraživanje pruža informacije o mogućnim opasnostima po zdravlje do kojih bi moglo doći zbog ponovljenog izlaganja tokom relativno ograničenog vremenskog perioda. Ta metoda obuhvata osnovno istraživanje toksičnosti s ponovljenim dozama koje se može upotrijebiti za hemikalije za koje nije opravdano 90-dnevno istraživanje (npr. ako proizvedena količina ne prelazi određene granice) ili kao preliminarno istraživanje za dugotrajno istraživanje. Pri sprovođenju istraživanja treba slijediti osnovna načela i razmatranja navedena u OECD-ovoj Smjernici br. 19 o priznavanju, procjeni i korištenju kliničkih znakova kao humanih krajnjih tačaka za eksperimentalne životinje koje se upotrebljavaju u ocjenama sigurnosti.

Nadalje, obuhvata test izbora za reproduktivnu/razvojnu toksičnost i stoga se može upotrebljavati i za dobijanje početnih informacija o mogućim efektima na reproduktivnost mužjaka i ženki kao što su funkcija gonada, ponašanje kod parenja, začeće, razvoj zametka i parturicija, u ranoj fazi procjene toksikoloških svojstava ispitivanih hemikalija ili za zabrinjavajuće ispitivane hemikalije. Ovom se ispitnom metodom ne dobijaju potpune informacije o svim aspektima reprodukcije i razvoja. Tačnije, metoda pruža samo ograničena sredstva za otkrivanje postnatalnih manifestacija prenatalnog izlaganja ili efekata koji se mogu indukovati tokom postnatalnog izlaganja. Zbog (među ostalim) selektivnosti krajnjih tačaka i kratkog trajanja istraživanja ovom metodom neće se dobiti dokazi za konačne tvrdnje o nepostojanju reproduktivnih/razvojnih efekata. Osim toga, ako ne postoje podaci iz drugih ispitivanja reproduktivne/razvojne toksičnosti, pozitivni rezultati korisni su za početnu procjenu opasnosti i doprinose odlukama u pogledu potrebe za dodatnim ispitivanjem i njegova vremenskog okvira.

Rezultate dobijene parametrima povezanima s endokrinim sistemom treba posmatrati u kontekstu „OECD-ova konceptualnog okvira za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih hemikalija”. U tom konceptualnom okviru poboljšana Smjernica OECD-a za ispitivanje 422 nalazi se na nivou 4. kao in vivo test i pruža podatke o štetnim efektima na relevantne endokrine krajnje tačke. Međutim, endokrini signal ne mora se sam po sebi smatrati dovoljnim dokazom da je ispitivana hemikalija endokrini disruptor.

Ova ispitna metoda naglasak stavlja i na neurološke efekte kao specifičnu krajnju tačku, a naglašava i potrebu za pozornim kliničkim uočavanjem životinja kako bi se dobilo što više informacija. Cilj je ove metode identifikovati hemikalije koje imaju neurotoksički potencijal, što može zahtijevati dalja detaljna istraživanja tog aspekta. Osim toga, metoda može pokazati i osnovne imunološke efekte.

Ako ne postoje podaci iz drugih istraživanja sistemske toksičnosti, reproduktivne/razvojne toksičnosti, neurotoksičnosti i/ili imunotoksičnosti, pozitivni rezultati korisni su za početnu procjenu opasnosti i doprinose odlukama u pogledu potrebe za dodatnim ispitivanjem i njegova vremenskog okvira. Ispitivanje može biti naročito korisno kao dio OECD-ova baze podataka za informacije o izboru (SIDS) za procjenu postojećih hemikalija za koje je dostupno malo ili nimalo toksikoloških informacija i može služiti kao alternativa sprovođenju dvaju zasebnih ispitivanja toksičnosti s ponovljenim dozama (Smjernica OECD-a za ispitivanje 407, koja odgovara

poglavlju B.7. ovog Priloga) odnosno reproduktivne/razvojne toksičnosti (Smjernica OECD-a za ispitivanje 421, koja odgovara poglavlju B.63. ovog Priloga). Može se upotrebljavati i kao istraživanje o utvrđivanju raspona doze za opsežnija reproduktivna/razvojna istraživanja ili ako se smatra relevantnim iz drugih razloga.

Generalno se pretpostavlja da postoje razlike u osjetljivosti između gravidnih životinja i onih koje nisu gravidne. Stoga u ovom kombinovanom testu može biti teže odrediti visine doza koje su primjerene i za procjenu opšte sistemske toksičnosti i specifične reproduktivne/razvojne toksičnosti nego kod posebnog ssprovođenja pojedinačnih ispitivanja. Nadalje, tumačenje rezultata ispitivanja u pogledu opšte sistemske toksičnosti može biti teže nego kod ssprovođenja posebnog istraživanja s ponovljenim dozama, naročito ako se serumski i histopatološki parametri ne procjenjuju u isto vrijeme tokom istraživanja. Zbog te tehničke složenosti za ssprovođenje ovog kombinujenog testa izbora potrebno je znatno iskustvo u području ispitivanja toksičnosti. S druge strane, osim manjeg broja životinja koje sudjeluju, kombinujeni test može pružiti bolji način za razlikovanje direktnih efekata na reprodukciju/razvoj od efekata koji su sekundarni u odnosu na druge (sistemske) efekte.

U ovom je ispitivanju period doziranja duže nego kod uobičajenog 28-dnevnog istraživanja s ponovljenim dozama. Međutim, upotrebljava se manje životinja svakog pola po grupi u u poređenju sa situacijom u kojoj se uz test izbora za reproduktivnu/razvojnu toksičnost sprovodi uobičajeno 28-dnevno istraživanje s ponovljenim dozama.

U ovoj ispitnoj metodi pretpostavlja se oralna primjena ispitivane hemikalije. Ako se upotrebljavaju drugi načini izlaganja, mogu biti potrebna prilagođavanja.

Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smješi radi dobijanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smješe**.**

NAČELO ISPITIVANJA

Ispitivana hemikalija primjenjuje se u gradiranim dozama na nekoliko grupa mužjaka i ženki. Na mužjake treba primjenjivati dozu najmanje četiri nedelje, do dana i uključujući dan prije planiranog usmrćivanja (to uključuje najmanje dvije nedelje prije parenja, tokom perioda parenja i približno dvije nedelje poslije parenja). S obzirom na ograničeni period doziranja prije parenja u mužjaka, plodnost možda neće biti naročito osjetljiv pokazatelj testikularne toksičnosti. Stoga je od ključne važnosti detaljan histološki pregled testisa. Kombinacija perioda doziranja prije parenja od dvije nedelje i naknadno posmatranje parenja/plodnosti s ukupnim periodm doziranja od najmanje četiri nedelje, nakon čega slijedi detaljna histopatologija muških gonada smatraju se dovoljnima da bi se omogućilo otkrivanje većine efekata na plodnost mužjaka i spermatogenezu.

Ženkama dozu treba davati tokom cijelog istraživanja. To uključuje dvije nedelje prije parenja (pri čemu je cilj obuhvatiti najmanje dva cijela ciklusa estrusa), promjenjivo vrijeme do začeća, trajanje graviditeta i najmanje 13 dana nakon okota, do dana i uključujući dan prije planiranog usmrćivanja.

Trajanje istraživanja, nakon aklimatizacije i procjene ciklusa estrusa prije doziranja, zavisi o ponašanju ženki i iznosi približno 63 dana [najmanje 14 dana prije parenja, (do) 14 dana parenja, 22 dana gestacije, 13 dana laktacije].

Tokom perioda primjene životinje se svakodnevno pažljivo posmatraju radi uočavanja znakova toksičnosti. Životinje koje ugibaju ili su usmrćene tokom ispitivanja podvrgavaju se obdukciji, a na kraju ispitivanja preživjele se životinje usmrćuju i podvrgavaju obdukciji.

OPIS METODE

Izbor životinjske vrste

Ova ispitna metoda osmišljena je za upotrebu na glodarima. Ako se parametri navedeni u ovoj Smjernici za ispitivanje 422 istražuju na drugoj vrsti glodara, treba pružiti detaljno obrazloženje. U međunarodnom validacionom programu za određivanje endokrinih distruptora o Smjernici za ispitivanje 407 primjenjivali su se samo štakori. Sojeve slabe plodnosti ili poznate po velikoj učestalosti razvojnih defekata ne bi trebalo koristiti. Treba koristiti zdrave životinje koje se prethodno nisu parile i nisu učestvovale u eksperimentima. Ispitne životinje treba opisati u pogledu vrste, soja, pola, mase i dobi. Na početku istraživanja razlike u tjelesnoj masi korištenih životinja trebale bi biti minimalne i ne bi trebale prelaziti ±20 % srednje vrijednosti tjelesne mase svakog pola. Ako se istraživanje sprovodi kao preliminarno istraživanje u odnosu na dugotrajno istraživanje ili istraživanje cijele generacije, prednost se daje primjeni životinja istog soja i porijekla u oba istraživanja.

Smještaj i hranjenje

Svi postupci trebaju biti usklađeni s lokalnim standardima brige o životinjama u laboratoriji. Temperatura u prostoriji u kojoj se drže eksperimentalne životinje treba biti 22 °C (± 3 °C). Relativna vlaga trebala bi iznositi najmanje 30 %, a poželjno je da ne prelazi 70 %, osim tokom čišćenja prostorije. Rasvjeta treba biti vještačka uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Za hranjenje se može upotrebljavati konvencionalna laboratorijska hrana uz neograničenu količinu vode za piće. Na izbor prehrane može uticati potreba da se osigura odgovarajuća mješavina ispitivane hemikalije kad se ona daje na taj način.

Životinje trebaju biti smještene u malim grupama istoga pola; ako je to naučno opravdano, životinje se mogu držati u posebnim prostorijama. U slučaju grupnog smještaja, u jednom kavezu ne smije biti smješteno više od pet životinja. Postupci parenja trebali bi se odvijati u kavezima koji odgovaraju toj svrsi. Gravidne ženke treba smjestiti u posebne kaveze i treba im osigurati materijale za izradu gnijezda. Ženke se tokom laktacije smještaju pojedinačno s njihovim mladuncima.

Treba redovno analizirati ima li u hrani kontaminanata. Uzorak hrane treba sačuvati do kraja izrade izvještaja.

Priprema životinja

Zdrave, mlade odrasle životinje nasumce se izaberu i raspoređuju u grupe za tretiranje i kaveze. Kaveze bi trebalo rasporediti tako da se efekti do kojih bi moglo doći zbog položaja kaveza svedu na minimum. Životinje se označuju na jedinstven način i drže u kavezima najmanje pet dana prije početka istraživanja kako bi se prilagodile laboratorijskim uslovima.

Priprema doza

Preporučuje se da se ispitivana hemikalija daje oralno osim ako se neki drugi načini primjene smatraju prikladnijima. Ako se odabere oralna primjena, ispitivana hemikalija obično se daje

oralnom intubacijom; međutim, u određenim slučajevima, ispitivane hemikalije mogu se primijeniti i s hranom ili vodom za piće.

Prema potrebi, ispitivana se hemikalija rastvara ili suspenduje u odgovarajućem nosaču. Kad je god moguće, preporučuje se najprije razmotriti mogućnost primjene vodenog rastvora/suspenzije, zatim mogućnost primjene rastvora/suspenzije u ulju (npr. kukuruzno ulje) i tek na kaju mogućnost rastvaranja u ostalim nosačima. Za nosače bez vodenog rastvora moraju biti poznata toksična svojstva nosača. Treba utvrditi stabilnost i homogenost ispitivane hemikalije u nosaču.

POSTUPAK

Broj i pol životinja

Preporučuje se da se u svakoj grupi započne s najmanje deset mužjaka i 12–13 ženki. Ženke će se prije izlaganja procijeniti u pogledu ciklusa estrusa pa se životinje koje ne pokažu uobičajeni ciklus od četiri do pet dana neće uključiti u istraživanje; stoga se preporučuje više ženki kako bi se dobilo deset ženki po grupi. Osim u slučaju znatnih toksičnih efekata, očekuje se da će se tako dobiti najmanje osam gravidnih ženki po grupi, a to je obično najmanji prihvatljivi broj gravidnih ženki po grupi. Cilj je dobiti dovoljno gravidnih životinja i potomaka kako bi se osigurala valjana procjena potencijala ispitivane hemikalije da utiče na plodnost, gravidnost, ponašanje ženki (majki) i potomaka koji sišu te rast i razvoj potomstva F1 od začeća do 13. dana nakon okota. Ako se planira usmrćivanje životinja u međuvremenu, navedeni broj treba povećati za broj životinja predviđenih za usmrćivanje prije završetka istraživanja. Treba razmotriti mogućnost uključivanja dodatne satelitske grupe od pet životinja svakoga pola u kontrolnu grupu i grupu koja će primiti najvišu dozu radi zapažanja reverzibilnosti, postojanosti ili zakašnjelog nastupa sistemskih toksičnih efekata najmanje 14 dana nakon tretiranja. Životinje iz satelitskih grupa neće se pariti i stoga se ne upotrebljavaju za procjenu reproduktivne/razvojne toksičnosti.

Doziranje

Generalno, treba upotrijebiti najmanje tri ispitne grupe i jednu kontrolnu grupu. Ako nisu dostupni prikladni podaci o opštoj toksičnosti, može se sprovesti istraživanje o utvrđivanju raspona (životinje istog soja i porijekla) kako bi se pomoglo pri određivanju visina doze koje će se primjenjivati. Osim tretiranja ispitivanom hemikalijom, sa životinjama u kontrolnoj grupi treba postupati na isti način kao sa životinjama iz ispitne grupe. Ako se pri primjeni ispitivane hemikalije koristi nosač, volumen nosača koji primi kontrolna grupa treba biti jednak najvećem upotrijebljenom volumenu.

Visine doza treba odabrati uzimajući u obzir sve postojeće podatke o toksičnosti i (toksiko) kinetici koji su dostupni. Treba uzeti u obzir i da je moguća razlika u osjetljivosti između gravidnih ženki i ženki koje nisu gravidne. Najvišu dozu treba odabrati s ciljem indukovanja toksičnih efekata, ali ne i smrti ili očite patnje. Nakon toga, treba odabrati slijed postupnog smanjivanja visine doze kako bi se dokazali svi odgovori povezani s doziranjem te da kod najniže doze nema štetnih efekata. Često je optimalno doze primijeniti u dvostrukim do četvorostrukim intervalima te je često bolje dodati i četvrtu ispitnu grupu nego između primjene doza koristiti veoma velike vremenske intervale (npr. iznad faktora 10).

Ako se uoče znaci opšte toksičnosti (npr. smanjena tjelesna masa, efekti na jetri, srcu, plućima ili bubrezima itd.) ili druge promjene koje ne moraju biti toksični odgovori (npr. smanjeno

uzimanje hrane, povećanje jetre), uočene efekte na endokrinim krajnjim tačkama treba tumačiti s oprezom.

Granični test

Ako istraživanje sprovedeno oralnom primjenom jedne doze od najmanje 1 000 mg/kg tjelesne mase na dan ili, kod davanja doze s hranom, primjenom doze koja se u ekvivalentnom postotku daje s hranom ili vodom za piće (na osnovu određivanja tjelesne mase), u skladu s pokolonama opisanima za ovo istraživanje, ne proizvede uočljive toksične efekte i ako na osnovu podataka iz strukturno srodnih supstanci ne treba očekivati toksičnost, može se smatrati da sprovođenje potpunog istraživanja s nekoliko visina doza nije neophodno. Granični test je relevantan samo ako izloženost ljudi ne ukazuje na potrebu za primjenom veće doze. Za druge vrste primjene doza, kao što su inhalacija ili dermalna primjena, maksimalno izlaganje koje se može postići često je određeno fizičko-hemijskim svojstvima ispitivanih hemikalija.

Primjena doza

Životinjama se svakodnevno daje ispitivana hemikalija sedam dana nedeljno. U slučaju primjene oralnom intubacijom ispitivanu hemikaliju treba dati životinjama u jednoj dozi pomoću zeludačne sonde ili prikladne intubacione kanile. Maksimalni volumen tečnosti koji se može jednokratno dati zavisi o veličini ispitne životinje. Taj volumen ne smije biti veći od 1 ml/100 g tjelesne mase, osim kad se radi o vodenim rastvorima koje dopuštaju primjenu volumena od 2 ml/100 g tjelesne mase. Osim u slučaju nadražujućih ili nagrizajućih ispitivanih hemikalija kod kojih se štetni efekti obično javljaju pri višim koncentracijama, varijabilnost ispitnog volumena treba prilagođavanjem koncentracije svesti na najmanju moguću mjeru kako bi se zagarantovao stalni volumen pri svim visinama doza.

Kod ispitivanih hemikalija koje se primjenjuju s hranom ili vodom za piće važno je osigurati da količine ispitivane hemikalije ne utiču na uravnoteženi unos hrane ili vode. Kad se ispitivana hemikalija daje s hranom, može se koristiti ili stalna koncentracija u odnosu na količinu hrane (ppm) ili stalna visina doze u odnosu na tjelesnu masu životinje; treba navesti iskorištenu opciju. Za ispitivanu hemikaliju koja se primjenjuje oralnom intubacijom, dozu treba davati u podjednako vrijeme ili vremena svakog dana i prilagoditi je najmanje jednom nedeljno kako bi se održala stalna visina doze s obzirom na tjelesnu masu životinje. Kad se prije dugotrajnog ili potpunog istraživanja reproduktivne toksičnosti sprovodi kombinujeno preliminarno istraživanje, u oba istraživanja prehrana životinja treba biti slična.

Plan eksperimenta

Doziranje životinja oba pola trebalo bi započeti dvije nedelje prije parenja, nakon aklimatizacije od najmanje pet dana te nakon što se ženke izaberu u pogledu normalnog ciklusa estrusa (u razdoblju od dvije nedelje prije tretiranja). Istraživanje treba planirati tako da procjena ciklusa estrusa počne ubrzo nakon što životinje postignu punu polnu zrelost. To se može malo razlikovati za različite sojeve pacova u različitim laboratorijima, npr. deset nedelja kod pacova soja Sprague Dawley i 12 nedelja kod soja Wistar. Ženke (majke) s potomstvom trebalo bi usmrtiti 13. dana nakon okota ili ubrzo nakon toga. Kako bi se omogućio post ženki (majki) preko noći prije uzimanja krvi (ako se prednost daje toj opciji), ženke i njihovi potomci ne moraju se nužno usmrtiti istog dana. Dan okota (tj. kada se dovrši parturicija) definiše se kao nulti dan nakon okota. Ženke koje ne pokazuju znake kopulacije usmrćuju se 24–26 dana nakon posljednjeg dana perioda parenja. Doziranje se nastavlja kod oba pola tokom perioda parenja. Mužjake bi i dalje trebalo dozirati nakon perioda parenja barem dok ne istekne ukupno period

doziranja od 28 dana. Zatim se usmrćuju ili se zadržavaju i nastavljaju dozirati radi mogućeg sprovođenja drugog parenja ako se to smatra primjerenim.

Svakodnevno doziranje roditeljskih ženki trebalo bi se nastaviti tokom cijele gravidnosti i najmanje do 13. dana nakon okota, uključujući i taj dan, ili dan prije usmrćivanja. Kod istraživanja u kojima se ispitivana hemikalija primjenjuje inhalacijom i/ili dermalnim putem doziranje bi se trebalo nastaviti barem do 19. dana gestacije, uključujući i taj dan, i s doziranjem bi se trebalo ponovno početi što prije, a najkasnije na 4. postnatalni dan (PND).

Životinje u satelitskoj grupi za koje se planira naknadno uočavanje, ako su uključene, ne pare se. One se trebaju držati još najmanje 14 dana nakon prvog planiranog usmrćivanja ženki (majki), bez tretiranja, kako bi se otkrili zakašnjeli toksični efekti, postojanost toksičnih efekata ili oporavak od toksičnih efekata.

Dijagram plana eksperimenta prikazan je u Dodatku 2.

Ciklusi estrusa

Cikluse estrusa trebalo bi pratiti prije početka tretiranja kako bi se za istraživanje odabrale ženke s uobičajenim ciklusom. Svakodnevno bi se trebali pratiti i vaginalni brisevi od početka perioda tretiranja do pojave znakova parenja. Ako postoji zabrinutost u pogledu efekata akutnog stresa koji bi mogli izmijeniti cikluse estrusa kad se počnu primjenjivati doze, laboratorije mogu izlagati ispitne životinje dvije nedelje, zatim svaki dan prikupiti vaginalne briseve kako bi pratili ciklus estrusa najmanje dvije nedelje tokom perioda prije parenja, uz stalno praćenje tokom perioda parenja do pojave znakova parenja. Ako se uzimaju vaginalne/cervikalne ćelije, treba paziti da se ne poremeti mukoza, što bi moglo indukovati lažnu trudnoću.

Postupak parenja

U ovom bi se istraživanju obično trebala upotrebljavati parenja 1:1 (jedan mužjak na jednu ženku). Izuzeci se mogu javiti ako dođe do smrti mužjaka. Ženku bi trebalo smjestiti s istim mužjakom dok se ne uoče znaci kopulacije ili dok ne isteknu dvije nedelje. Svako jutro ženke treba pregledati u pogledu prisutnosti sperme ili vaginalnog čepa. Nultim danom graviditeta smatra se dan kad je potvrđeno parenje (pronađen je vaginalni čep ili sperma). Ako je parenje bilo neuspješno, može se razmotriti mogućnost ponovnog parenja ženki s dokazanim mužjacima iste grupe.

Veličina legla

Četiri dana nakon okota veličina svakog legla može se prilagoditi nasumičnim selekcionim uklanjanjem suvišnih mladunaca tako da se po jednom leglu po mogućnosti ostavi četiri ili pet mladunaca svakog pola u zavisnosti od uobičajene veličine legla soja pacova koji se upotrebljavaju. Uzorke krvi treba prikupiti od dva suvišna mladunca, objediniti ih i upotrijebiti za određivanje nivoa seruma T4. Nije prihvatljivo selektivno uklanjanje mladunaca, npr. prema tjelesnoj masi ili anogenitalnom razmaku. Kad je god broj muških ili ženskih mladunaca takav da nije moguće imati četiri ili pet mladunaca svakog pola po leglu, prihvatljivo je djelimično prilagođavanje (npr. šest mužjaka i četiri ženke). Mladunci se ne uklanjaju ako bi se veličina legla time smanjila ispod cilja izdvajanja mladunaca (osam ili deset mladunaca po leglu). Ako je dostupan samo jedan mladunac povrh cilja izdvajanja mladunaca, uklanja se samo jedan mladunac i od njega se uzima krv za moguću procjenu seruma T4.

Ako se veličina legla ne prilagođava, 4. dana nakon okota usmrćuju se dva mladunca po leglu i uzimaju se uzorci krvi radi mjerenja koncentracija seruma hormona štitne žlijezde. Ako je moguće, ta dva mladunca po leglu trebale bi biti ženke kako bi se mužjaci sačuvali za procjenu zadržavanja bradavica, osim ako uklanjanjem tih mladunaca više ne bi ostalo ženki za procjenu pri završetku ispitivanja. Mladunci se neće uklanjati ako bi se time veličina legla smanjila na manje od osam ili deset mladunaca po leglu (u zavisnosti od uobičajene veličine legla kod soja pacova koji se upotrebljava). Ako je dostupan samo jedan mladunac povrh uobičajene veličine legla, uklanja se samo jedan mladunac i od njega se uzima krv za moguću procjenu seruma T4.

Zapažanja

Opšta klinička zapažanja treba sprovoditi najmanje jednom dnevno, po mogućnosti svaki dan u isto vrijeme ili vremena, vodeći računa o razdoblju najvećeg intenziteta očekivanih efekata nakon doziranja. Zdravstveno stanje životinja treba zabilježiti. Barem dvaput dnevno sve životinje treba pregledati radi otkrivanja mogućih simptoma morbiditeta i smrtnosti.

Jednom prije prvog izlaganja i barem jednom nedeljno nakon toga treba obaviti detaljno kliničko uočavanje stanja svih roditeljskih životinja (to će omogućiti utvrđivanje promjena u stanju istih subjekata). Ta zapažanja treba obavljati van kaveza u kojima se životinje drže, u standardnom ograđenom prostoru i, po mogućnosti, svaki dan u isto vrijeme. Rezultate zapažanja treba pažljivo bilježiti, pri čemu je najbolje koristiti se sistemom ocjenjivanja koji je jasno definisala laboratorija koja obavlja ispitivanje. Treba preduzeti sve što je potrebno kako bi se osiguralo da odstepena u uslovima ispitivanja budu minimalna te da zapažanja po mogućnosti provode promatrači koji nisu upoznati s tretiranjem. Znaci koji se bilježe trebaju, među ostalim, uključivati promjene na koži, dlaci, očima, sluznicama, pojavu iscjedaka, izlučevine i autonomne aktivnosti (npr. lakrimacija (lučenje suza), piloerekcija, veličina zjenica, nepravilnosti u disanju). Treba zabilježiti i promjene u hodu, držanju i reakcijama na postepene sa životinjama, kao i pojavu kloničkih ili toničkih pokreta, stereotipije (npr. pretjerano njegovanje krzna, ponavljano kretanje u krug), otežane ili produžene parturicije ili neobičnog ponašanja (npr. Samopovrjeđivanje, hodanje unatrag).

U određenom trenutku tokom istraživanja treba procijeniti osjetilnu reaktivnost na podražaje raznih vrsta (npr. auditivne, vizualne i proprioceptivne podražaje), jakost stiska i motornu aktivnost u pet mužjaka i pet ženki nasumično odabranih iz svake grupe. Dalje pojedinosti o pokolonama koji se mogu primjenjivati navedene su u odgovarajućoj referentnoj literaturi. Međutim, mogu se primjenjivati i drugi postupci koji nisu u njoj navedeni. Kod mužjaka bi se ta funkcionalna zapažanja trebala sprovoditi pred kraj perioda doziranja, neposredno prije planiranog usmrćivanja, ali prije uzimanja uzoraka krvi za hematologiju ili kliničku hemiju. Ženke bi tokom tih funkcionalnih ispitivanja trebale biti u fiziološki sličnom stanju i po mogućnosti bi ih trebalo ispitati jednom tokom posljednjeg nedelje laktacije (npr. od 6. do 13. dana laktacije), neposredno prije planiranog usmrćivanja. Vrijeme razdvajanja ženki (majki) i mladunaca trebalo bi se smanjiti u mjeri u kojoj je to moguće.

Funkcionalna zapažanja koja se obavljaju jednom pred kraj istraživanja mogu se izostaviti ako se istraživanje sprovodi kao preliminarno istraživanje za naknadno (90-dnevno) istraživanje subhroničnosti ili dugotrajno istraživanje. U tom slučaju funkcionalna zapažanja treba uključiti u to sljedeće istraživanje. S druge strane, dostupnost podataka o funkcionalnim uočavanjima iz tog istraživanja uz primjenu ponovljenih doza može biti od pomoći u izboru visina doza u naknadnom istraživanju subhroničnosti ili dugotrajnom istraživanju.

U posebnim slučajevima funkcionalna zapažanja mogu izostati i kod grupa koje inače pokazuju simptome toksičnosti do mjere koja bi znatno ometala uspješnost funkcionalnog ispitivanja.

Vrijeme gestacije treba zabilježiti i računati od nultog dana graviditeta. Svako leglo nakon okota treba što prije pregledati kako bi se utvrdio broj i pol mladunaca, mrtvorođenih, živorođenih, patuljastih životinja (mladunci koji su znatno manji od odgovarajućih kontrolnih mladunaca) i prisutnost velikih abnormalnosti.

Žive mladunce trebalo bi prebrojati i odrediti njihov pol te bi legla trebalo izvagati u roku od 24 sata od parturicije (0. ili 1. dan nakon okota) te barem 4. i 13. dana nakon okota. Uz zapažanja roditeljskih životinja trebalo bi zabilježiti i svako abnormalno ponašanje potomaka.

Treba izmjeriti anogenitalni razmak u svakog mladunca na isti postnatalni dan, od nultog do 4. postnatalnog dana. Tjelesnu masu mladunaca treba utvrditi na dan mjerenja anogenitalnog razmaka, a njega treba normalizirati u odnosu na veličinu mladunca (najbolje kubni korijen tjelesne mase). Broj bradavica/areola u mužjaka mladunaca trebalo bi utvrditi 12. ili 13. postnatalnog dana, kako se preporučuje u Smjernici OECD-a 151.

Tjelesna masa i unos hrane/vode

Mužjake i ženke treba vagati prvog dana primjene doze, a zatim najmanje jednom nedeljno i zadnji dan. Tokom graviditeta ženke bi trebalo vagati 0., 7., 14. i 20. dana te u roku od 24 sata od parturicije (0. ili 1. dan nakon okota) te barem 4. i 13. dana nakon okota. Ta zapažanja treba unijeti u izvještaj za svaku odraslu životinju posebno.

Tokom perioda prije parenja, graviditeta i laktacije unos hrane trebalo bi mjeriti najmanje jednom nedeljno. Mjerenje unosa hrane tokom parenja nije obavezno. Trebalo bi mjeriti i unos vode tokom tih perioda ako se ispitivana hemikalija primjenjuje tim putem.

Hematologija

Na pet mužjaka i pet ženki koji se nasumično odaberu iz svake grupe trebalo bi jednom tokom istraživanja sprovesti sljedeće hematološke preglede: hematokrit, koncentracija hemoglobina, broj eritrocita, retikulociti, ukupni i diferencijalni broj leukocita, broj trombocita i mjerenje vremena/potencijala zgrušavanja krvi. Ostala određivanja koja treba sprovesti ako ispitivana hemikalija ili njeni navodni metaboliti imaju ili se sumnja da imaju oksidacijska svojstva obuhvataju koncentraciju methemoglobina i Heinzova tjelešca.

Uzorke krvi treba uzeti na specificiranom mjestu. Ženke bi tokom uzimanja uzoraka trebale biti u fiziološki sličnom stanju. Kako bi se izbjegle praktične poteškoće povezane s varijabilnosti početka gestacije, krv se kod ženki može uzimati na kraju perioda prije parenja kao alternativa uzimanju uzoraka neposredno prije ili kao dio postupka za eutanaziju životinja. Uzorke krvi mužjaka po mogućnosti bi trebalo uzimati neposredno prije ili kao dio postupka za eutanaziju životinja. Kao alternativa, krv se kod mužjaka može uzimati i na kraju perioda prije parenja ako je tom vremenu uzorkovanja dana prednost kod ženki.

Uzorke krvi trebalo bi čuvati u primjerenim uslovima.

Klinička biohemija

PATOLOGIJA

Kliničko-biohemijske pretrage za istraživanje glavnih toksičnih efekata u tkivima i posebno efekata na bubrege i jetru treba obaviti na uzorcima krvi dobijenima od pet mužjaka i pet ženki odabranih iz svake grupe. Preporučuje se da životinje tokom noći pred uzimanje uzoraka krvi ne jedu. Pretrage koje se rade na plazmi ili serumu trebale bi obuhvatiti mjerenje natrijuma, kalijuma, glukoze, ukupne količine holesterola, ureje, kreatinina, ukupne količine proteina i albumina te najmanje dva enzima koji su pokazatelji hepatocelularnih efekata (kao što su alanin aminotransferaza, aspartat aminotransferaza i sorbitol dehidrogenaza) te žučne kiseline. Mjerenja dodatnih enzima (jetrinog ili drugog porijekla) i bilirubina mogu u određenim okolnostima pružiti korisne informacije.

Uzorci krvi uzimaju se s utvrđenog mjesta na osnovu sljedećeg rasporeda:

— od najmanje dva mladunca po leglu 4. dana nakon okota ako broj mladunaca to omogućuje,
— od svih ženki (majki) i najmanje dva mladunaca po leglu pri završetku ispitivanja 13. dana, i
— od svih odraslih mužjaka pri završetku ispitivanja.

Svi uzorci krvi čuvaju se u odgovarajućim uslovima. Uzorci krvi mladunaca i odraslih mužjaka uzeti 13. dana procjenjuju se u pogledu nivoa seruma hormona štitne žlijezde (T4). Dalja procjena hormona T4 u uzorcima krvi ženki (majki) i mladunaca uzetih 4. dana obavlja se po potrebi. Moguće je i mjerenje drugih hormona ako je to relevantno. Krv mladunaca može se izvaditi po leglu radi analiza hormona štitne žlijezde. Hormone štitne žlijezde (T4 i TSH) po mogućnosti bi trebalo mjeriti kao „ukupni broj”.

U zadnjoj nedelji istraživanja, po izboru, mogu se obaviti analize urina pet nasumično odabranih mužjaka iz svake grupe dobijenog prikupljanjem u određenim vremenskim razmacima: izgled, količina, osmolalnost ili specifična težina, pH, protein, glukoza i krv/krvne ćelije.

Osim toga, treba razmisliti i o ispitivanju serumskih markera koji označavaju opšte oštećenja tkiva. Ostale pretrage, koje bi trebalo obaviti ako poznata svojstva ispitivane hemikalije mogu ili se sumnja da bi mogla uticati na povezane metaboličke profile uključuju utvrđivanje nivoa kalcijuma, fosfata, triglicerida, glukoze, nivoa specifičnih hormona, methemoglobina i aktivnosti kolinesteraze. Njih treba identifikovati od slučaja do slučaja.

Sljedeći faktori mogu uticati na varijabilnost i apsolutne koncentracije za određivanje hormona:

— vrijeme usmrćivanja zbog dnevne varijacije koncentracije hormona,
— metoda usmrćivanja radi izbjegavanja pretjeranog stresa za životinje koji može uticati na koncentraciju hormona,
— pribori za određivanje hormona koji se mogu razlikovati po njihovim standardnim krivama.

Uzorke plazme koji su posebno namijenjeni određivanju hormona treba uzeti u uporedivo doba dana. Brojčane vrijednosti dobijene analizom koncentracija hormona razlikuju se u zavisnosti o različitom, komercijalno dostupnom priboru.

Ako su prošli polazni podaci neprikladni, u obzir treba uzeti određivanje hematoloških i kliničkih biohemijskih varijabli prije početka doziranja ili po mogućnosti na grupi životinja koje nisu uključene u eksperimentalne grupe. Kod ženki se podaci moraju dobiti od životinja koje doje.

Makroskopska nekropsija

Sve odrasle životinje korištene u istraživanju trebale bi se podvrgnuti kompletnoj, detaljnoj makroskopskoj nekropsiji koja obuhvata pažljiv pregled spoljašnje površine tijela, svih otvora te lobanjske, grudne i trbušne šupljine i njihovog sadržaja. Posebnu pažnju treba obratiti na organe reproduktivnog sistema. Broj mjesta za implantaciju treba zabilježiti. Vaginalne briseve treba pregledati na dan nekropsije kako bi se utvrdila faza ciklusa estrusa i omogućila korelacija s histopatologijom ženskih reproduktivnih organa.

Testise i sjemene kanaliće te prostatu i sjemene mjehuriće s koagulacionim žlijezdama, kao cjelinu, svih odraslih mužjaka treba po potrebi obrezivanjem osloboditi od svih prianjajućih tkiva te ih treba izvagati u mokrom stanju što prije nakon seciranja kako bi se spriječilo njihovo sušenje. Osim toga, mase neobaveznih organa mogle bi uključivati kompleks anusnog podizača i bulbokavernoznog mišića, Cowperove žlijezde i glans penisa kod mužjaka te jajnike u paru (mokra masa) i maternicu (uključujući cerviks) kod ženki; ako se uključuju, te bi mase trebalo prikupiti što prije nakon seciranja. Treba sačuvati jajnike, testise, sjemene kanaliće, sekundarne polne organe i sve organe koji pokazuju makroskopske lezije svih odraslih životinja.

Štitna žlijezda svih odraslih mužjaka i ženki te jednog mužjaka i jedne ženke starih 13 dana iz svakog legla trebala bi se sačuvati u najprimjerenijem sredstvu za fiksiranje radi planiranog kasnijeg histopatološkog pregleda. Masa štitne žlijezde može se odrediti nakon fiksacije. Obrezivanje također treba obaviti vrlo pažljivo te samo nakon fiksacije kako bi se izbjeglo oštećenje tkiva. Oštećena tkiva mogu kompromitovati histopatološku analizu. Uzorke krvi treba uzeti na specificiranom mjestu i čuvati u odgovarajućim uslovima neposredno prije ili kao dio postupka za eutanaziju životinja.

Osim toga, kod najmanje pet odraslih mužjaka i ženki nasumično odabranih iz svake grupe (osim onih za koje je utvrđeno da su na umoru i/ili su eutanazirani prije kraja istraživanja) s jetre, bubrega, nadbubrežnih žlijezda, timusa, slezene, mozga i srca treba obrezati sve prianjajuće tkivo, prema potrebi, te ih još mokre izvagati što prije nakon seciranja kako bi se spriječilo da se osuše. Sljedeća tkiva treba sačuvati u sredstvu za fiksiranje koje je najprimjerenije i za vrstu tkiva i za planirani kasniji histopatološki pregled: sve makrolezije, mozak (reprezentativne regije uključujući veliki mozak, mali mozak i medulu/most), kičmenu moždinu, oko, želudac, tanko i debelo crijevo (uključujući Peyerove ploče), jetru, bubrege, nadbubrežne žlijezde, slezenu, srce, timus, dušnik i pluća (preparirane upuhivanjem fiksativa i zatim uranjanjem), polne žlijezde (testise i jajnike), sekundarne polne organe (maternicu i cerviks, sjemene kanaliće, prostatu, sjemene mjehuriće s koagulacionim žlijezdama), vaginu, mokraćni mjehur, limfne čvorove (osim najbližeg drenažnog čvora treba uzeti još jedan limfni čvor na osnovu laboratorijskog iskustva, periferni živac (ishijadični ili tibijalni) po mogućnosti smješten uz mišić, skeletni mišić i kost, s kičmenom moždinom (sekcija ili, kao alternativna, svježe pripremljen aspirat koštane srži). Preporučuje se da se testisi fiksiraju uranjanjem u Bouinov ili izmijenjeni Davidsonov fiksativ (16., 17. i 18.); za ta se tkiva ne preporučuje fiksacija u formalinu. Vezivna ovojnica može se nježno i plitko punktirati na oba pola organa iglom koja omogućuje brzu penetraciju fiksativa. Klinički i drugi nalazi mogu ukazati na potrebu za ispitivanjem dodatnih tkiva. Treba sačuvati i sve organe za koje se na osnovu saznanja o svojstvima ispitivane hemikalije smatra da bi mogli biti ciljni.

Sljedeća tkiva mogu dati dragocjenu indikaciju za efekte na endokrini sistem: polne žlijezde (jajnici i testisi), sekundarni polni organi (maternica s cerviksom, sjemeni kanalići, sjemeni mjehurići s koagulacionim žlijezdama, dorzolateralna i ventralna prostata), vagina, hipofiza, muška mliječna žlijezda i nadbubrežna žlijezda. Promjene u muškim mliječnim žlijezdama nisu

dovoljno dokumentirane, ali taj parametar može biti vrlo osjetljiv na supstance s estrogenskim djelovanjem.

Mrtve mladunce i mladunce koje se usmrti 13. dana nakon okota, ili ubrzo nakon toga, trebalo bi pažljivo pregledati kako bi se utvrdile barem spoljašnje velike abnormalnosti. Posebnu pažnju treba posvetiti spoljašnjim reproduktivnim genitalijama koje se pregledava kako bi se utvrdili mogući znaci promijenjenog razvoja.

Histopatologija

Na sačuvanim organima i tkivima odabranih životinja iz kontrolne grupe i grupa tretiranih visokim dozama treba napraviti kompletan histopatološki pregled (uz poseban naglasak na faze spermatogeneze kod muških polnih žlijezdi i histopatologiju strukture intersticijskih ćelija testisa). Po potrebi se mogu pregledati štitne žlijezde mladunaca i preostalih odraslih životinja. Ta ispitivanja treba proširiti na životinje drugih grupa doziranja ako su u grupi s visokom dozom uočene promjene povezane s tretiranjem. Smjernica o histopatologiji pruža dodatne detaljne informacije o sekciji, fiksaciji, seciranju i histopatologiji endokrinih tkiva.

Treba pregledati sve makrolezije. Kako bi se pomoglo pojasniti NOAEL-e, treba pregledati ciljne organe kod grupa tretiranih ostalim dozama, naročito u grupama kod kojih se tvrdi da pokazuju NOAEL.

Ako se koristi satelitska grupa, treba napraviti histopatološki pregled tkiva i organa kod kojih su u tretiranim grupama uočeni efekti.

PODACI I IZVJEŠTAVANJE

Podaci

Treba navesti podatke za svaku pojedinačnu životinju. Osim toga, sve podatke treba sažeti u obliku tabele, tako da se za svaku ispitnu grupu navede broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje su uginule tokom ispitivanja ili su eutanazirane iz humanih razloga, vrijeme smrti ili eutanazije, broj plodnih životinja, broj gravidnih ženki, broj životinja koje pokazuju znake toksičnosti, opis uočenih znakova toksičnosti, uključujući vrijeme pojavljivanja, trajanje i ozbiljnost toksičnih efekata, vrste histopatoloških promjena i sve relevantne podatke o leglu. Format sažetog izvještaja u obliku tabele koji se pokazao vrlo korisnim za procjenu reproduktivnih/razvojnih efekata naveden je u Dodatku 3.

Ako je moguće, brojčane rezultate treba ocijeniti odgovarajućom i opšte prihvaćenom statističkom metodom. Za poređenje efekata unutar raspona visina doza trebala bi se izbjeći upotreba višestrukih t-testova. Statističke metode treba odabrati u fazi planiranja istraživanja. Statistička analiza anogenitalnog razmaka i zadržavanja bradavica trebala bi se bazirati na podacima za pojedinačne mladunce, uzimajući u obzir efekte na leglo. Ako je primjereno, jedinicu analize čini leglo. Statistička analiza tjelesne mase mladunaca trebala bi se bazirati na podacima za pojedinačne mladunce, uzimajući u obzir veličinu legla. Zbog ograničenih dimenzija istraživanja, statističke analize kojima se nastoji ispitati važnost rezultata imaju ograničenu vrijednost za mnoge krajnje tačke, naročito za reproduktivne krajnje tačke. Nisu primjerene neke od često korištenih metoda, naročito parametrijska ispitivanja za mjerenje središnje tendencije. Ako se upotrebljavaju statističke analize, odabrana metoda trebala bi biti primjerena za distribuciju varijable koja se ispituje te je treba odabrati prije početka istraživanja.

Ocjena rezultata

Nalaze ovog istraživanja toksičnosti treba ocijeniti s obzirom na uočene efekte, nekropsiju i mikroskopske nalaze. Evaluacija treba obuhvatiti odnos između doze ispitivane hemikalije i prisutnosti ili izostanka, učestalosti i ozbiljnosti abnormalnosti, uključujući makrolezije, identifikovane ciljne organe, neplodnost, kliničke abnormalnosti, promjene sposobnosti reprodukcije i legla, promjene tjelesne mase, efekte na smrtnost i sve ostale toksične efekte.

Zbog kratkog perioda tretiranja mužjaka, uz podatke o plodnosti trebalo bi razmotriti i histopatologiju testisa i sjemenih kanalića pri procjeni efekata na reprodukciju mužjaka. Kao pomoć u tumačenju istraživanja može biti korisna i upotreba podataka o prošlim kontrolama u pogledu reprodukcije/razvoja (npr. za veličinu legla, anogenitalni razmak, zadržavanje bradavica, nivoa seruma T4), ako su dostupni.

Radi kontrole kvaliteta predlaže se prikupljanje podataka o prošlim kontrolama te izračunavanje koeficijenata varijacije za brojčane podatke, posebno za parametre povezane s otkrivanjem endokrinih distruptora. Ti se podaci mogu upotrijebiti za upoređivanje kad se ocjenjuju konkretna istraživanja.

Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju trebalo bi da sadrži sljedeće informacije:

Ispitivana hemikalija:

— izvor, broj serije, rok upotrebe, ako su dostupni,
— stabilnost ispitivane hemikalije, ako je poznata.

Supstanca s jednim sastojkom:

— fizički izgled, rastvorljivost u vodi i druga relevantna fizičko-hemijska svojstva,
— hemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.

Supstancas više sastojaka, UVCB supstance i smješe:

— opis (koliko je to moguće) hemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizičko-hemijskih svojstava sastojaka.

Nosač (po potrebi):

— obrazloženje izbora nosača ako nije riječ o vodi.

Ispitne životinje:

— korištena vrsta/soj,
— broj, dob i pol životinja,
— porijeklo, uslovi smještaja, prehrana itd.,
— pojedinačna tjelesna masa životinja na početku ispitivanja,
— obrazloženje izbora vrste ako se ne radi o glodarima.

Ispitni uslovi:

— obrazloženje izbora visine doze,
— pojedinosti o formulaciji ispitivane hemikalije/pripremanju hrane, postignuta koncentracija, stabilnost i homogenost smješa,
— pojedinosti o primjeni ispitivane hemikalije,
— preračunavanje koncentracije ispitivane hemikalije u hrani/vodi za piće (ppm) u stvarnu dozu (mg/kg tjelesne težine/dan), prema potrebi,
— pojedinosti o kvalitetu hrane i vode,
— detaljan opis postupka nasumičnog izbora mladunaca za izdvajanje ako se ono obavlja.

Rezultati:

— tjelesna masa/promjene tjelesne mase,
— unos hrane i unos vode, po potrebi,
— podaci o toksičnom odgovoru po polu i dozi, uključujući plodnost, gestaciju i sve druge znake toksičnosti,
— dužina gestacije, toksični ili drugi efekti na reprodukciju, potomstvo, rast nakon rođenja itd.,
— vrsta, stepen i trajanje uočenih kliničkih promjena (reverzibilne ili ireverzibilne),
— ocjena osjetilne aktivnosti, jakosti stiska i motorne aktivnosti,
— hematološka ispitivanja s odgovarajućim referentnim vrijednostima,
— klinička biohemijska ispitivanja s odgovarajućim referentnim vrijednostima,
— broj odraslih ženki s normalnim ili abnormalnim ciklusom estrusa i trajanje ciklusa,
— broj živorođenih i gubitaka nakon implantacije,
— broj mladunaca s jako izraženim abnormalnostima, ukupna procjena spoljašnjih genitalija, broj patuljastih životinja,
— vrijeme smrti tokom istraživanja ili je li životinja preživjela do kraja,
— broj implantacija, veličina i masa legla u trenutku evidentiranja,
— podaci o tjelesnoj masi mladunaca,
— anogenitalni razmak svih mladunaca (i tjelesna masa na dan mjerenja anogenitalnog razmaka),
— zadržavanje bradavica kod mužjaka mladunaca,
— nivoa hormona štitne žlijezde, u mladunaca starih 13 dana i odraslih mužjaka (te u ženki (majki) i mladunaca starih 4 dana ako se mjeri),
— tjelesna masa u trenutku usmrćenja i podaci o masi organa za roditeljske životinje,
— nalazi nekropsije,
— iscrpan opis histopatoloških nalaza,
— podaci o apsorpciji (ako su dostupni),
— statistička obrada rezultata, prema potrebi.

Rasprava o rezultatima

Zaključci

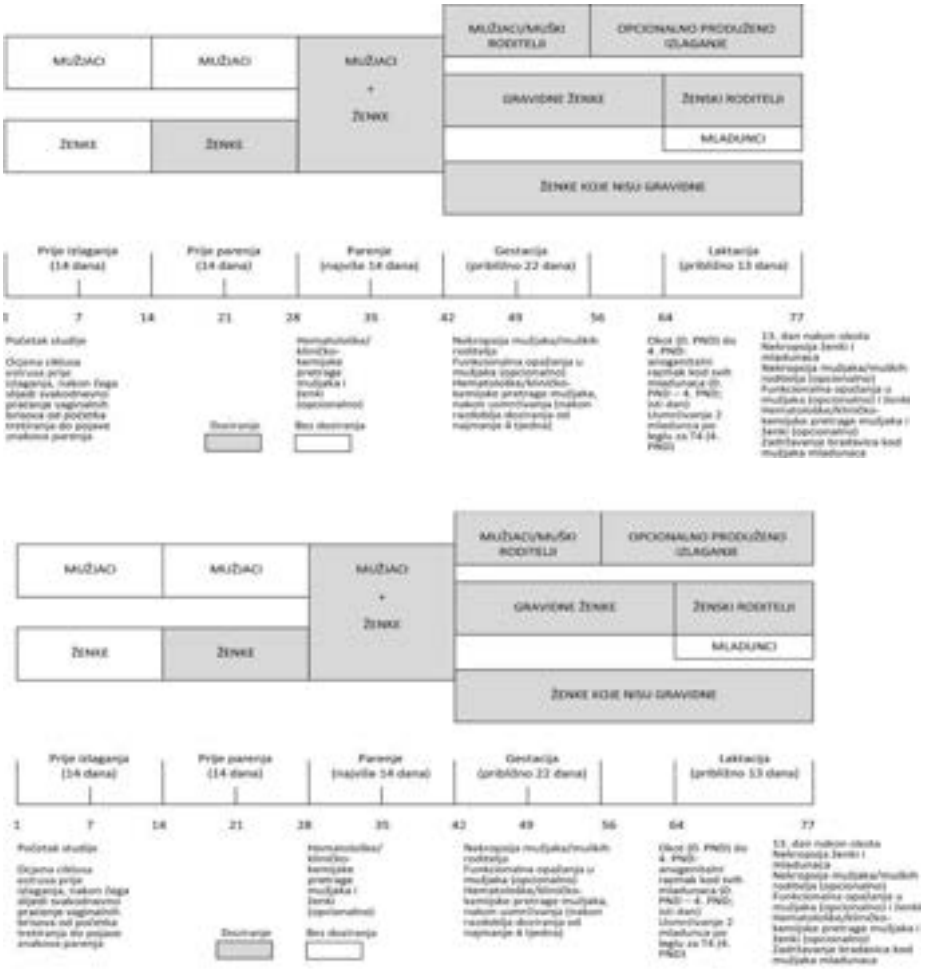
Tumačenje rezultata

U ovom će se istraživanju pružiti procjene reproduktivne/razvojne toksičnosti povezane s primjenom ponovljenih doza. Tačnije, s obzirom na to da je naglasak stavljen i na opštu toksičnost i na krajnje tačke reproduktivne/razvojne toksičnosti, rezultati istraživanja omogućiti će razlikovanje reproduktivnih/razvojnih efekata koji se javljaju kad nema opšte toksičnosti i onih

koji se javljaju samo kod doza koje su toksične i za roditeljske životinje. Mogla bi dati naznaku u vezi s tim treba li sprovesti dalja ispitivanjima i dati smjernice za osmišljavanje naknadnih istraživanja. Za pomoć pri tumačenju rezultata u pogledu reprodukcije i razvoja treba pogledati Smjernicu OECD-a 43. U Smjernici OECD-a 106 o histološkoj procjeni endokrinih i reproduktivnih ispitivanja na glodarima navedene su informacije o pripremi i procjeni (endokrinih) organa i vaginalnih briseva koje mogu biti korisne za ovu ispitnu metodu.

Dodatak 2.

DIJAGRAM PLANA EKSPERIMENTA IZ KOJEG SE VIDI MAKSIMALNO TRAJANJE STUDIJE, NA OSNOVU CIJELOG 14-DNEVNOG PERIODA PARENJA



Dodatak 3.

SAŽETI IZVJEŠTAJ U OBLIKU TABELE O EFEKTIMA NA REPRODUKCIJU/RAZVOJ

ZAPAŽANJA	VRIJEDNOSTI				
Doziranje (jedinice)…….	0 (kontrola)	…	…	…	…

Formirani parovi (N)					
Ciklus estrusa (barem srednja vrijednost dužine i učestalost nepravilnih ciklusa)					
Ženke koje pokazuju znake kopulacije (N)					
Ženke koje su postale gravidne (N)					
Dani začeća 1–5 (N)					
Dani začeća 6–…(N)					
Graviditet ≤ 21 dan (N)					
Graviditet = 22 dana (N)					
Graviditet ≥ 23 dana (N)					
Ženke (majke) sa živim mladuncima (N)					
Ženke (majke) sa živim mladuncima 4. dana nakon okota (N)					
Implantati po ženki (majci) (srednja vrijednost)					
Živi mladunci po ženki (majci) pri okotu (srednja vrijednost)					
Živi mladunci po ženki (majci) 4. dana (srednja vrijednost)					
Odnos polova (m/ž) pri okotu (srednja vrijednost)					
Odnos polova (m/ž) 4. dana (srednja vrijednost)					
Masa legla pri okotu (srednja vrijednost)					
Masa legla 4. dana (srednja vrijednost)					
Masa mladunaca pri okotu (srednja vrijednost)					
Masa mladunaca u trenutku mjerenja anogenitalnog razmaka					

(srednja vrijednost za mužjake i srednja vrijednost za ženke)					
Anogenitalni razmak na isti postnatalni dan, dan okota – 4. dan (srednja vrijednost za mužjake i ženke, naznaka postnatalnog dana)					
Masa mladunaca 4. dana (srednja vrijednost)					
Masa mladunaca 13. dana (srednja vrijednost)					
Zadržavanje bradavica kod mužjaka mladunaca 13. dana (srednja vrijednost)					
ABNORMALNI MLADUNCI					
Ženke (majke) s 0					
Ženke (majke) s 1					
Ženke (majke) s ≥ 2					
GUBITAK POTOMAKA					
Prenatalno (implantacije umanjene za broj živorođenih)					
Ženke s 0					
Ženke s 1					
Ženke s 2					
Ženke s ≥ 3					
Postnatalno (broj živorođenih umanjen za broj živih mladunaca 13. dana nakon okota)					
Ženke s 0					
Ženke s 1					
Ženke s 2					

Ženke s ≥ 3					

B.65. *IN VITRO* ISPITNA METODA ZA NAGRIZANJE KOŽE S MEMBRANSKOM BARIJEROM

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 435 (TG) (2015.). Nagrizanje kože odnosi se na izazivanje ireverzibilnog oštećenja kože koje se manifestuje kao vidljiva nekroza koja kroz epidermu prodire u dermu nakon primjene ispitivane hemikalije, kako je utvrđeno Globalno usklađenim sistemom klasifikovanja i označivanja hemikalija (GHS) Ujedinjenih naroda (UN). Ova ispitna metoda, ekvivalentna ažuriranoj Smjernici OECD-a za ispitivanje 435, pruža in vitro ispitnu metodu za nagrizanje kože s membranskom barijerom koja se može upotrebljavati za identifikaciju nagrizajućih hemikalija. U ispitnoj metodi upotrebljava se vještačka membrana koja je osmišljena tako da reaguju na nagrizajuće hemikalije na sličan način kao i životinjska koža in situ.

Nagrizajuće djelovanje na kožu tradicionalno se procjenjivalo primjenom ispitivane hemikalije na kožu živih životinja i procjenom odnosa oštećenja tkiva nakon određenog vremenskog perioda. Uz sadašnju ispitnu metodu donesen je niz drugih in vitro ispitnih metoda kao alternativa standardnom in vivo postupku na koži kunića (poglavlje B.4. ovog Priloga; ekvivalentan Smjernici OECD-a za ispitivanje 404) koji se upotrebljava za identifikaciju nagrizajućih hemikalija. U strategiji ispitivanja i ocjenjivanja UN GHS-a za procjenu i klasifikovanje nagrizanja kože te u Smjernicama OECD-a o integrisanim pristupima ispitivanju i procjeni (IATA) za nadraživanje/nagrizanje kože preporučuje se upotreba validiranih i prihvaćenih in vitro ispitnih metoda u okviru modula 3. i 4. U IATA-i je opisano nekoliko modula u kojima se grupišu izvori informacija i alati za analizu te i. pružaju se smjernice o tome kako integrisati i upotrijebiti postojeće podatke o ispitivanju i podatke koji se dobijaju bez ispitivanja za procjenu potencijala hemikalija da uzrokuju nadraživanje i nagrizanje kože te ii. predlaže se pristup kad je potrebno dalje ispitivanje, među ostalim i ako se dobiju negativni rezultati. U tom modularnom pristupu pozitivni rezultati iz in vitro ispitnih metoda mogu se upotrebljavati za klasifikovanje hemikalije kao nagrizajuće bez potrebe za ispitivanjem na životinjama, čime se smanjuje i poboljšava upotreba životinja te se izbjegavaju bol i patnja do kojih može doći kada bi se u tu svrhu upotrebljavale životinje.

Dovršene su validacione studije za in vitro model membranske barijere koji je komercijalno dostupan pod nazivom Corrositex® i koji pokazuje ukupnu tačnost predviđanja nagrizanja kože od 79 % (128/163), osjetljivost od 85 % (76/89) i specifičnost od 70 % (52/74) za bazu podataka od 163 supstance i smješe. Na osnovu njene potvrđene valjanosti, ova je validirana referentna metoda (VRM) preporučena za upotrebu kao dio stupnjevane strategije ispitivanja za procjenu potencijalne opasnosti hemikalija da uzrokuju nagrizanje kože. Prije nego što se in vitro model membranske barijere za nagrizanje kože može upotrijebiti u regulatorne svrhe, trebalo bi utvrditi njegovu pouzdanost, relevantnost (tačnost) i ograničenja za njegovu predloženu upotrebu kako bi se osigurala njegova sličnost s validiranom referentnom metodom, u skladu s unaprijed utvrđenim zahtjevima izvođenja . OECD-ovo uzajamno prihvatanje podataka garantovati će se samo nakon što se svaka predložena nova ili ažurirana metoda koja je u skladu sa zahtjevima izvođenja pregleda i uključi u ekvivalentnu smjernicu OECD-a za ispitivanje. Smjernica OECD-a za ispitivanje 435 trenutno obuhvata samo jednu in vitro metodu i ovu ispitnu metodu – komercijalno dostupan model Corrositex®.

Ostale ispitne metode za ispitivanje nagrizanja kože baziraju se na upotrebi rekonstituisane ljudske kože (Smjernica OECD-a za ispitivanje 431) i izolirane kože pacova (Smjernica OECD-a za ispitivanje 430). Ova smjernica za ispitivanje omogućuje i dalje klasifikovanje nagrizajućih hemikalija u tri potkategorije nagrizanja prema UN GHS-u i tri ambalažne grupe UN-a za prevoz u pogledu opasnosti od nagrizanja. Ova Smjernica za ispitivanje izvorno je donesena 2006. i ažurirana je 2015. kako bi se odnosila na smjernice o IATA-i i kako bi se ažurirao lista supstanci za dokazivanje tehničke osposobljenosti.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

Ispitivanje opisano u ovoj ispitnoj metodi omogućuje identifikaciju nagrizajućih ispitivanih hemikalija i dalje klasifikovanje nagrizajućih ispitivanih hemikalija u skladu s UN GHS-om/CLP-om (tabela 1.). Osim toga, ta se ispitna metoda može upotrebljavati kako bi se donijele odluke o nagrizajućem i nenagrizajućem svojstvu određenih klasa hemikalija, npr. organskih i nenorganskih kiselina, derivata kiselina i baza u svrhu ispitivanja određenih vrsta prevoza. Ova ispitna metoda opisuje opšti postupak koji je sličan validiranoj referentnoj ispitnoj metodi. Iako se ovom ispitnom metodom ne dobijaju primjerene informacije o nadraživanju kože, trebalo bi napomenuti da se ispitna metoda B.46. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 439) posebno bavi efektom nadraženosti kože na zdravlje in vitro. Za potpunu evaluaciju lokalnih efekata na kožu nakon jednostrukog dermalnog izlaganja potrebno je proučiti Smjernice OECD-a o integrisanim pristupima ispitivanju i procjeni.

Tabela 1. Kategorija „nagrizajuće za kožu" s potkategorijama prema UN GHS-u

Kategorija nagrizajućeg djelovanja (1. kategorija) (za tijela koja se ne koriste potkategorijama)	Potkategorije potencijalno nagrizajućeg djelovanja	Nagrizajuće kod ≥ 1 od 3 životinje	
		Izloženost	Uočavanje
Nagrizajuće	Potkategorija nagrizajućeg djelovanja 1.A	≤ 3 minute	≤ 1 sat
	Potkategorija nagrizajućeg djelovanja 1.B	> 3 minute / ≤ 1 sat	≤ 14 dana
	Potkategorija nagrizajućeg djelovanja 1.C	> 1 sat / ≤ 4 sata	≤ 14 dana

Ograničenje validirane referentne metode je to što mnoge hemikalije koje ne djeluju nagrizajuće i neke hemikalije koje djeluju nagrizajuće možda neće ispuniti uslove za ispitivanje na osnovu rezultata početnog ispitivanja kompatibilnosti. Vodenog rastvora hemikalija čija je pH-vrijednost u rasponu od 4,5 do 8,5 često ne ispunjavaju uslove za ispitivanje; međutim, 85 % ispitanih hemikalija u tom pH-rasponu nije djelovalo nagrizajuće u ispitivanjima na životinjama. In vitro metoda s membranskom barijerom može se upotrebljavati za ispitivanje čvrstih supstanci (rastvoljivih ili nerastvoljivih u vodi), tečnosti (vodenih i bezvodnih) i emulzija. Međutim,

ispitivane hemikalije koje ne uzrokuju uočljivu promjenu u ispitivanju kompatibilnosti (tj. promjenu boje u detekcijskom sistemu za hemikalije (CDS) validirane referentne ispitne metode) ne mogu se ispitati primjenom metode s membranskom barijerom i trebale bi se ispitati drugim ispitnim metodama.

NAČELO ISPITIVANJA

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

Ispitni sistem sastoji se od dva sastojka: sintetičke makromolekularne biološke barijere i detekcijskog sistema za hemikalije; u ovoj se ispitnoj metodi detekcionim sistemom za hemikalije otkriva oštećenje membranske barijere koje uzrokuju nagrizajuće ispitivane hemikalije nakon primjene ispitivane hemikalije na površinu sintetičke makromolekularne membranske barijere, uz pretpostavku da se to odvija istim mehanizmima nagrizanja koji djeluju i na živu kožu.

Prodiranje kroz membransku barijeru može se mjeriti različitim pokolonama ili detekcionim sistemima za hemikalije, uključujući promjenu boje pH-indikatorske boje ili nekog drugog svojstva rastvora indikatora ispod barijere.

Trebalo bi se utvrditi da je membranska barijera valjana, tj. relevantna i pouzdana za predviđenu upotrebu. To uključuje i osiguravanje dosljednosti različitih proizvoda u pogledu svojstava barijere, npr. sposobnost očuvanja barijere u dodiru s nenagrizajućim hemikalijama, sposobnost klasifikovanja nagrizajućih svojstava hemikalija prema različitim potkategorijama nagrizajućeg djelovanja prema UN GHS-u . Odluka o klasifikovanju zasniva se na vremenu koje je hemikaliji potrebno da prodre kroz membransku barijeru do rastvora indikatora.

Prije rutinske upotrebe in vitro metode s membranskom barijerom koja je u skladu s ovom ispitnom metodom laboratoriji bi trebali dokazati tehničku osposobljenost pravilnim utvrđivanjem kategorije dvanaest supstanci za dokazivanje osposobljenosti koje su preporučene u tabeli 2. U slučajevima u kojima nije dostupna navedena supstanca ili ako je to opravdano, može se upotrijebiti druga supstanca za koju su dostupni primjereni referentni in vivo i in vitro podaci (npr. s lista referentnih hemikalija pod uslovom da se primjenjuju isti kriterijumi za izbor kako su opisani u tabeli 1.

Tabela 1. **Supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti**

Supstanca	**CAS br.**	**Hemijski klasa**	***In vivo*UN GHS-u potkategorija prema**	***In vitro* potkategorija prema UN GHS-u**
Borov trifluorid dihidrat	13319-75-0	Neorganske kiseline	1.A	1.A
Azotna kiselina	7697-37-2	Neorganske kiseline	1.A	1.A
Fosforov pentahlorid	10026-13-8	Prekursori	1.A	1.A

		neorganskih kiselina		
Valeril hlorid	638-29-9	Hloridi kiselina	1.B	1.B
Natrijum hidroksid	1310-73-2	Neorganske baze	1.B	1.B
1-(2-aminoetil) piperazin	140-31-8	Alifatski amini	1.B	1.B
Benzensulfonil hlorid	98-09-9	Hloridi kiselina	1.C	1.C
N,*N*-dimetil-benzilamin	103-83-3	Anilini	1.C	1.C
Tetraetilenpentamin	112-57-2	Alifatski amini	1.C	1.C
Eugenol	97-53-0	Fenoli	NC	NC
Nonil akrilat	2664-55-3	Akrilati/metakrilati	NC	NC
Natrijum bikarbonat	144-55-8	Neorganske soli	NC	NC

POSTUPAK

Opisuju sastojci i postupci ispitne metode s vještačkom membranskom barijerom za procjenu nagrizajućeg djelovanja na osnovu važeće validirane referentne metode, tj. komercijalno dostupnog modela Corrositex®. Membranska barijera i rastvora za utvrđivanje kompatibilnosti/rastvora indikatora i rastvora za klasifikovanje mogu se izraditi, pripremiti ili nabaviti iz komercijalnih izvora, kao što je slučaj s validiranom referentnom metodom – Corrositex®. Dostupan je uzorak protokola ispitne metode za validiranu referentnu ispitnu metodu. Ispitivanje bi se trebalo sprovoditi na temperaturi okoline (17–25 °C) i sastojci bi trebale biti u skladu sa sljedećim uslovima.

Ispitivanje kompatibilnosti ispitivane hemikalije

Prije primjene ispitivanja s membranskom barijerom sprovodi se ispitivanje kompatibilnosti kako bi se utvrdilo može li detekcioni sistem za hemikalije otkriti ispitivanu hemikaliju. Ako detekcioni sistem za hemikalije ne otkrije hemikaliju, ispitna metoda s membranskom barijerom nije primjerena za procjenu potencijalnog nagrizajućeg djelovanja te ispitivane hemikalije i trebalo bi

upotrijebiti drugu ispitnu metodu. Detekcioni sistem za hemikalije i uslovi izlaganja koji se upotrebljavaju za ispitivanje kompatibilnosti trebali bi odražavati izlaganje u kasnijem ispitivanju s membranskom barijerom.

Test kategorizacije ispitivane hemikalije s obzirom na vremenski okvir

Ako je primjereno za ispitnu metodu, ispitivanu hemikaliju koja je u ispitivanju kompatibilnosti ispunila uslove treba podvrgnuti testu kategorizacije s obzirom na vremenski okvir, tj. testu izbora kojim se razlikuju slabe i jake kiseline i baze. Na primjer, u validiranoj referentnoj metodi test kategorizacije s obzirom na vremenski okvir služi za određivanje koji bi se od dva vremenska okvira trebao upotrijebiti na osnovu toga je li otkrivena znatna kisela ili alkalna rezerva. Za utvrđivanje nagrizajućeg djelovanja i potkategorije nagrizajućeg djelovanja na kožu prema UN GHS-u trebalo bi upotrijebiti dva različita vremenska okvira, na osnovu kisele ili alkalne rezerve ispitivane hemikalije.

SASTOJCI ISPITNE METODE S MEMBRANSKOM BARIJEROM

Membranska barijera

Membranska barijera ima dvije sastojci: proteinski makromolekularni vodeni gel i propusnu potpornu membranu. Proteinski gel trebao bi biti nepropustan za tečnosti i čvrste supstance, ali trebao bi moći korodirati i postati propustan. Potpuno izrađenu membransku barijeru trebalo bi čuvati u unaprijed utvrđenim uslovima za koje se pokazalo da onemogućuju pogoršanje kvalitete gela, npr. sušenje, rast mikroba, podnosanje, pucanje, koje bi narušilo njegovu efektivnost. Treba utvrditi prihvatljivo vrijeme skladištenja te se smješe membranske barijere ne koriste nakon tog perioda.

Propusna potporna membrana pruža mehaničku potporu proteinskom gelu tokom procesa geliranja i izlaganja ispitivanoj hemikaliji. Potporna membrana trebala bi spriječiti ulegnuće ili podnosanje gela i biti propusna za sve ispitivane hemikalije.

Proteinski gel, koji se sastoji od proteina, npr. keratina, kolagena, ili mješavine proteina, čini matricu gela i služi kao cilj za ispitivanu hemikaliju. Proteinski materijal stavlja se na površinu potporne membrane i ostavlja se da se stvori gel prije nego što se membranska barijera stavi na rastvor indikatora. Proteinski gel bi trebao biti jednake debljine i gustine te ne bi trebao da sadrži mjehuriće zraka ili nedostatke koji bi mogli uticati na njegov funkcionalni integritet.

Detekcioni sistem za hemikalije (CDS)

Indikator rastvora se upotrebljavala za ispitivanje kompatibilnosti. Treba se upotrebljavati pH-indikatorskom bojom ili kombinacijom boja, npr. krezol crvenilom i metiloranžom, koja će promijeniti boju u prisutnosti ispitivane hemikalije. Sistem mjerenja može biti vizualni ili elektronski. Detekcioni sistemi razvijeni za otkrivanje prolazaka ispitivane hemikalije kroz membransku barijeru treba procijeniti u pogledu relevantnosti i pouzdanosti kako bi se utvrdio raspon hemikalija koje se mogu otkriti i kvantitativna ograničenja otkrivanja.

SPROVOĐENJE TESTA

Sastavljanje sastavnica ispitne metode

Membranska barijera postavlja se u bočicu (ili cijev) koja sadrži rastvor indikatora tako da je potporna membrana potpuno u kontaktu s rastvorinom indikatora i da nisu prisutni mjehurići zraka. Treba paziti da se osigura integritet barijere.

Primjena ispitivane hemikalije

Primjerena količina ispitivane hemikalije, npr. 500 µl tečnosti ili 500 mg čvrste supstance fino usitnjene u prah (7.) pažljivo se u slojevima nanosi na gornju površinu membranske barijere i ravnodnosno raspoređuje. Za svaku ispitivanu hemikaliju i njene odgovarajuće kontrole priprema se odgovarajući broj ponovljenih uzoraka, npr. četiri. Evidentira se vrijeme primjene ispitivane hemikalije na membransku barijeru. Kako bi se osiguralo da se kratka vremena nagrizanja tačno evidentiraju, vremena primjene ispitivane hemikalije na ponovljene bočice postupno se mijenjaju.

Mjerenje prodiranja kroz membransku barijeru

Svaka se bočica primjereno prati i evidentira se vrijeme prve promjene rastvora indikatora, tj. prodiranja kroz barijeru, te se utvrđuje vrijeme koje je proteklo od primjene do prodiranja kroz membransku barijeru.

Kontrole

Kod ispitivanja u kojima se s ispitivanom hemikalijom upotrebljava nosač ili rastvarač, nosač ili rastvarač treba biti kompatibilno sa sistemom membranske barijere, tj. ne smije izmijeniti integritet sistema membranske barijere ni nagrizajuće djelovanje ispitivane hemikalije. Ako je primjenjivo, kontrolu rastvarača (ili nosača) treba ispitati istovremeno kad i ispitivanu hemikaliju kako bi se dokazala kompatibilnost rastvarača sa sistemom membranske barijere.
Pozitivnu (nagrizajuću) kontrolu sa srednje nagrizajućom aktivnosti, npr. 110 ± 15 mg natrijuma hidroksida (potkategorija 1.B nagrizajućeg djelovanja prema UN GHS-u) (7.) treba ispitati istovremeno kad i ispitivanu hemikaliju kako bi se procijenilo funkcioniše li ispitni sistem zadovoljavajuće. Za procjenu relativnog potencijala za nagrizajuće djelovanje nagrizajuće ispitivane hemikalije može biti korisna druga pozitivna kontrola iz istog hemijskog klasaa kao ispitivana hemikalija. Treba odabrati pozitivnu kontrolu ili kontrole srednje nagrizajućeg djelovanja (npr. potkategorija 1.B prema UN GHS-u) kako bi se otkrile promjene u vremenu prodiranja koje mogu biti neprihvatljivo duže ili kraće od utvrđene referentne vrijednosti, što ukazuje na to da ispitni sistem ne funkcioniše pravilno. Korisnost hemikalija koje djeluju isključivo nagrizajuće (potkategorija 1.A prema UN GHS-u) ili koje ne djeluju nagrizajuće u tu je svrhu ograničena. Nagrizajuća hemikalija iz potkategorije 1.B prema UN GHS-u omogućila bi otkrivanje predugog ili prekratkog vremena prodiranja. Hemikalija slabo nagrizajućeg djelovanja (potkategorija 1.C prema UN GHS-u) mogla bi se upotrijebiti kao pozitivna kontrola za mjerenje sposobnosti ispitne metode da dosljedno razlikuje hemikalije koje imaju slabo nagrizajuće djelovanje od hemikalija koje ne djeluju nagrizajuće. Neu zavisnosti o tome koji se pristup primjenjuje, treba razviti prihvatljivi raspon odgovora pozitivne kontrole na osnovu prošleg raspona vremena prodiranja za primijenjenu pozitivnu kontrolu ili kontrole, kao što je srednja vrijednost ±2–3 standardne devijacije. U svakoj studiji treba utvrditi tačno vrijeme prodiranja za pozitivnu kontrolu kako bi se mogle otkriti devijacije koje su izvan prihvatljivog raspona.
Negativnu (nenagrizajuću) kontrolu, npr. 10-postotnu limunsku kiselinu, 6-postotnu propionsku kiselinu (7.) isto bi trebalo ispitati istovremeno kad i ispitivanu hemikaliju kao još jednu mjeru kontrole kvalitete za dokazivanje funkcionalnog integriteta membranske barijere.

Kriterijumi prihvatljivosti istraživanja

U skladu s utvrđenim vremenskim parametrima za svaku potkategoriju nagrizajućeg djelovanja prema UN GHS-u, vrijeme (u minutama) koje protekne od primjene ispitivane hemikalije na membransku barijeru do prodiranja kroz barijeru služi za predviđanje nagrizajućeg djelovanja ispitivane hemikalije. Da bi se istraživanje smatralo prihvatljivim, istodobna pozitivna kontrola trebala bi pokazati očekivano vrijeme reakcije prodiranja (npr. vrijeme prodiranja od osam do 16 minuta za natrijum hidroksid ako se upotrebljava kao pozitivna kontrola), istodobna negativna kontrola ne bi trebala djelovati nagrizajuće, a ako je uključena, istodobna kontrola s rastvaračem ne bi trebala djelovati nagrizajuće ni izmijeniti potencijal za nagrizajuće djelovanje ispitivane hemikalije. Laboratoriji bi prije rutinske primjene metode koja ispunjava zahtjeve ove ispitne metode trebali dokazati tehničku osposobljenost primjenom 12 supstanci preporučenih u tabeli 2. Za nove *me-too* metode koje se razviju na osnovu ove ispitne metode i koje su strukturno i funkcionalno slične validiranoj referentnoj metodi (14.) trebaju se upotrebljavati unaprijed definišeni zahtjevi izvođenja kako bi se dokazala pouzdanost i tačnost nove metode prije njene primjene za ispitivanje u regulatorne svrhe (10.).

Tumačenje rezultata i klasifikovanje ispitivanih hemikalija prema nagrizajućem djelovanju

Vrijeme (u minutama) koje protekne od primjene ispitivane hemikalije na membransku barijeru do prodiranja kroz barijeru služi za klasifikovanje ispitivane hemikalije u potkategorije nagrizajućeg djelovanja prema UN GHS-u (1.) i, ako je primjenjivo, u ambalažne grupe UN-a (16.). Granične vrijednosti vremena za svaku od tri potkategorije nagrizajućeg djelovanja utvrđuju se za svaku predloženu ispitnu metodu. U konačnim odlukama o graničnim vremenima treba uzeti u obzir potrebu da se smanji preblago klasifikovanje opasnosti od nagrizajućeg djelovanja (tj. lažno negativni rezultati). U ovoj smjernici za ispitivanje trebala bi se koristi granična vremena za Corrositex®, kako su navedena u tabeli 3., jer je to jedina ispitna metoda koja je trenutno obuhvaćena ovom smjernicom za ispitivanje (7.).

Tabela 3. **Model predviđanja Corrositex®**

Srednje vrijeme prodiranja (min.)		**Predviđanje prema sistemu UN GHS**
Ispitivana hemikalija 1. kategorije (utvrđeno testom kategorizacije, koji je dio metode)	**Ispitivana hemikalija 2. kategorije (utvrđeno testom kategorizacije, koji je dio metode)**	
0–3 min	0–3 min	Nagrizajuće, neobavezna potkategorija 1.A
> 3 do 60 min	> 3 do 30 min	Nagrizajuće, neobavezna potkategorija 1.B
> 60 do 240 min	> 30 do 60 min	Nagrizajuće, neobavezna potkategorija 1.C
> 240 min	> 60 min	Nije nagrizajuće

PODACI I IZVJEŠTAVANJE

Podaci

Vrijeme (u minutama) koje prođe od primjene ispitivane hemikalije i pozitivne kontrole ili kontrola do prodiranja barijere treba prikazati u tabličnom obliku kao podatke o pojedinačnim ponovljenim uzorcima te srednje vrijednosti ± standardna devijacija za svaki eksperiment.

Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju trebalo bi da sadrži sljedeće informacije:

Ispitivana hemikalija i kontrolne supstance:

—supstance s jednim sastojkom: hemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.,

—supstance s više sastojaka, UVCB supstanca i smjesa: opis (koliko je to moguće) hemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizičko-hemijskih svojstava sastojaka,

— fizički izgled, rastvorljivost u vodi i dodatna relevantna fizičko-hemijska svojstva,

— izvor, broj serije, ako su dostupni,

—tretiranje ispitivane hemikalije/kontrolne supstance prije ispitivanja, ako je primjenljivo (npr. grijanje, mljevenje),

—stabilnost ispitivane hemikalije, rok upotrebe ili datum za ponovnu analizu ako je poznat,

— uslovi skladištenja.

Nosač:

— identifikacijska oznaka, koncentracija (prema potrebi), upotrijebljeni volumen,

— obrazloženje za izbor nosača.

Upotrijebljeni in vitro *model membranske barijere i protokol, uključujući dokazanu tačnost i pouzdanost*

Ispitni uslovi:

— opis korištenog uređaja i postupaka pripreme,

— porijeklo i sastav korištene *in vitro* membranske barijere,

— sastav i svojstva rastvora indikatora,

— metoda detekcije,

— količina ispitivane hemikalije i kontrolne supstance,

— broj ponavljanja,

— opis i obrazloženje testa kategorizacije s obzirom na vremenski okvir,

— način primjene,

— vremena zapažanja,

— opis primijenjenih kriterijuma ocjenjivanja i klasifikovanja,

—dokazivanje osposobljenosti za izvođenje ispitne metode prije rutinske upotrebe ispitivanjem hemikalija za dokazivanje tehničke osposobljenosti.

Rezultati:

—tablični prikaz pojedinačnih neobrađenih podataka o pojedinačnim ispitnim i kontrolnim uzorcima za svako ponavljanje,

— opis drugih uočenih efekata,

—utvrđeno klasifikovanje, s upućivanjem na primijenjeni model predviđanja/kriterijume odlučivanja.

Rasprava o rezultatima

Zaključci

B.66. IN VITRO TESTOVI TRANSAKTIVACIJE SA STABILNOM TRANSFEKCIJOM ZA OTKRIVANJE AGONISTA I ANTAGONISTA ESTROGENSKIH RECEPTORA

OPŠTI UVOD

Smjernica OECD-a za ispitivanje koja se zasniva na uspješnosti

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 455 (TG). Smjernica za ispitivanje 455 je smjernica za ispitivanje koja se zasniva na uspješnosti (PBTG) i u njoj se opisuje metodologija in vitro testova transaktivacije sa stabilnom transfekcijom za otkrivanje agonista i antagonista estrogenskih receptora (ER TA testovi). Sastoji se od nekoliko mehanicistički i funkcionalno sličnih ispitnih metoda za identifikaciju agonista i antagonista estrogenskih receptora (tj. ERα i/ili ERβ) i trebala bi olakšati razvoj novih sličnih ili izmijenjenih ispitnih metoda u skladu s načelima za validaciju utvrđenima u Vodiču OECD-a o validaciji i međunarodnom prihvata novih ili ažuriranih ispitnih metoda za procjenu opasnosti. Potpuno validirane referentne ispitne metode (Dodatak 2. i Dodatak 3.) koje čine osnovu ove smjernice za ispitivanje koja se zasniva na uspješnosti uključuju:

- test TA sa stabilnom transfekcijom (STTA) uz primjenu ćelijske linije (h) ERα-HeLa-9903, i
- test VM7Luc ER TA uz primjenu ćelijske linije VM7Luc4E2, koja većinom izražava receptor hERα uz određeni doprinos receptora hERββ.

Za razvoj i validaciju sličnih testova za iste konačne efekte opasnosti dostupni su zahtjevi izvođenja te bi ih trebalo upotrebljavati. Oni omogućuju pravovremenu izmjenu PBTG-a 455 kako bi se novi slični testovi mogli dodati u ažurirani PBTG; međutim, slični testovi dodat će se samo nakon što ih OECD pregleda i složi se da su ispunjeni zahtjevi izvođenja. Testovi uključeni u Smjernicu za ispitivanje 455 mogu se upotrebljavati bez razlike za ispunjavanje zahtjeva zemalja članica OECD-a u pogledu rezultata ispitivanja transaktivacije estrogenskih receptora, uz ostvarivanje koristi od OECD-ova uzajamnog prihvaćanja podataka.

Kontekst i načela testova uključenih u ovu ispitnu metodu

OECD je 1998. pokrenuo aktivnost visokog prioriteta revizije postojećih i razvoja novih smjernica za ispitivanje za izbor i ispitivanje potencijalnih endokrino disruptivnih hemikalija. OECD-ov konceptualni okvir (CF) za ispitivanje i procjenu potencijalnih endokrino disruptivnih

hemikalija revidiran je 2012. Izvorni i revidirani konceptualni okviri uključeni su kao prilozi Vodiču OECD-a o standardiziranim ispitnim smjernicama za ocjenu hemikalija u pogledu endokrine disrupcije. Konceptualni okvir sastoji se od pet nivoa, a svaka nivoa odgovara različitoj nivou biološke složenosti. Testovi ER transaktivacije (TA) opisani u ovoj ispitnoj metodi testovi su 2. nivoa, koja uključuje „in vitro testove koji pružaju podatke o odabranim endokrinim mehanizmima/putovima". Ova je ispitna metoda namijenjena in vitro testovima transaktivacije (TA) koji su osmišljeni za identifikaciju agonista i antagonista estrogenskih receptora (ER).

Interakcija estrogena i estrogenskih receptora može uticati na transkripciju gena koje kontroliše estrogen, a to može dovesti do indukcije ili inhibicije ćelijskih procesa, među ostalim i onih koji su potrebni za proliferaciju ćelija, normalni razvoj fetusa i reproduktivnu funkciju. Poremećaj uobičajenih estrogenskih sistema mogao bi izazvati štetne efekte za normalni razvoj (ontogeneza), reproduktivno zdravlje i integritet reproduktivnog sistema.

In vitro TA testovi baziraju se na direktnoj ili indirektnoj interakciji supstance sa specifičnim receptorom koji reguliše transkripciju proizvoda reporterskog gena. Ti se testovi u velikoj mjeri upotrebljavaju za procjenu genske ekspresije koju regulišu specifični receptori u jezgri, kao što su estrogenski receptori. Predloženi su za otkrivanje estrogenske transaktivacije koju reguliše estrogenski receptor. Postoje najmanje dvije glavne podvrste estrogenskih receptora u jezgri, α i β, a kodiraju ih posebni geni. Pojedini proteini imaju različite biološke funkcije te različitu distribuciju u tkivima i afinitete vezanja liganda. Jezgreni ERα posreduje u klasičnom estrogenskom odgovoru pa je stoga većina modela koji se trenutno razvijaju za mjerenje aktivacije ili inhibicije estrogenskog receptora specifična za ERα. Testovi se upotrebljavaju za identifikaciju hemikalija koje aktiviraju (ili inhibiraju) estrogenski receptor nakon vezivanja liganda, nakon čega se kompleks receptora i liganda veže na specifične elemente DNK odgovora i transaktivira reporterski gen, što dovodi do povećane ćelijske ekspresije markerskog proteina. U tim se testovima mogu koristiti različiti reporterski odgovori. U sistemima koji se baziraju na luciferazi, enzim luciferaza pretvara supstrat luciferina u bioluminiscentni proizvod koji se može kvantitativno izmjeriti s pomoću luminometra. Drugi primjeri uobičajenih reporterskih gena uključuju fluorescentni protein i gen LacZ, koji kodira β-galaktozidazu, enzim koji može pretvoriti bezbojni supstrat X-gal (5-bromo-4-hloro-indolil-galaktopiranozid) u plavi proizvod koji se može kvantifikovati spektrofotometrom. Ti se reporterski geni mogu procijeniti brzo i jeftino primjenom komercijalno dostupnog pribora za ispitivanje.

Validacione studije STTA i VM7Luc TA testova pokazale su relevantnost i pouzdanost tih testova za predviđenu svrhu. Zahtjevi izvođenja za ER TA testove koji se baziraju na luminiscenciji u kojima se upotrebljavaju ćelijske linije mliječnih žlijezda uključene su u Evaluacioni izvještaj ICCVAM-a o ispitnoj metodi LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): in vitro test za identifikaciju agonističkog ili antagonističkog djelovanja hemikalije na ljudski estrogenski receptor. Ti su zahtjevi izvođenja izmijenjeni kako bi se mogli primjenjivati i na STTA i VM7Luc TA testove.

Područje primjene TA testova i ograničenja povezana s njima

Ovi se testovi predlažu u svrhu izbora i utvrđivanja prioriteta, ali u njima se mogu dobiti i mehanicističke informacije koje se mogu upotrijebiti u pristupu snage dokaza. Bave se transaktivacijom koju indukuje hemijsko vezivanje na estrogenske receptore u in vitro sistemu. Stoga rezultate ne bi trebalo direktno ekstrapolisati na signalizaciju kompleksa i regulaciju netaknutog endokrinog sistema in vivo.

Transaktivacija koju posreduju estrogenski receptori smatra se jednim od ključnih mehanizama endokrine disrupcije (ED), iako postoje i drugi mehanizmi preko kojih može doći do endokrine disrupcije, uključujući: i. interakcije s ostalim receptorima i enzimskim sistemima u endokrinom sistemu; ii. sintezu hormona; iii. metaboličku aktivaciju i/ili inaktivaciju hormona; iv. distribuciju hormona u ciljna tkiva i v. uklanjanje hormona iz tijela. Ni jedan test u okviru ove ispitne metode ne bavi se tim načinima djelovanja.

Ova se ispitna metoda bavi sposobnošću hemikalija da aktiviraju (tj. djeluju kao agonisti) i da potiskuju (tj. djeluju kao antagonisti) transkripciju koja zavisi od estrogenskih receptora. Određene hemikalije mogu pokazati i agonističko i antagonističko djelovanje u zavisnosti od vrste ćelija i poznate su kao selektivni modulatori estrogenskih receptora (SERM-ovi). Hemikalije koje su u ovim testovima negativne mogle bi se procijeniti u testovima vezivanja na estrogenski receptor prije nego što se zaključi da se hemikalija ne veže na receptor. Osim toga, u ovim će se testovima vjerovatno dobiti samo podaci o aktivnosti polazne molekule, imajući na umu ograničene metaboličke mogućnosti in vitro ćelijskih sistema. Budući da su se u validaciji upotrebljavale samo pojedinačne supstance, nije se razmatrala primjenjivost za ispitivanje smješa. Uprkos tome, ova je ispitna metoda u teoriji primjenjiva za ispitivanje supstanci s više sastojaka, UVCB supstanci i smjesa. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na supstance s više sastojaka, UVCB supstance ili smješi radi dobijanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smješe.

U informativne svrhe u tabeli 1. navedeni su rezultati ispitivanja agonista za 34 supstance koje su ispitane u obje potpuno validirane ispitne metode opisane u ovoj ispitnoj metodi. Od tih supstanci 26 ih je klasifikovano kao definitivni agonisti estrogenskih receptora, a osam ih je bilo negativno na osnovu objavljenih izvještaja, uključujući in vitro testove za vezivanje estrogenskih receptora i transaktivaciju i/ili uterotrofni test. U tabeli 2. navedeni su rezultati ispitivanja antagonista za 15 supstanci koje su ispitane u obje potpuno validirane ispitne metode opisane u ovoj ispitnoj metodi. Od tih supstanci četiri su klasifikovane kao definitivni/pretpostavljeni antagonisti estrogenskih receptora, a deset ih je bilo negativno na osnovu objavljenih izvještaja, uključujući in vitro testove za vezivanje estrogenskih receptora i transaktivaciju. S obzirom na podatke sažete u tabelama 1. i 2., postojalo je 100-postotno slaganje obiju referentnih ispitnih metoda o klasifikovanju svih supstanci osim jedne supstance (mifepristona) u testu antagonista i svaka je supstanca tačno klasifikovana kao agonist/antagonist estrogenskih receptora ili kao negativna supstanca. Dodatne informacije o ovoj grupi hemikalija i o dodatnim hemikalijama koje su ispitane u STTA i VM7Luc ER TA testovima tokom validacijskih studija navedene su u zahtjevima izvođenja za testove ER TA, Dodatak 2.

Tabela 1. **Pregled rezultata iz STTA i VM7Luc ER TA testova za supstance ispitane u oba testa agonista i klasifikovane kao agonisti estrogenskog receptora (POZ) ili negativne supstance (NEG)**

	Supstanca	**CAS br.**	**STTA test**			**VM7Luc ER TA test**		**Izvor podataka za klasifikovanje**		
			ER TA aktiv	**Vrijednost PC_{10} (**	**Vrijednost PC_{50} (**	**ER TA aktiv**	**Vrijednost EC_{50} (**	**Ostali ER TA-**	**Vezivanje ER-a**	**Uterotrofni**

			nost	**M)**	**M)**	**nost**	**M)**	**ovi**		
1	17ß-estradiol	50-28-2	POZ	< 1,00 × 10^{-11}	< 1,00 × 10^{-11}	POZ	5,63 × 10^{-12}	POZ (227/227)	POZ	POZ
2	17α-estradiol	57-91-0	POZ	7,24 × 10^{-11}	6,44 × 10^{-10}	POZ	1,40 × 10^{-9}	POZ (11/11)	POZ	POZ
3	17α-etinilestradiol	57-63-6	POZ	< 1,00 × 10^{-11}	< 1,00 × 10^{-11}	POZ	7,31 × 10^{-12}	POZ (22/22)	POZ	POZ
4	17β-trenbolon	10161-33-8	POZ	1,78 × 10^{-8}	2,73 × 10^{-7}	POZ	4,20 × 10^{-8}	POZ (2/2)	NI	NI
5	19-nortestosteron	434-22-0	POZ	9,64 × 10^{-9}	2,71 × 10^{-7}	POZ	1,80 × 10^{-6}	POZ (4/4)	POZ	POZ
6	4-kumilfenol	599-64-4	POZ	1,49 × 10^{-7}	1,60 × 10^{-6}	POZ	3,20 × 10^{-7}	POZ (5/5)	POZ	NI
7	4-*tert*-oktilfenol	140-66-9	POZ	1,85 × 10^{-9}	7,37 × 10^{-8}	POZ	3,19 × 10^{-8}	POZ (21/24)	POZ	POZ
8	Apigenin	520-36-5	POZ	1,31 × 10^{-7}	5,71 × 10^{-7}	POZ	1,60 × 10^{-6}	POZ (26/26)	POZ	NI
9	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG (30/30)	NEG	NI
10	Bisfenol A	80-05-7	POZ	2,02 × 10^{-8}	2,94 × 10^{-7}	POZ	5,33 × 10^{-7}	POZ (65/65)	POZ	POZ
11	Bisfenol B	77-40-7	POZ	2,36 × 10^{-8}	2,11 × 10^{-7}	POZ	1,95 × 10^{-7}	POZ (6/6)	POZ	POZ

12	Benzil-butil-ftalat	85-68-7	POZ	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POZ	$1{,}98 \times 10^{-6}$	POZ (12/14)	POZ	NEG
13	Kortikosteron	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG (6/6)	NEG	NI
14	Kumestrol	479-13-0	POZ	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	POZ	$1{,}32 \times 10^{-7}$	POZ (30/30)	POZ	NI
15	Daidzein	486-66-8	POZ	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	POZ	$7{,}95 \times 10^{-7}$	POZ (39/39)	POZ	POZ
16	Dietilstilbestrol	56-53-1	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	POZ	$3{,}34 \times 10^{-11}$	POZ (42/42)	POZ	NI
17	Di-*n*-butil-ftalat	84-74-2	POZ	$4{,}09 \times 10^{-6}$		POZ	$4{,}09 \times 10^{-6}$	POZ (6/11)	POZ	NEG
18	Etil paraben	120-47-8	POZ	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(bez PC_{50})	POZ	$2{,}48 \times 10^{-5}$	POZ		NI
19	Estron	53-16-7	POZ	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	POZ	$2{,}34 \times 10^{-10}$	POZ (26/28)	POZ	POZ
20	Genistein	446-72-0	POZ	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	POZ	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POZ (100/102)	POZ	POZ
21	Haloperidol	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NI
22	Kemferol	520-18-3	POZ	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	POZ	$3{,}99 \times 10^{-6}$	POZ (23/23)	POZ	NI
23	Kepon	143-50-0	POZ	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	POZ	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POZ (14/18)	POZ	NI

24	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NI
25	Linuron	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG (8/8)	NEG	NI
26	*Mezo*-heksestrol	84-16-2	POZ	< 1,00 × 10^{-11}	2,75 × 10^{-11}	POZ	1,65 × 10^{-11}	POZ (4/4)	POZ	NI
27	Metil testosteron	58-18-4	POZ	1,73 × 10^{-7}	4,11 × 10^{-6}	POZ	2,68 × 10^{-6}	POZ (5/6)	POZ	NI
28	Morin	480-16-0	POZ	5,43 × 10^{-7}	4,16 × 10^{-6}	POZ	2,37 × 10^{-6}	POZ (2/2)	POZ	NI
29	Noretinodrel	68-23-5	POZ	1,11 × 10^{-11}	1,50 × 10^{-9}	POZ	9,39 × 10^{-10}	POZ (5/5)	POZ	NI
30	*p,p*'-metoksihlor	72-43-5	POZ	1,23 × 10^{-6}	(bez PC_{50}) ([2])	POZ	1,92 × 10^{-6}	POZ (24/27)	POZ	POZ
31	Fenobarbital	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NI
32	Reserpin	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NI
33	Spironolakton	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NI
34	Testosteron	58-22-0	POZ	2,82 × 10^{-8}	9,78 × 10^{-6}	POZ	1,75 × 10^{-5}	POZ (5/10)	POZ	NI

Skraćenice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o hemijskim supstancama; M = molarno; EC_{50} = pola najveće efikasne koncentracije ispitivane supstance; NEG = negativno; POZ = pozitivno; NI = nije ispitano; PC_{10} (i PC_{50}) = koncentracija ispitivane supstance pri kojoj odgovor iznosi 10 % (ili 50 % za PC_{50}) odgovora koji indukuje pozitivna kontrola (E2, 1nM) na svakoj ploči.

Tabela 2. **Upoređivanje rezultata iz STTA i VM7Luc ER TA testova za supstance ispitane u oba testa antagonista i klasifikovane kao antagonisti estrogenskog receptora (POZ) ili negativne supstance (NEG)**

	Supstanca	CAS br.	ER STTA test		VM7Luc ER TA test Mogući efekti testa		ER STTA	ICCVAM-ovo sporazumno klasifikovanje Hemijski klasa	prema MeSH-u	Klasa proizvoda
			ER TA aktivnost	Vrijednost IC_{50} (M)	ER TA aktivnost	Vrijednost IC_{50} (M)				
1	4-hidroksitamoksifen	68047-06-3	POZ	$3,97 \times 10^{-9}$	POZ	$2,08 \times 10^{-7}$	umjereno POZ	POZ	Ugljovodonik (ciklički)	Farmaceutski proizvod
2	Dibenzo[a,h]antracen	53-70-3	POZ	Bez IC_{50}	POZ	Bez IC_{50}	POZ	PP	Policiklički jedinjenje	Laboratorijska hemikalija, prirodni proizvod
3	Mifepriston	84371-65-3	POZ	$5,61 \times 10^{-6}$	NEG	—	Blago POZ	NEG	Steroid	Farmaceutski proizvod
4	Raloksifen HCl	82640-04-8	POZ	$7,86 \times 10^{-10}$	POZ	$1,19 \times 10^{-9}$	umjereno POZ	POZ	Ugljovodonik (ciklički)	Farmaceutski proizvod
5	Tamoksifen	10540-29-1	POZ	$4,91 \times 10^{-7}$	POZ	$8,17 \times 10^{-7}$	POZ	POZ	Ugljovodonik (ciklički)	Farmaceutski proizvod
6	17β-estradiol	50-28-2	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterina

										rski proizvod
7	Apigenin	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Heterociklično jedinjenje	Boja, prirodni proizvod, farmaceutski međuproizvod
8	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Heterociklično jedinjenje	Herbicid
9	Di-*n*-butil-ftalat	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Ester, ftalna kiselina	Kozmetički sastojak, industrijska hemikalija, plastifikator
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	nije ispitano	PN	Heterociklično jedinjenje, pirimidin	Fungicid
11	Flavon	525-82-6	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Flavonoid, heterociklično jedinjenje	Prirodni proizvod, farmaceutski proizvod
12	Flutamid	13311-84-	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Amid	Farmaceutski proizvo

		7								d, veterinarski proizvod
13	Genistein	446-72-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Flavonoid, heterociklično jedinjenje	Prirodni proizvod, farmaceutski proizvod
14	*p-n*-nonilfenol	104-40-5	NEG	—	NEG	—	nije ispitano	NEG	Fenol	Hemijski međuproizvod
15	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Ugljovodonik (ciklički)	Prirodni proizvod

Skraćenice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o hemijskim supstancama; M = molarno; IC_{50} = pola najveće inhibitorne koncentracije ispitivane supstance; NEG = negativno; PN = pretpostavlja se da je negativno; POZ = pozitivno; PP = pretpostavlja se da je pozitivno.

SASTOJCI ER TA TESTA

Ključnie sastojci testa

Ova ispitna metoda primjenjuje se na testove u kojima se upotrebljava model stabilno transficiranog ili endogenog receptora ERα i stabilno transficiranog reporterskog gena koje kontroliše jedan element odgovora estrogena ili više njih; međutim, mogu biti prisutni i drugi receptori kao što je ERβ. To su ključni sastojci testa

Kontrole

Treba opisati osnovu za predložene istovremene referentne norme za svaki test agonista i antagonista. Istovremene kontrole (negativna, rastvarač i pozitivna), prema potrebi, znak da test djeluje u ispitnim uslovima i osnova su za poređenje među eksperimentima; obično su dio kriterijuma prihvatljivosti za određeni eksperiment.

Standardni postupci kontrole kvalitete

Standardne postupke kontrole kvalitete treba sprovoditi kako je opisano za svaki test kako bi se osiguralo da ćelijska linija ostane stabilna tokom višestrukih pasaža, da ne sadrži mikoplazme

(tj. nije kontaminirana bakterijama) i da zadrži sposobnost da tokom vremena daje očekivane odgovore posredovane estrogenskim receptorima. Ćelijske linije nadalje bi trebalo provjeriti u pogledu tačnog identiteta i ostalih kontaminanata (npr. gljivice, kvasac i virusi).

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija

Prije ispitivanja nepoznatih hemikalija primjenom bilo kojeg od testova u okviru ove ispitne metode, svaka laboratorija treba dokazati osposobljenost za primjenu testa. Kako bi dokazao osposobljenost, svaki bi laboratorija trebala ispitati 14 supstanci za dokazivanje tehničke osposobljenosti navedenih u tabeli 3. za test agonista i 10 supstanci za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz tabele 4. za test antagonista. To ispitivanje osposobljenosti potvrditi će i osjetljivost ispitnog sistema. Lista supstanci za dokazivanje tehničke osposobljenosti podskup je referentnih supstanci koje su navedene u zahtjevima izvođenja za ER TA testove. Te su supstance komercijalno dostupne, čine klase hemikalija koji se obično povezuju s aktivnošću agonista ili antagonista estrogenskih receptora, pokazuju primjeren raspon jakosti koji se očekuje za agoniste/antagoniste estrogenskih receptora (tj. slabi do jaki) i uključuju negativne supstance. Ispitivanje supstanci za dokazivanje tehničke osposobljenosti treba se ponoviti barem dvaput na različite dane. Osposobljenost se dokazuje tačnim klasifikovanjem (pozitivno/negativno) svake supstance za dokazivanje osposobljenosti. Pri učenju testova svaki tehničar treba dvaput ponoviti ispitivanje osposobljenosti. U zavisnosti o vrsti ćelija neke se od supstanci za dokazivanje tehničke osposobljenosti mogu ponašati kao SERM-ovi i pokazivati aktivnosti i kao agonisti i antagonisti. Međutim, supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti u tabelama 3. i 4. klasifikovane su prema poznatoj dominantnoj aktivnosti koja bi se trebala koristiti za procjenu osposobljenosti.

Kako bi se dokazala uspješnost i u svrhe kontrole kvaliteta svaka bi laboratorija trebala izraditi bazu podataka prošlih agonista i antagonista s podacima o referentnoj normi (npr. 17β-estradiol i tamoksifen), pozitivnim i negativnim kontrolnim hemikalijama i kontroli s rastvaračem (npr. DMSO). Za početak, bazu podataka treba izraditi iz najmanje deset nezavisnih ciklusa ispitivanja agonista (npr. 17β-estradiola) i deset nezavisnih ciklusa ispitivanja antagonista (npr. tamoksifena). Rezultate iz budućih analiza tih referentnih normi i kontrola s rastvaračem treba dodati kako bi se povećala baza podataka i osigurala dosljednost i uspješnost laboratorije u sprovođenju biotestova tokom vremena.

Tabela 3. **Lista (14) supstanci za dokazivanje tehničke osposobljenosti za test agonista**

Br.	**Supstanca**	**CAS br.**	**Predviđeni odgovor**	**STTA test**			**VM7Luc ER TA test**		**Hemijski klasa prema MeSH-u**	**Klasa proizvoda**
				Vrijednost PC_{10} (M)	**Vrijednost PC_{50} (M)**	**Raspon ispitnih konc. (M)**	**Vrijednost EC_{50} u VM7Luc (M)**	**Najviša konc. za studiju o utvrđivanju raspona (M)**		

14	Dietilstilbestrol	56-53-1	POZ	< 1,00 × 10^{-11}	2,04 × 10^{-11}	10^{-14} – 10^{-8}	3,34 × 10^{-11}	3,73 × 10^{-4}	Ugljovodonik (ciklički)	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
12	17α-estradiol	57-91-0	POZ	4,27 × 10^{-11}	6,44 × 10^{-10}	10^{-11} – 10^{-5}	1,40 × 10^{-9}	3,67 × 10^{-3}	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
15	*Mezo*-heksestrol	84-16-2	POZ	< 1,00 × 10^{-11}	2,75 × 10^{-11}	10^{-11} – 10^{-5}	1,65 × 10^{-11}	3,70 × 10^{-3}	Ugljovodonik (ciklički), fenol	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
11	4-*tert*-oktilfenol	140-66-9	POZ	1,85 × 10^{-9}	7,37 × 10^{-8}	10^{-11} – 10^{-5}	3,19 × 10^{-8}	4,85 × 10^{-3}	Fenol	Hemijski međuproizvod
9	Genistein	446-72-0	POZ	2,24 × 10^{-9}	2,45 × 10^{-8}	10^{-11} – 10^{-5}	2,71 × 10^{-7}	3,70 × 10^{-4}	Flavonoid, heterociklično jedinjenje	Prirodni proizvod, farmaceutski proizvod
6	Bisfenol A	80-05-7	POZ	2,02 × 10^{-8}	2,94 × 10^{-7}	10^{-11} – 10^{-5}	5,33 × 10^{-7}	4,38 × 10^{-3}	Fenol	Hemijski međuproizvod
2	Kemfero	520-18-	POZ	1,36 ×	1,21 ×	10^{-11} –	3,99 ×	3,49 ×	Flavonoid,	Prirodni proizvo

	l	3		10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-3}	heterociklično jedinjenje	d
3	Benzil-butil-ftalat	85-68-7	POZ	1,14 × 10^{-6}	4,11 × 10^{-6}	10^{-11} – 10^{-5}	1,98 × 10^{-6}	3,20 × 10^{-4}	Karboksilna kiselina, ester, ftalna kiselina	Plastifikator, industrijska hemikalija
4	*p*,*p*'-metoksihlor	72-43-5	POZ	1,23 × 10^{-6}	—	10^{-11} – 10^{-5}	1,92 × 10^{-6}	2,89 × 10^{-3}	Ugljovodonik (halogenirani)	Pesticid, veterinarski proizvod
1	Etil paraben	120-47-8	POZ	5,00 × 10^{-6}	—	10^{-11} – 10^{-5}	2,48 × 10^{-5}	6,02 × 10^{-3}	Karboksilna kiselina, fenol	Farmaceutski proizvod, konzervans
17	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	—	10^{-10} – 10^{-4}	—	4,64 × 10^{-4}	Heterociklično jedinjenje	Herbicid
20	Spironolakton	52-01-7	NEG	—	—	10^{-11} – 10^{-5}	—	2,40 × 10^{-3}	Lakton, steroid	Farmaceutski proizvod
21	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	—	—	10^{-11} – 10^{-5}	—	9,41 × 10^{-5}	Heterociklično jedinjenje	Farmaceutski proizvod
22	Reserpin	50-55-5	NEG	—	—	10^{-11} – 10^{-5}	—	1,64 × 10^{-3}	Heterociklično jedinjenje, indol	Farmaceutski proizvod, veterina

										rski proizvod
Skraćenice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o hemijskim supstancama; EC_{50} = pola najveće efikasne koncentracije ispitivane supstance; NEG = negativno; POZ = pozitivno; PC_{10} (i PC_{50}) = koncentracija ispitivane supstance pri kojoj odgovor iznosi 10 % (ili 50 % za PC_{50}) odgovora koji indukuje pozitivna kontrola (E2, 1nM) na svakoj ploči.										

Tabela 4. **Lista (10) supstanci za dokazivanje tehničke osposobljenosti za test antagonista**

	Supstanca	**CAS br.**	**ER STTA test**			**VM7Luc ER TA test**			**Mogući efekti testa ER STTA**	**ICCVAM-ovo sporazumno klasifikovanje**	**Hemijski klasa prema MeSH-u**	**Klasa proizvoda**
			ER TA aktivnost	**IC_{50} (M)**	**Raspon ispitnih konc. (M)**	**ER TA aktivnost**	**IC_{50} (M)**	**Najviša konc. za studiju o utvrđivanju raspona (M)**				
1	4-hidroksitamoksifen	68047-06-3	POZ	$3,97 \times 10^{-9}$	10^{-12} – 10^{-7}	POZ	$2,08 \times 10^{-7}$	$2,58 \times 10^{-4}$	umjereno POZ	POZ	Ugljovodonik (ciklički)	Farmaceutski proizvod
2	Raloksifen HCl	82640-04-8	POZ	$7,86 \times 10^{-10}$	10^{-12} – 10^{-7}	POZ	$1,19 \times 10^{-9}$	$1,96 \times 10^{-4}$	umjereno POZ	POZ	Ugljovodonik (ciklički)	Farmaceutski proizvod
3	Tamoksifen	10540-29-1	POZ	$4,91 \times 10^{-7}$	10^{-10} – 10^{-5}	POZ	$8,17 \times 10^{-7}$	$2,69 \times 10^{-4}$	POZ	POZ	Ugljovodonik (ciklički)	Farmaceutski proizvod

4	17β-estradiol	50-28-2	NEG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	vjerovatno negativno	PN	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
5	Apigenin	520-36-5	NEG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heterociklično jedinjenje	Boja, prirodni proizvod, farmaceutski međuproizvod
6	Di-*n*-butil-ftalat	84-74-2	NEG	—	10^{-8} – 10^{-3}	NEG	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Ester, ftalna kiselina	Kozmetički sastojak, industrijska hemikalija, plastifikator
7	Flavon	525-82-6	NEG	—	10^{-8} – 10^{-3}	NEG	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	vjerovatno negativno	PN	Flavonoid, heterociklično jedinjenje	Prirodni proizvod, farmaceutski proizvod
8	Genistein	446-72-0	NEG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	vjerovatno neg	NEG	Flavonoid, heterociklič	Prirodni proizvod,

									ativno		o jedinjenje	farmaceutski proizvod
9	*p-n*-nonilfenol	104-40-5	NEG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	nije ispitano	NEG	Fenol	Hemijski međuproizvod
10	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	10^{-8} – 10^{-3}	NEG	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	vjerovatno negativno	NEG	Ugljovodonik (ciklički)	Prirodni proizvod

Skraćenice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o hemijskim supstancama; M = molarno; IC_{50} = pola najveće inhibitorne koncentracije ispitivane supstance; NEG = negativno; PN = pretpostavlja se da je negativno; POZ = pozitivno.

Kriterijumi prihvatljivosti ciklusa ispitivanja

Prihvatanje ili odbijanje ciklusa ispitivanja zasniva se na procjeni rezultata dobijanjih za referentne norme i kontrole koje se koriste za svaki eksperiment. Vrijednosti za PC50 (EC50) ili IC50 za referentne norme trebaju ispunjavati kriterijume prihvatljivosti kako su predviđeni za odabrani test i sve pozitivne/negativne kontrole trebale bi se tačno klasifikovati za svaki prihvaćeni eksperiment. Sposobnost dosljedne primjene testa treba dokazati razvojem i održavanjem baze s prošlim podacima za referentne norme i kontrole. Kao mjera obnovljivosti unutar jedne laboratorije mogu se koristiti standardne devijacije (SD) ili koeficijenti varijacije (CV) za srednje vrijednosti parametara prilagođavanja krive referentnih normi. Osim toga, treba ispuniti sljedeća načela u pogledu kriterijuma prihvatljivosti:

— potrebno je dovoljno podataka za kvantitativnu procjenu aktivacije (za test agonista) ili potiskivanja (za test antagonista) estrogenskog receptora (tj. efektivnost i jakost),
— srednja reporterska aktivnost za referentnu koncentraciju referentnog estrogena treba biti barem minimum utvrđen u testovima u odnosu na aktivnost kontrole s nosačem (rastvaračem) kako bi se osigurala primjerena osjetljivost. Za STTA i VM7Luc ER TA testove to je četiri puta više od srednje kontrole s nosačem na svakoj ploči,
— ispitane koncentracije trebale bi biti unutar područja rastvorljivosti ispitivanih hemikalija i ne bi smjele pokazivati citotoksičnost.

Analiza podataka

Za klasifikovanje pozitivnih i negativnih odgovora treba upotrebljavati utvrđeni postupak za tumačenje podataka za svaki test.

Ispunjavanje kriterijuma prihvatljivosti znači da test pravilno funkcioniše, ali time se ne osigurava da će svaki pojedinačni ciklus ispitivanja dati tačne rezultate. Ponavljanje rezultata prvog ciklusa najbolji je znak toga da su dobijeni tačni podaci. Ako se u dva ciklusa dobiju ponovljivi rezultati (npr. rezultati u oba ciklusa ispitivanja pokazuju da je ispitivana hemikalija pozitivna), ne treba sprovoditi treći ciklus.

Ako se u dva ciklusa ne dobiju ponovljivi rezultati (npr. ispitivana hemikalija pozitivna je u jednom ciklusu, a negativna u drugom) ili ako je potreban veći stepen sigurnosti u pogledu ishoda testa, treba sprovesti najmanje tri nezavisna ciklusa. U tom se slučaju klasifikovanje zasniva na dva podudarna rezultata od tri.

Opšti kriterijumi za tumačenje podataka

Trenutno ne postoji opšteprihvaćena metoda za tumačenje ER TA podataka. Međutim, i kvalitativne (npr. pozitivno/negativno) i/ili kvantitativne (npr. EC50, PC50, IC50) procjene aktivnosti posredovane estrogenskim receptorima trebaju se bazirati na empirijskim podacima i naučnoj procjeni. Ako je moguće, pozitivne rezultate treba karakterisati odnos efekta u poređenju s kontrolom nosača (rastvarača) ili referentnim estrogenom te koncentracija pri kojoj se javlja efekat (npr. EC50, PC50, RPCMax, IC50 itd.).

Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju trebalo bi da sadrži sljedeće informacije:

Test:

- korišteni test,
- kontrolna/referentna norma/ispitivana hemikalija,
- izvor, broj serije, rok upotrebe, ako su dostupni,
- stabilnost ispitivane hemikalije, ako je poznata,
- rastvorljivost i stabilnost ispitivane hemikalije u rastvraču, ako su poznate,
- izmjerene vrijednosti za pH, osmolalnost i taloženje u medijumu za uzgoj kulture u koju je dodata ispitivana hemikalija, prema potrebi.

Supstanca s jednim sastojkom:

- fizički izgled, rastvorljivost u vodi i druga relevantna fizičko-hemijska svojstva,
- hemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.

Supstance s više sastojaka, UVCB supstancei smješe:

- opis (koliko je to moguće) hemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizičko-hemijskih svojstava sastojaka.

Rastvarač/nosač:

- karakterizacija (priroda, dobavljač i serija),
- obrazloženje za izbor rastvarača/nosača,
- rastvorljivost i stabilnost ispitivane hemikalije u rastvraču/nosaču, ako su poznate.

Ćelije:

- vrsta i izvor ćelija:
- je li estrogenski receptor izražen endogeno? Ako nije, koji su receptori transficirani,
- korišteni konstrukti reporterskih gena (uključujući izvornu vrstu),

— metoda transfekcije,
— metoda izbora za održavanje stabilne transfekcije (ako je primjenjivo),
— je li metoda transfekcije relevantna za stabilne linije,

— Broj pasaža ćelija (od odmrzavanja),
— Broj pasaža ćelija pri odmrzavanju,
— metode održavanja ćelijskih kultura.

Ispitni uslovi:
— ograničenja rastvorljivosti,
— opis metoda primijenjenih za procjenu vijabilnosti,
— sastav medija, koncentracija CO_2,
— koncentracije ispitivane hemikalije,
— volumen dodatog nosača i ispitivane hemikalije,
— temperatura i vlažnost inkubacije,
— trajanje tretiranja,
— gustina ćelija na početku i za vrijeme tretiranja,
— pozitivne i negativne referentne norme,
— reporterski reagensi (naziv proizvoda, dobavljač i serija),
— kriterijumi na osnovu kojih se ciklusi ispitivanja smatraju pozitivnim, negativnim ili dvosmislenim.

Provjera prihvatljivosti:
— multiplikacioni faktori indukcije za svaku ploču testa i ispunjavaju li najmanju vrijednost za test na osnovu prošlih kontrola,
— stvarne vrijednosti za kriterijume prihvatljivosti, npr. log10EC50, log10PC50, logIC50 i vrijednosti Hillova nagiba za istovremene pozitivne kontrole/referentne norme.

Rezultati:
— neobrađeni i normirani podaci,
— najveći nivo multiplikacionog faktora indukcije,
— podaci o citotoksičnosti,
— ako postoji, najniža efikasna koncentracija (LEC),
— vrijednosti RPCMax, PCMax, PC50, IC50 i/ili EC50, prema potrebi,
— odnos koncentracije i odgovora, ako je moguće,
— statističke analize, ako postoje, i mjera greške i pouzdanosti (npr. SEM, SD, CV ili interval 95-postotne pouzdanosti) te opis načina na koji se došlo do tih vrijednosti.

Rasprava o rezultatima

Zaključak

Dodatak 2.

TEST TRANSAKTIVACIJE STABILNO TRANSFICIRANOG LJUDSKOG ESTROGENSKOG RECEPTORA-A ZA OTKRIVANJE ESTROGENSKOG AGONISTIČKOG I ANTAGONISTIČKOG DJELOVANJA HEMIKALIJA PRIMJENOM ĆELIJSKE LINIJE HERA-HELA-9903

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

U ovom testu transaktivacije (TA) upotrebljava se ćelijska linija hERα-HeLa-9 903 radi otkrivanja estrogenskog agonističkog djelovanja kojim posreduje ljudski estrogenski receptor alfa (hERα). Validaciona studija testa transaktivacije sa stabilnom transfekcijom (STTA) koju je ssproveo CERI (Japanski institut za procjenu i istraživanje hemikalija) primjenom ćelijske linije hERα-HeLa-9 903 za otkrivanje estrogenskog agonističkog i antagonističkog djelovanja kojim posreduje ljudski estrogenski receptor alfa (hERα) pokazala je relevantnost i pouzdanost testa za predviđenu svrhu

Ovaj je test posebno osmišljen za otkrivanje transaktivacije kojom posreduje hERα mjerenjem hemiluminiscencije kao krajnje tačke. Međutim, pri koncentracijama fitoestrogena većima od 1 μM zabilježeni su signali luminiscencije kojima ne posreduju receptori zbog pretjerane aktivacije reporterskog gena za luciferazu Iako kriva doza – odgovor pokazuje da do stvarne aktivacije sistema estrogenskog receptora dolazi pri manjim koncentracijama, ekspresiju luciferaze dobijenu pri visokim koncentracijama fitoestrogena ili sličnih jedinjenjenja za koje se pretpostavlja da poput fitoestrogena dovode do pretjerane aktivacije reporterskog gena za luciferazu treba pažljivo ispitati sistemima ER TA testova sa stabilnom transfekcijom.

Prije upotrebe ovog testa u regulatorne svrhe treba pročitati odjeljke „OPŠTI UVOD” i „SASTOJCI ER TA TESTA”.

NAČELO TESTA (VIDJETI I OPŠTI UVOD)

POSTUPAK

Test se upotrebljava za signalizaciju vezivanja estrogenskog receptora s ligandom. Nakon vezivanja s ligandom kompleks receptora i liganda translocira u jezgru, gdje se veže na specifične elemente DNK odgovora i transaktivira reporterski gen za luciferazu svitaca, što dovodi do povećane ćelijske ekspresije enzima luciferaze. Luciferin je supstrat koji enzim luciferaze pretvara u bioluminiscentni proizvod koji se može kvantitativno izmjeriti s pomoću luminometra. Aktivnost luciferaze može se procijeniti brzo i jeftino primjenom nekoliko komercijalno dostupnih pribora za ispitivanje.

U ispitnom sistemu upotrebljava se ćelijska linija hERα-HeLa-9 903, koja se dobija iz humanog cervikalnog tumora, s dva stabilno umetnuta konstrukta: i. konstruktom za ekspresiju hERαα (kodiranje cijelog ljudskog receptora) i ii. konstruktom reporterskog gena za luciferazu svitaca koji nosi pet tandemskih ponavljanja elementa vitelogenina koji reaguju na estrogen (ERE) koje pokreće TATA element promotera gena za mišji metalotionein (MT). Pokazalo se da je mišji MT TATA genski konstrukt najuspješniji pa se često upotrebljava. Stoga ova ćelijska linija hERα-HeLa-9 903 može mjeriti sposobnost ispitivane hemikalije da indukuje transaktivaciju genske ekspresije luciferaze kojom posreduje hERα.

U slučaju testa agonista estrogenskog receptora, tumačenje podataka zasniva se na tome je li maksimalni nivoa odgovora koju indukuje ispitivana hemikalija jednaka ili veća od odgovora agonista koji iznosi 10 % odgovora koji indukuje koncentracija pozitivne kontrole 17β-estradiola (E2) s najvećim efektom (1 nM) (tj. PC10). U slučaju testa antagonista estrogenskog receptora, tumačenje podataka zasniva se na tome pokazuje li odgovor smanjenje aktivnosti od najmanje 30 % u odnosu na odgovor koji indukuje kontrola s dodatom poznatom količinom supstance (spike-in) (25 pM E2) bez pojave citotoksičnosti.

Ćelijske linije

Za test bi se trebala upotrebljavati stabilno transfikovana ćelijska linija hERα-HeLa-9 903. Ćelijska linija može se dobiti iz banke ćelija JCRB-a (Japanese Collection of Research Bioresources, Japanska zbirka istraživačkih bioresursa) nakon potpisivanja sporazuma o prenosu materijala (MTA).

U ispitivanju se upotrebljavati samo ćelije koje ne sadržiju mikoplazmu. RT-PCR (lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu) preferirana je metoda za osjetljivo otkrivanje zaraze mikoplazmom.

Stabilnost ćelijske linije

Kako bi se pratila stabilnost ćelijske linije, kao referentne norme za test agonista treba upotrebljavati E2, 17α-estradiol, 17α-metiltestosteron i kortikosteron te treba izmjeriti cijelu krivu koncentracija – odgovor u rasponu ispitne koncentracije navedenom u tabeli 1. barem jednom kod svake primjene testa, a rezultati bi se trebali slagati s rezultatima navedenima u tabeli 1.

U slučaju testa antagonista, pri svakom ciklusu treba istovremeno mjeriti cijele krive koncentracije za dvije referentne norme, tamoksifen i flutamid. Treba pratiti tačno kvalitativno klasifikovanje tih dvije hemikalije kao pozitivnih i negativnih.

Ćelijska kultura i uslovi nasađivanja

Ćelije treba održavati u Eagleovu minimalnom esencijalnom medijumu (EMEM) bez fenolne crvene, obogaćenom sa 60 mg/l antibiotika kanamicina i 10 % fetalnog goveđeg seruma tretiranog ugljem premazanim dekstranom (DCC-FBS), u inkubatoru CO2 (5 % CO2) na 37 ± 1 °C. Kada se postigne konfluencija od 75 do 90 %, može se uzgojiti supkultura po 10 ml 0,4 x 105 – 1 x 105 ćelija/ml za zdjelicu sa ćelijskom kulturom od 100 mm. Ćelije treba suspendovati u 10 % medija FBS-EMEM (što je isto kao i EMEM s DCC-FBS-om) i zatim nasaditi u posude sa udubljenjima mikroploče pri gustine od 1 x 104 ćelija/(100 µl x udubljenja). Ćelije zatim treba predinkubirati u inkubatoru s 5 % CO_2 na 37 ± 1 °C u trajanju od tri sata prije izlaganja hemikaliji. U plastičnoj opremi ne smije biti estrogene aktivnosti.

Kako bi se održao integritet odgovora, ćelije treba uzgajati za više od jedne pasaže od zamrznute matične zalihe u kondicioniranom medijumu i ne bi se trebale uzgajati za više od 40 pasaža. Za ćelijsku liniju hERα-HeLa-9 903 to će trajati manje od tri mjeseca. Međutim, uspješnost ćelija može se smanjiti ako se one uzgajaju u uslovima koji nisu primjereni za uzgoj kulture.

DCC-FBS se može pripremiti kako je opisano u Dodatku 2.2. ili se može nabaviti iz komercijalnih izvora.

Kriterijumi prihvatljivosti

Pozitivne i negativne referentne norme za test agonista estrogenskog receptora

Prije i tokom sprovođenja studije treba potvrditi osjetljivost ispitnog sistema primjenom odgovarajućih koncentracija jakog estrogena: E2, slabog estrogena (17α-estradiol), vrlo slabog agonista (17α-metiltestosteron) i negativne supstance (kortikosteron). Vrijednosti prihvatljivog raspona izvedene iz validacione studije navedene su u tabeli 1. Ove četiri paralelne referentne norme treba uključiti u svaki eksperiment i rezultati bi trebali biti unutar prihvatljivih ograničenja. Ako nisu, treba utvrditi uzrok neispunjavanja kriterijuma prihvatljivosti (npr. rukovanje ćelijama,

serum i antibiotici za kvalitetu i koncentracija) te ponoviti test. Kada se ispune kriterijumi prihvatljivosti, ključna je dosljedna upotreba materijala za uzgoj ćelija kako bi se osigurala minimalna varijabilnost vrijednosti EC50, PC50 i PC10. Pomoću četiri paralelne referentne normi, koje treba uključiti u svaki eksperiment (sproveden u istim uslovima, uključujući materijale, nivo pasaže ćelija i tehničare), može se osigurati osjetljivost testa jer vrijednosti PC10 triju pozitivnih referentnih normi trebaju biti unutar prihvatljivog raspona, isto kao i vrijednosti PC50 i EC50 ako se mogu izračunati (vidjeti tabelu 1.).

Tabela 1. **Vrijednosti prihvatljivog raspona četiri referentnih normi za test agonista estrogenskog receptora**

Naziv	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Hillov nagib	Raspon ispitivanja
17β-estradiol (E2) CAS br.: 50-28-2	–11,4 ~ –10,1	< –11	–11,3 ~ –10,1	0,7 ~ 1,5	10^{-14} ~ 10^{-8} M
17α-estradiol CAS br.: 57-91-0	–9,6 ~ –8,1	–10,7 ~ –9,3	–9,6 ~ –8,4	0,9 ~ 2,0	10^{-12} ~ 10^{-6} M
Kortikosteron CAS br.: 50-22-6	—	—	—	—	10^{-10} ~ 10^{-4} M
17α-metiltestosteron CAS br.: 58-18-4	–6,0 ~ –5,1	–8,0 ~ –6,2	—	—	10^{-11} ~ 10^{-5} M

Pozitivne i negativne referentne norme za test antagonista estrogenskog receptora

Prije i tokom sprovođenja studije treba potvrditi osjetljivost ispitnog sistema primjenom odgovarajućih koncentracija pozitivne supstance (tamoksifen) i negativne supstance (flutamid). Vrijednosti prihvatljivog raspona izvedene iz validacione studije navedene su u tabeli 2. Ove dvije paralelne referentne norme treba uključiti u svaki eksperiment i rezultati bi trebali biti procijenjeni tačnima, kako je prikazano u kriterijumima. Ako nisu, treba utvrditi uzrok neispunjavanja kriterijuma (npr. rukovanje ćelijama, serum i antibiotici za kvalitetu i koncentracija) te ponoviti test. Osim toga, treba izračunati vrijednosti IC50 za pozitivnu supstancu (tamoksifen) i rezultati bi trebali biti unutar utvrđenih prihvatljivih ograničenja. Kada se ispune kriterijumi prihvatljivosti, ključna je dosljedna upotreba materijala za uzgoj ćelija kako bi se osigurala minimalna varijabilnost vrijednosti IC50. S pomoću tih dviju paralelnih referentnih normi, koje treba uključiti u svaki eksperiment (sproveden u istim uslovima, uključujući materijale, nivo pasaže ćelija i tehničare), može se osigurati osjetljivost testa (vidjeti tabelu 2.).

Tabela 2. **Kriterijumi i vrijednosti prihvatljivog raspona dviju referentnih normi za test antagonista estrogenskog receptora**

Naziv	Kriterijumi	$LogIC_{50}$	Raspon ispitivanja

Tamoksifen CAS br.: 10 540 -29-1	Pozitivno: treba izračunati IC_{50}	–5,942 ~ –7,596	10–10 ~ 10–5 M
Flutamid CAS br.: 13 311 -84-7	Negativno: ne treba izračunati IC_{30}	—	10–10 ~ 10–5 M

Pozitivne kontrole i kontrole s nosačem

Pozitivnu kontrolu (PC) za test agonista estrogenskog receptora (1 nM E2) i za test antagonista estrogenskog receptora (10 μM tamoksifena) treba ispitati najmanje u tri ponavljanja na svakoj ploči. Nosač koji se upotrebljava za rastvaranje ispitivane hemikalije treba ispitati kao kontrolu s nosačem (VC) barem u tri ponavljanja na svakoj ploči. Osim te kontrole s nosačem, ako se u pozitivnoj kontroli upotrebljava nosač različit od onoga koji se upotrebljava s ispitivanom hemikalijom, treba ispitati drugu kontrolu s nosačem u najmanje tri ponavljanja na istoj ploči s pozitivnom kontrolom.

Kriterijumi kvalitete za test agonista estrogenskog receptora

Srednja aktivnost luciferaze u pozitivnoj kontroli (1 nM E2) treba biti barem četiri puta veća od srednje vrijednosti u kontroli s nosačem na svakoj ploči. Kriterijum se utvrđuje na osnovu pouzdanosti vrijednosti krajnjih tačaka iz validacione studije (prema prošlim podacima četiri do 30 puta više).

Kad je riječ o kontroli kvaliteta testa, multiplikacioni faktor indukcije koji odgovara vrijednosti PC10 istovremene pozitivne kontrole (1 nM E2) trebao bi biti veći od 1 + 2 standardne devijacije vrijednosti multiplikacionog faktora indukcije (= 1) istovremene kontrole s nosačem. U svrhu određivanja prioriteta, vrijednost PC10 može biti korisna za pojednostavnjenje potrebne analize podataka u u poređenju sa statističkom analizom. Iako statistička analiza pruža podatke o značajnosti, ta analiza nije kvantitativan parametar u pogledu potencijala koji se zasniva na koncentraciji i stoga je manje korisna u svrhu određivanja prioriteta.

Kriterijumi kvaliteta za test antagonista estrogenskog receptora

Srednja aktivnost luciferaze u kontroli s dodatom poznatom količinom supstance (spike-in) (25 nM E2) treba biti barem četiri puta veća od srednje vrijednosti u kontroli s nosačem na svakoj ploči. Kriterijum se utvrđuje na osnovu pouzdanosti vrijednosti krajnjih tačaka iz validacione studije.

Kad je riječ o kontroli kvaliteta testa, relativna transkripciona aktivacija (RTA) 1 nM E2 treba biti veća od 100 %, RTA 1 μM 4-hidroksitamoksifena (OHT) treba biti manji od 40,6 % i RTA 100 μM digitonina (Dig) treba biti manji od 0 %.

Nosač

Kao istovremenu kontrolu s nosačem treba upotrijebiti dimetilsulfoksid (DMSO) ili primjereni rastvarač, u istoj koncentraciji koja se upotrebljava za različite pozitivne i negativne kontrole i ispitivane hemikalije. Ispitivane hemikalije treba rastvoriti u rastvraču koje rastvara ispitivanu hemikaliju te se može miješati s medijem za ćelije. Primjereni su nosači voda, etanol (čistoće od 95 % do 100 %) i DMSO. Ako se upotrebljava DMSO, ne bi se trebalo koristiti više od 0,1 %

(v/v). Za sve bi nosače trebalo dokazati da najveći volumen koji se upotrebljava nije citotoksičan i da ne utiču na uspješnost testa.

Priprema ispitivanih hemikalija

Ispitivane hemikalije obično treba rastvoriti u DMSO-u ili drugom primjerenom rastvraču i serijski razrijediti istim rastvaračem u odnosu 1: 10 kako bi se pripremile rastvora za razrjeđivanje s medijem.

Rastvorljivost i citotoksičnost: razmatranja o utvrđivanju raspona

Treba sprovesti preliminarno ispitivanje kako bi se utvrdio primjereni raspon koncentracije hemikalije koja se ispituje i kako bi se utvrdilo postoje li određeni problemi povezani s rastvorljivosti i citotoksičnosti ispitivane hemikalije. Hemikalije se u početku ispituju do najveće koncentracije od 1 µl/ml, 1 mg/ml ili 1 mM, u zavisnosti o tome što je najmanje. Na osnovu mjere citotoksičnosti ili nedovoljne rastvorljivosti uočene u preliminarnom ispitivanju, u prvom definitivnom ciklusu hemikaliju treba ispitati po log-serijskim razrjeđenjima, počevši od najveće prihvatljive koncentracije (npr. 1 mM, 100 µM, 10 µM itd.) i zabilježiti zamućenje, talog ili citotoksičnost. Koncentracije u drugom, a prema potrebi i trećem ciklusu treba po potrebi prilagoditi radi bolje karakterizacije krive koncentracija – odgovor i kako bi se izbjegle koncentracije za koje se utvrdi da nisu rastvorive ili da indukuje preveliku citotoksičnost.

Kod agonista i antagonista estrogenskog receptora prisutnost povećanih nivoa citotoksičnosti može znatno izmijeniti ili eliminisati uobičajeni sigmoidni odgovor i treba je uzeti u obzir pri tumačenju podataka. Treba upotrebljavati metode za ispitivanje citotoksičnosti koje mogu dati informacije o 80-postotnoj vijabilnosti ćelija, uz primjenu primjerenog testa na osnovu iskustva laboratorija.

Ako rezultati ispitivanja citotoksičnosti pokažu da je koncentracija ispitivane hemikalije smanjila broj ćelija za 20 % ili više, ta se koncentracija treba smatrati citotoksičnom, a koncentracije koje su jednake citotoksičnoj koncentraciji ili veće treba isključiti iz procjene.

Izlaganje hemikaliji i organizacija testne ploče

Postupak za razrjeđivanja hemikalija (koraci 1. i 2.) i izlaganje ćelija (korak 3.) može se sprovoditi na sljedeći način.

Korak 1.: Svaku ispitivanu hemikaliju treba serijski razrijediti u DMSO-u ili primjerenom rastvaraču i dodati u mikrotitracione pločice kako bi se dobile konačne serijske koncentracije kako su utvrđene u preliminarnom ispitivanju za utvrđivanje raspona (obično u serijama, na primjer 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM i 10 pM (10–3 – 10–11 M)) za ispitivanje u tri ponavljanja.

Korak 2.: razrjeđivanje hemikalija: prvo razrijediti 1,5 µl ispitivane hemikalije u rastvraču na volumen od 500 µl medija.

Korak 3.: izlaganje ćelija hemikaliji: dodati 50 µl razrijeđene hemikalije s medijem (pripremljene u koraku 2.) u testnu kadicu koja sadrži 104 ćelija/100 µl/udubljenja.

Preporučeni konačni volumen medija potrebnog za svaku kadicu iznosi 150 µl. Ispitni uzorci i referentne norme mogu se rasporediti kako je prikazano u tabeli 3. i tabeli 4.

Tabela 3. **Primjer rasporeda koncentracija na pločama za referentne norme na testnoj ploči za agonist estrogenskog receptora**

Red	**17α-metiltestosteron**			**Kortikosteron**			**17α-estradiol**			**E2**		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 µM)	→	→	100 µM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 µM)	→	→	10 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→
VC: kontrola s nosačem (0,1 % DMSO); PC: pozitivna kontrola (1 nM E2)												

Referentne norme (E2, 17α-estradiol, 17 α-metil testosteron i kortikosteron) treba ispitati u svakom ciklusu (tabela 3.). Posude sa udubljenjima s pozitivnom kontrolom tretirane s 1 nM E2 koje mogu proizvesti najveću indukciju E2 te posude sa udubljenjima s kontrolom nosača tretirane samo DMSO-om (ili primjerenim rastvaračem) treba uključiti u svaku testnu ploču u ispitivanju (tabela 4.). Ako se u istom eksperimentu upotrebljavaju ćelije iz različitih izvora (npr. različiti broj pasaže, različita serija itd.), referentne norme trebaju se ispitati za svaki izvor ćelija.

Tabela 4. **Primjer rasporeda koncentracija na pločama za ispitivane hemikalije i hemikalije za kontrolu na testnoj ploči u testu agonista estrogenskog receptora**

Red	**Ispitivana hemikalija 1**	**Ispitivana**	**Ispitivana**	**Ispitivana**

				hemikalija 2			**hemikalija 3**			**hemikalija 4**		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 µM)	→	→	1 mM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 µM)	→	→	100 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	10 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	1 µM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→
VC: kontrola s nosačem (0,1 % DMSO); PC: pozitivna kontrola (1 nM E2)												

Tabela 5 **Primjer rasporeda koncentracija na pločama za referentne norme na testnoj ploči u testu antagonista estrogenskog receptora**

Redak	Tamoksifen			Flutamid			Ispitivana kemikalija 1			Ispitivana kemikalija 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	konc. 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO-a	→	→	→	→	→	1 µM OHT-a	→	→	100 µM digitonina (Dig)	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola s nosačem (0,1 % DMSO); PC: pozitivna kontrola (1 nM E2); OHT: 4-hidroksitamoksifena; Dig: digitonin.

= dodano 25 pM E2

Kako bi se procijenilo antagonističko djelovanje hemikalija, u testne posude sa udubljenjima koje se nalaze u recima od A do G treba dodati 25 pM E2. Referentne norme (tamoksifen i flutamid) treba ispitati u svakom ciklusu. Svaka testna ploča u ispitivanju treba uključivati posude sa udubljenjima s pozitivnom kontrolom tretirane s 1 nM E2 koje se mogu upotrijebiti kao kontrola kvaliteta za ćelijsku liniju hERα-HeLa-9 903, posude sa udubljenjima s kontrolom nosača tretirane DMSO-om (ili odgovarajućim rastvaračem), posude sa udubljenjima s 0,1 % DMSO-a tretirane dodatkom DMSO-a i E2 koje odgovaraju kontroli s dodatom poznatom količinom supstanci („spike-in" kontrola), posude sa udubljenjima tretirane s konačnom koncentracijom 1 µM OHT-a te posude sa udubljenjima tretirane s 100 µM digitonina (tabela 5.). Kod kasnijih testnih ploča treba se slijediti isti raspored na ploči bez udubljenja iz referentnih normi (tabela 6.). Ako se u istom eksperimentu upotrebljavaju ćelije iz različitih izvora (npr. različiti broj pasaže, različita serija itd.), referentne norme trebaju se ispitati za svaki izvor ćelija

Tabela 6 Primjer rasporeda koncentracija na pločama za ispitivane hemikalije i hemikalije za kontrolu na testnoj ploči za antagonist estrogenskog receptora

Redak	Ispitivana kemikalija 1			Ispitivana kemikalija 2			Ispitivana kemikalija 3			Ispitivana kemikalija 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	konc. 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO-a	→	→	→	→	→	1 µM OHT-a	→	→	100 µM digitonina (Dig)	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola s nosačem (0,1 % DMSO); PC: pozitivna kontrola (1 nM E2); OHT: 4-hidroksitamoksifen, Dig: digitonin.

: dodano 25 pM E2

Prema potrebi treba potvrditi izostanak rubnih efekata, a ako se sumnja na rubne efekte, treba promijeniti raspored na ploči kako bi se izbjegli ti efekti. Na primjer, može se upotrijebiti raspored na ploči koji isključuje rubne posude sa udubljenjima.

Nakon dodavanja hemikalija testne ploče treba inkubirati u inkubatoru s 5 % CO2 na 37 ± 1 oC od 20 do 24 sata kako bi se indukovali proizvodi reporterskog gena.

Posebnu pažnju treba posvetiti jedinjenjima koji su jako isparljivi. U tim slučajevima kontrolne posude sa udubljenjima koje se nalaze u blizini mogu dati lažno pozitivne rezultate i to treba uzeti u obzir u kontekstu očekivanih i prošlih vrijednosti kontrola. U nekim slučajevima u kojima isparljivost može biti problem mogu se upotrijebiti poklopci za ploče kako bi se tokom ispitivanja efektivno izolovale pojedinačne posude sa udubljenjima pa se stoga u tim slučajevima preporučuje njihova upotreba.

Ponavljanja konačnih ispitivanja za istu hemikaliju treba sprovoditi na različite dane kako bi se osigurala nezavisnost.

Test luciferase

Za test se može upotrijebiti komercijalni reagens za test luciferaze [npr. Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510 ili ekvivalentno)) ili standardni sistem testa luciferaze (npr. Promega, E1500 ili ekvivalentno) pod uslovom da su ispunjeni kriterijumi prihvatljivosti. Reagens za test treba odabrati na osnovu osjetljivosti luminometra koji se koristi. Ako se koristi standardni sistem testa luciferaze, prije dodavanja supstrata treba upotrijebiti reagens za liziranje ćelijske kulture. Reagens za luciferazu treba primijeniti prema uputama proizvođača.

ANALIZA PODATAKA

Test agonista estrogenskog receptora

Kad je riječ o testu agonista estrogenskog receptora, da bi se dobila relativna transkripciona aktivnost u odnosu na pozitivnu kontrolu (1 nM E2), signali luminiscencije s iste ploče mogu se analizirati prema sljedećim koracima (prihvatljivi su i drugi ekvivalentni matematički postupci):

Korak 1. Izračunati srednju vrijednost za kontrolu s nosačem.

Korak 2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem od vrijednosti svake posude sa udubljenjima kako bi se podaci normalizuju.

Korak 3. Izračunati srednju vrijednost za pozitivnu kontrolu.

Korak 4. Podijeliti normalizovanu vrijednost svake posude sa udubljenjima na ploči srednjom vrijednošću normalizovane pozitivne kontrole (PC = 100 %).

Konačna vrijednost svake posude sa udubljenjima relativna je transkripciona aktivnost za tu kadicu u u poređenju s odgovorom pozitivne kontrole.

Korak 5. Izračunati srednju vrijednost relativne transkripcione aktivnosti za svaku koncentracionu grupu ispitivane hemikalije. Odgovor ima dvije dimenzije: prosječnu transkripcionu aktivnost (odgovor) i koncentraciju pri kojoj dolazi do odgovora (vidjeti sljedeći odjeljak).

Razmatranja o indukciji vrijednosti EC_{50}, PC_{50} i PC_{10}

Za izračunavanje vrijednosti EC50 potrebna je cijela kriva koncentracija – odgovor, ali to se ne može uvijek postići ili nije praktično zbog ograničenja raspona ispitne koncentracije (na primjer, zbog citotoksičnosti ili poteškoća s rastvorljivosti). Međutim, budući da su EC50 i najveći nivoi indukcije (koja odgovara najvećoj vrijednosti Hillove jednačine) informativni parametri, treba ih navesti kada je to moguće. Za izračunavanje vrijednosti EC50 i najveće nivoa indukcije treba koristiti primjereni statistički softver (npr. statistički softver Graphpad Prism). Ako je na podatke o koncentraciji i odgovoru primjenjiva Hillova logistička jednačina, vrijednost EC50 treba izračunati prema sljedećoj jednačini:

Y = dno + (vrh – dno) / (1 + 10 exp ((log EC50 – X) x Hillov nagib)) pri čemu je:

X logaritam koncentracije, a Y odgovor te Y počinje na dnu i kreće se do vrha sigmoidne krive. Dno je u Hillovoj logističkoj jednačini utvrđeno na nulu.

Za svaku ispitivanu hemikaliju treba navesti sljedeće:

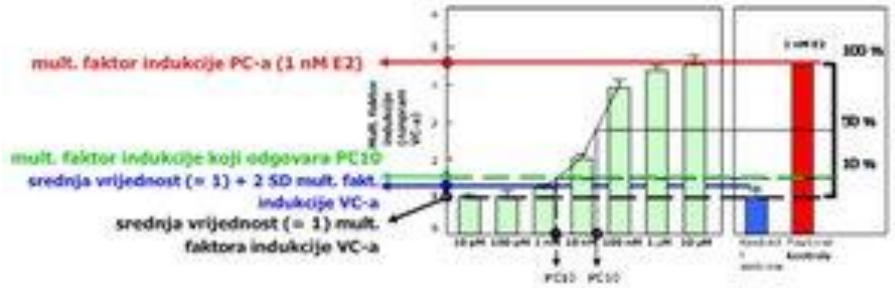
RPCMax (maksimalni nivoa odgovora koju indukuje ispitivana hemikalija, izražena kao postotak odgovora koji indukuje 1 nM E2 na istoj ploči) te PCMax (koncentracija povezana s vrijednosti RPCMax) i, u slučaju pozitivnih hemikalija, koncentracije koje indukujeju PC10 i, ako je primjereno, PC50.

Vrijednost PCx može se izračunati interpolacijom između dvije tačke na koordinatama X-Y, jedne neposredno iznad i jedne neposredno ispod vrijednosti PCx. Ako podatkovne tačke koje se nalaze neposredno iznad i ispod vrijednosti PCx imaju koordinate (a,b) i (c,d), vrijednost PCx može se izračunati prema sljedećoj jednačini:

log[PCx] = log[c] + (x – d) / (d – b)

Opisi vrijednosti PC navedeni su na slici 1. u nastavku.

Sliika 1 **Primjer načina na koji se izvode vrijednosti pozitivne kontrole. PC (1 nM E2) stavlja se na svaku testnu ploču**



Test antagonista estrogenskog receptora

Kad je riječ o testu antagonista estrogenskog receptora, da bi se dobila relativna transkripciona aktivnost u odnosu na kontrolu s dodatom poznatom količinom supstance (spike-in) (25 nM E2), signali luminiscencije s iste ploče mogu se analizirati prema sljedećim koracima (prihvatljivi su i drugi ekvivalentni matematički postupci).

Korak 1. Izračunati srednju vrijednost za kontrolu s nosačem.

Korak 2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem od vrijednosti svake posude sa udubljenjima kako bi se podaci normalizovali.

Korak 3. Izračunati srednju vrijednost za normalizovanu kontrolu s dodatom poznatom količinom supstance (spike-in).

Korak 4. Podijeliti normalizovanu vrijednost svake posude sa udubljenjima na ploči srednjom vrijednošću normalizovane kontrole s dodatom poznatom količinom supstance (spike-in kontrola = 100 %).

Konačna vrijednost svake posude sa udubljenjima relativna je transkripciona aktivnost za tu kadicu u u poređenju s odgovorom kontrole s dodatom poznatom količinom supstance.

Korak 5. Izračunati srednju vrijednost relativne transkripcione aktivnosti za svako tretiranje.

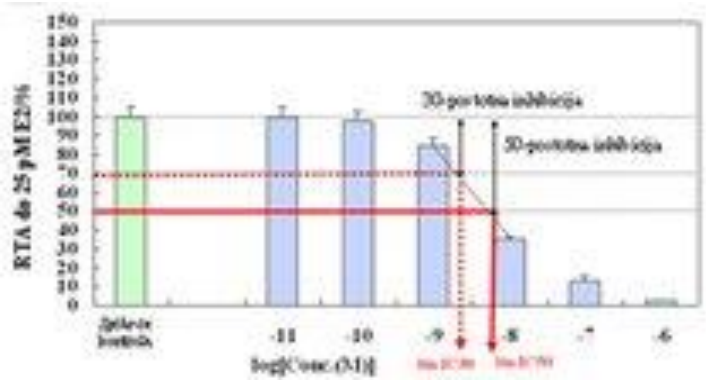
Razmatranja o indukciji vrijednosti IC_{30} i IC_{50}

U slučaju pozitivnih hemikalija treba navesti koncentracije koje indukujeju IC30 i, ako je primjereno, IC50

Vrijednost ICx može se izračunati interpolacijom između dvije tačke na koordinatama X-Y, jedne neposredno iznad i jedne neposredno ispod vrijednosti ICx. Ako podatkovne tačke koje se nalaze neposredno iznad i ispod vrijednosti ICx imaju koordinate (c,d) i (a,b), vrijednost ICx može se izračunati prema sljedećoj jednačini:

lin ICx = a – (b – (100 – x)) (a – c) / (b – d)

Slika 2 **Primjer načina na koji se izvode vrijednosti IC. Kontrola s dodatom poznatom količinom supstance (*spike-in*) (25 pM E2) stavlja se na svaku testnu ploču**



RTA: relativna transkripciona aktivnost

Rezultati se baziraju na dva (ili tri) nezavisna ciklusa. Ako se u dva ciklusa dobiju uporedivi, a time i ponovljivi rezultati, ne mora se sprovoditi treći ciklus. Da bi bili prihvatljivi, rezultati trebaju:

— ispunjavati kriterijume prihvatljivosti,
— biti ponovljivi.

Kriterijumi za tumačenje podataka

Tabela 7. **Kriterijumi za donošenje pozitivne i negativne odluke u testu agonista estrogenskog receptora**

Pozitivna	Ako se dobije vrijednost RPC_{Max} koja je jednaka ili veća od 10 % odgovora pozitivne kontrole u najmanje dva od dva sprovedena ciklusa ili u dva od tri sprovedena ciklusa.
Negativna	Ako se ne uspije dobiti vrijednost RPC_{Max} koja iznosi barem 10 % odgovora pozitivne kontrole u dva od dva sprovedena ciklusa ili u dva od tri sprovedena ciklusa.

Tabela 8.

Kriterijumi za donošenje pozitivne i negativne odluke u testu antagonista estrogenskog receptora

Pozitivna	Ako se IC_{30} izračuna u najmanje dva od dva provedena ciklusa ili u dva od tri provedena ciklusa.
Negativna	Ako se IC_{30} ne uspije izračunati u dva od dva provedena ciklusa ili u dva od tri provedena ciklusa.

Kriterijumi za tumačenje podataka navedeni su u tabelama 7. i 8. Pozitivne rezultate karakterizirat će i odnos efekta i koncentracija pri kojoj dolazi do efekta. Oba ta cilja ostvaruju se izražavanjem rezultata kao koncentracije pri kojoj se postiže 50 % (PC50) ili 10 % (PC10) vrijednosti PC za test agonista te se inhibira 50 % (IC50) ili 30 % (IC30) vrijednosti kontrole s dodatom poznatom količinom supstanci (spike-in) za test antagonista. Međutim, ispitivana hemikalija određuje se kao pozitivna ako je najveći odgovor koji ona indukuje (RPCMax) jednak ili veći od 10 % odgovora pozitivne kontrole u najmanje dva od dva provedena ciklusa ili dva od tri provedena ciklusa, dok se ispitivana hemikalija smatra negativnom ako RPCMax ne uspije ostvariti 10 % odgovora pozitivne kontrole u dva od dva provedena ciklusa ili u dva od tri provedena ciklusa.

Vrijednosti PC10, PC50 i PCMax u testu agonista estrogenskog receptora te IC30 i IC50 u testu antagonista estrogenskog receptora mogu se izračunati s pomoću proračunske tabele koja je dostupna sa Smjernicom za ispitivanje na javnom web-mjestu OECD-a (63).

Trebalo bi biti dovoljno dobiti vrijednosti PC10 ili PC50 i IC30 ili IC50 najmanje dva puta. Međutim, ako osnovica za podatke u istom rasponu koncentracije koja iz toga proizađe pokazuje varijabilnost s neprihvatljivo visokim koeficijentom varijacije (CV; %), podaci se ne mogu smatrati pouzdanima i treba utvrditi izvor velike varijabilnosti. Koeficijent varijacije neobrađenih podataka iz tri ponavljanja (tj. podaci o intenzitetu fluorescencije) podatkovnih tačaka koje se upotrebljavaju za izračun vrijednosti PC10 treba biti manji od 20 %.

Ispunjavanje kriterijuma prihvatljivosti znači da sistem testa pravilno funkcioniše, ali time se ne osigurava da će svaki pojedinačni ciklus dati tačne rezultate. Ponavljanje rezultata prvog ciklusa najbolje je garantuje toga da su dobijeni tačni podaci.

U slučaju testa agonista estrogenskog receptora, ako je za ispitivanje za pozitivne ispitivane hemikalije, naročito za hemikalije PC10-PC49 te hemikalije za koje se sumnja da pretjerano stimuliraju luciferazu, potrebno više informacija u svrhu izbora i utvrđivanja prioriteta ove smjernice za ispitivanje, upotrebom antagonista ERα može se potvrditi da je uočena aktivnost luciferaze isključivo odgovor specifičan za ERα (vidjeti Dodatak 2.1.).

IZVJEŠTAJ O ISPITIVANJU

Vidjeti dio „SASTOJCI ER TA TESTA”.

Dodatak 2.1.

LAŽNO POZITIVNI REZULTATI: PROCJENA SIGNALA LUMINISCENCIJE KOJIMA NE POSREDUJU RECEPTORI

Kriterijumi za tumačenje podataka

Lažno pozitivne rezultate u testu agonista estrogenskog receptora može uzrokovati aktivacija gena luciferaze koja nije posredovana estrogenskim receptorom ili izravna aktivacija genskog produkta ili nepovezana fluorescencija. Na takve efekte upućuje nepotpuna ili neobična kriva doza – odgovor. Ako se sumnja na takve efekte, treba ispitati efekat antagonista estrogenskog receptora (npr. 4-hidroksitamoksifena (OHT) pri koncentraciji koja nije toksična) na odgovor. U tu svrhu možda neće biti primjeren čisti antagonist ICI 1827 80 jer dovoljna koncentracija antagonista ICI 1827 80 može smanjiti vrijednost kontrole s nosačem, a to će uticati na analizu podataka.

Kako bi se osigurala valjanost ovog pristupa, na istoj se ploči mora ispitati:

- agonističko djelovanje nepoznate hemikalije sa/bez 10 μM OHT-a,
- kontrola s nosačem (tri ponavljanja),
- OHT (tri ponavljanja),
- 1 nM E2 (tri ponavljanja) kao agonistička pozitivna kontrola,
- 1 nM E2 + OHT (tri ponavljanja).

Napomena: sve posude sa udubljenjima treba tretirati istom koncentracijom nosača.

- Ako tretiranje antagonistom estrogenskog receptora NE utiče na agonističko djelovanje nepoznate hemikalije, ona se klasifikuje kao „negativna”.
- Ako je agonističko djelovanje nepoznate hemikalije potpuno inhibirano, primjenjuju se kriterijumi za donošenje odluke.
- Ako je agonističko djelovanje pri najmanjoj koncentraciji jednako ili veće od odgovora PC10, nepoznata hemikalija inhibirana je jednako ili više od odgovora PC10. Računa se razlika u odgovorima između udubljenja koje nisu tretirane i koje su tretirane agonistom estrogenskog receptora i tu razliku treba smatrati stvarnim odgovorom i koristiti za izračunavanje odgovarajućih parametara kako bi se omogućilo donošenje odluke o klasifikovanju.

Analiza podataka

Provjeriti zahtjeve izvođenja.

Provjeriti koeficijent varijacije između udubljenja tretiranih u istim uslovima.

vi Izračunati srednju vrijednost kontrole s nosačem.
vii Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem od vrijednosti svake posude sa udubljenjima koja nije tretirana OHT-om.
viii Izračunati srednju vrijednost OHT-a.
ix Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem od vrijednosti svake posude sa udubljenjima koja je tretirana OHT-om.
x Izračunati srednju vrijednost pozitivne kontrole.
xi Izračunati relativnu transkripcionu aktivnost svih ostalih udubljenja u odnosu na pozitivnu kontrolu.

Dodatak 2.2.

PRIPREMA SERUMA TRETIRANOG UGLJEM PREMAZANIM DEKSTRANOM (DCC)

Tretiranje seruma ugljem premazanim dekstranom (DCC) opšta je metoda za uklanjanje estrogenih jedinjenjenja iz seruma koji se dodaje medijumu za ćelije kako bi se isključio pristrani odgovor povezan s preostalim estrogenom u serumu. Ovim se postupkom može tretirati 500 ml fetalnog goveđeg seruma (FBS).

Sastojci

Bi će potrebni sljedeći materijali i oprema:

Materijali

Aktivni ugljenik

Dekstran

Magnezijum hlorid heksahidrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)

Saharoza

1 M puferske rastvora HEPES (pH 7,4)

Ultračista voda dobijena sistemom za filtriranje

Oprema

Staklena posuda obrađena u autoklavu (veličinu treba prilagoditi po potrebi) Opšta laboratorijska centrifuga (u kojoj se temperatura može postaviti na 4 °C)

Postupak

Sljedeći postupak prilagođen je za upotrebu epruveta za centrifugiranje od 50 ml.

[Dan 1.] Pripremiti suspenziju ugljenika premazanog dekstranom s 1 l ultračiste vode koja sadrži 1,5 mM MgCl2, 0,25 M saharoze, 2,5 g ugljenik, 0,25 g dekstrana i 5 mM HEPES-a te miješati preko noći na 4 °C.

[Dan 2.] Uliti suspenziju u epruvete za centrifugiranje od 50 ml i centrifugirati deset minuta na 10 000 °/min i temperaturi od 4 °C. Ukloniti supernatant i čuvati polovinu sedimenta ugljenik na temperaturi od 4 °C za upotrebu na dan 3. Suspendovati drugu polovinu ugljenika s FBS-om koji je postupno odmrznut kako bi se izbjeglo taloženje i inaktiviran toplinom 30 minuta na 56 °C, a zatim prenijeti u staklenu posudu obrađenu u autoklavu kao što je Erlenmeyerova tikvica. Ovu suspenziju lagano miješati preko noći na temperaturi od 4 °C.

[Dan 3.] Uliti suspenziju s FBS-om u epruvete za centrifugiranje i centrifugirati deset minuta na 10 000 °/min i temperaturi od 4 °C. Prikupiti FBS i prenijeti ga u novi sediment ugljenik pripremljen i pohranjen na dan 2. Suspendovati sediment ugljenik i preko noći lagano miješati tu suspenziju na 4 °C u staklenoj posudi obrađenoj u autoklavu.

[Dan 4.] Uliti suspenziju i centrifugirati je deset minuta na 10 000 °/min i temperaturi od 4 °C te sterilizirati supernatant filtriranjem kroz sterilni filtar od 0,2 μm. Ovaj FBS tretiran DCC-om treba čuvati na -20 °C i može se upotrijebiti u roku od godinu dana.

Dodatak 3.

TEST TRANSAKTIVACIJE ESTROGENSKOG RECEPTORA ZA OTKRIVANJE AGONISTA I ANTAGONISTA ESTROGENSKOG RECEPTORA PRIMJENOM ĆELIJSKE LINIJE VM7LUC

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA (VIDJETI I OPŠTI UVOD)

U ovom se testu upotrebljava ćelijska linija VM7Luc4E2. Validirani su ga NICEATM (Nacionalni toksikološki program Međuagencijskog centra za evaluaciju alternativnih toksikoloških metoda) i ICCVAM (Međuagencijski koordinacijski odbor za validaciju alternativnih metoda). Ćelijske linije VM7Luc uglavnom eksprimiraju endogeni ERα i manju količinu endogenog ERβ.

Ovaj je test primjenjiv na velik raspon supstanci pod uslovom da se one mogu rastvoriti u dimetilsulfoksidu (DMSO; CAS br. 67-68-5), da ne reagujuju s DMSO-om ili medijem za uzgoj ćelijske kulture te da nisu citotoksične pri koncentracijama koje se ispituju. Ako nije moguće upotrijebiti DMSO, može se upotrijebiti drugi nosač kao što su etanol ili voda. Dokazana uspješnost testa (ant)agonista VM7Luc ER TA ukazuje na to da podaci koju se dobiju primjenom tog testa mogu dati informacije o mehanizmima djelovanja kojima posreduje estrogenski receptori te bi ga se moglo uzeti u obzir pri utvrđivanju prioriteta supstanci za dalje ispitivanje.

Ovaj je test posebno osmišljen za otkrivanje transaktivacije kojom posreduju hERα i hERß mjerenjem hemiluminiscencije kao krajnje tačke. Hemiluminiscencija se često upotrebljava u biotestovima jer daje dovoljno snažan signal u odnosu na pozadinu. Međutim, aktivnost luciferaze krijesnica u testovima na staničnoj osnovi mogu poremetiti supstance koje inhibiraju enzim luciferaze, što uzrokuje i prividnu inhibiciju ili povećanu luminiscenciju zbog stabilizacije proteina. Osim toga, kod nekih luciferaznih testova reporterskog gena estrogenskog receptora pri koncentracijama fitoestrogena većima od 1 μM zabilježeni su signali luminiscencije kojima ne posreduju receptori zbog pretjerane aktivacije reporterskog gena za luciferazu. Iako kriva doza – odgovor pokazuje da do stvarne aktivacije sistema estrogenskog receptora dolazi pri manjim koncentracijama, ekspresiju luciferaze dobijenu pri visokim koncentracijama fitoestrogena ili

sličnih jedinjenjeeva za koje se pretpostavlja da poput fitoestrogena dovode do pretjerane aktivacije reporterskog gena za luciferazu treba pažljivo ispitati sistemima ER TA testova sa stabilnom transfekcijom.

Prije upotrebe ovog testa u regulatorne svrhe treba pročitati odjeljke „OPŠTI UVOD" i „SASTOJCI ER TA TESTA".

NAČELO TESTA (VIDJETI I OPŠTI UVOD)

Test se upotrebljava kako bi se označilo vezivanje estrogenskog receptora i liganda, nakon čega kompleks receptora i liganda translocira u jezgru. U jezgri se kompleks receptora i liganda veže na specifične elemente DNK odgovora i transaktivira reporterski gen (luc), što dovodi do nastanka luciferaze i kasnije emisije svjetla, koja se može kvantifikovati s pomoću luminometra. Aktivnost luciferaze može se procijeniti brzo i jeftino primjenom nekoliko komercijalno dostupnih pribora za ispitivanje. U testu VM7Luc ER TA upotrebljava se ćelijska linija humanog adenokarcinoma dojke koja reaguju na estrogenski receptor, VM7, koja je stabilno transfikovana konstruktom reporterskog gena luc svitaca koji sastojciju četiri elementa odgovora estrogena postavljena uzlazno od promotera virusa mišjeg tumora dojke (MMTV) kako bi se otkrile supstance s in vitro agonističkim ili antagonističkim djelovanjem na estrogenski receptor. Taj promoter MMTV-a pokazuje samo manju unakrsnu reaktivnost s ostalim steroidnim i nesteroidnim hormonima. Kriterijumi za tumačenje podataka detaljno su opisani. Ukratko, pozitivni odgovor utvrđuje se na osnovu krive koncentracija – odgovor, koja sadrži najmanje tri tačke sa kolonama greške koje se ne preklapaju (srednja vrijednost ± standardna devijacija) te promjene amplitude (normalizirana relativna jedinica svjetlosti (RLU)) od najmanje 20 % najveće vrijednosti za referentnu normu (17β-estradiol [E2; CAS br. 50-28-2] za test agonista, raloksifen HCl [Ral; CAS br. 84449-90-1]/E2 za test antagonista).

POSTUPAK

Ćelijska linija

Za test bi se trebala upotrebljavati stabilno transfikovana ćelijska linija VM7Luc4E2. Ćelijska linija trenutno je dostupna samo sklapanjem tehničkog sporazuma o licenciranju s ustanovom University of California, Davis, Kalifornija, SAD i društvom Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, Sjeverna Karolina, SAD.

Stabilnost ćelijske linije

Kako bi se održali stabilnost i integritet ćelijske linije, ćelije treba uzgajati za više od jedne pasaže od zamrznute matične zalihe u medijumu za održavanje ćelija. Ćelije se ne bi trebale uzgajati za više od 30 pasaža. Za ćelijsku liniju VM7Luc4E2 30 pasaža trajat će približno tri mjeseca.

Ćelijska kultura i uslovi nasađivanja

Treba poštovati postupke utvrđene u Smjernicama za dobru praksu za ćelijske kulture kako bi se osigurala kvaliteta svih materijala i metoda te tako održali integritet, valjanost i obnovljivost svih provedenih aktivnosti.

Ćelije VM7Luc4E2 održavaju se u medijumu RPMI 1640 obogaćenom s 0,9 % mješavine penicilina i streptomicina i 8,0 % fetalnog goveđeg seruma (FBS) u namjenskom inkubatoru kulture tkiva na 37 oC ± 1 oC, vlažnosti od 90 % ± 5 % i s 5,0 % ± 1 % CO_2 u vazduhu.

Kada se dosegne konfluencija od ~ 80 %, uzgaja se supkultura ćelija VM7Luc4E2 koje se kondicioniraju na okolinu bez estrogena 48 sati prije nasađivanja na ploče s **96 udubljenja** radi izlaganja ispitivanim hemikalijama i analize indukcije aktivnosti luciferaze koja zavisi o estrogenu. Medij bez estrogena (EFM) sadrži Dulbeccov modificirani Eagleov medij (DMEM) obogaćen s 4,5 % FBS-a tretiranog ugljem premazanim dekstranom, 1,9 % L-glutamina i 0,9 % mješavine penicilina i streptomicina. U plastičnoj opremi ne smije biti estrogene aktivnosti.

Kriterijumi prihvatljivosti

Prihvatanje ili odbijanje ispitivanja zasniva se na procjeni rezultata referentne norme i kontrole iz svakog eksperimenta sprovedenog na pločici s 96 udubljenja. Svaka referentna norma ispituje se s više koncentracija i koristi se više uzoraka svake referentne i kontrolne koncentracije. Rezultati se upoređuju s kontrolama kvaliteta (KK) u pogledu tih parametara koji su izvedeni iz baza prošlih podataka o agonistima i antagonistima koje je izradio svaki laboratorij tokom dokazivanja osposobljenosti. Baze prošlih podataka kontinuirano se dopunjuju vrijednostima referentnih normi i kontrola. Promjene u opremi ili laboratorijskim uslovima možda će zahtijevati ažuriranje baza prošlih podataka.

Test agonista

Ispitivanje za utvrđivanje raspona

- Indukcija: indukciju na ploči treba mjeriti tako da se prosječna vrijednost relativne jedinice svjetlosti (RLU) najveće referentne norme E2 podijeli prosječnom vrijednosti RLU kontrole s DMSO-om. Obično se postiže petostruka indukcija, ali u svrhu prihvatanja indukcija bi trebala biti četvorostruka ili veća.
- Rezultati kontrola s DMSO-om: vrijednosti RLU kontrole s rastvaračem trebale bi biti do 2,5 puta standardne devijacije srednje vrijednosti RLU prošle kontrole s rastvaračem.
- Eksperiment koji ne ispuni bilo koji kriterij prihvatljivosti treba odbaciti i ponoviti.

Detaljno ispitivanje

Obuhvata kriterijume prihvatljivosti iz ispitivanja za utvrđivanje raspona agonista i sljedeće:

- rezultate referentne norme: kriva koncentracija – odgovor referentne norme E2 trebala bi imati sigmoidni oblik i barem tri vrijednosti koje se nalaze na linearnom dijelu krive koncentracija – odgovor,
- rezultate pozitivne kontrole: vrijednosti RLU kontrole s metoksihlorom trebale bi biti veće od srednje vrijednosti DMSO-a uvećane za tri standardne devijacije srednje vrijednosti DMSO-a,
- eksperiment koji ne ispuni bilo koji kriterijum prihvatljivosti treba odbaciti i ponoviti.

Test antagonista

Ispitivanje za utvrđivanje raspona

- Smanjenje: smanjenje na ploči mjeri se tako da se prosječna vrijednost relativne jedinice svjetlosti (RLU) najveće referentne norme Ral/E2 podijeli prosječnom vrijednosti RLU

kontrole s DMSO-om. Obično se postiže petostruko smanjenje, ali u svrhu prihvaćanja smanjenje bi trebalo biti trostruko ili veće.
- Rezultati kontrole s E2: vrijednosti RLU kontrole s E2 trebale bi biti do 2,5 puta standardne devijacije srednje vrijednosti RLU prošle kontrole s E2.
- Rezultati kontrola s DMSO-om: vrijednosti RLU kontrole s DMSO-om trebale bi biti do 2,5 puta standardne devijacije srednje vrijednosti RLU prošle kontrole s rastvaračem.
- Eksperiment koji ne ispuni bilo koji kriterijum prihvatljivosti odbacuje se i ponavlja.

Detaljno ispitivanje

Obuhvata kriterijume prihvatljivosti iz ispitivanja za utvrđivanje raspona antagonista i sljedeće:

- rezultate referentne norme: kriva koncentracija – odgovor referentne norme Ral/E2 trebala bi imati sigmoidni oblik i barem tri vrijednosti koje se nalaze na linearnom dijelu krive koncentracija – odgovor,
- rezultate pozitivne kontrole: vrijednosti RLU kontrole s tamoksifenom/E2 trebale bi biti manje od srednje vrijednosti kontrole s E2 umanjene za tri standardne devijacije srednje vrijednosti kontrole s E2,
- eksperiment koji ne ispuni bilo koji kriterijum prihvatljivosti odbacuje se i ponavlja.

Referentne norme, pozitivne kontrole i kontrole s nosačem

Kontrola s nosačem (testovi agonista i antagonista)

Nosač koji se upotrebljava za rastvaranje ispitivanih hemikalija treba ispitati kao kontrolu s nosačem. Nosač koji se koristio tokom validacije testa VM7Luc ER TA bio je 1-postotni (v/v) dimetilsulfoksid (DMSO, CAS br. 67-68-5). Ako se upotrebljava nosač koji nije DMSO, sve referentne norme, kontrole i ispitivane hemikalije treba prema potrebi ispitati u istom nosaču.

Referentna norma (utvrđivanje raspona agonista)

Referentnu normu čini E2 (CAS br. 50-28-2). Za ispitivanje za utvrđivanje raspona referentna norma sastoji se od serijskog razrjeđivanja četiri koncentracija E2 (1,84 x 10–10, 4,59 x 10–11, 1,15 x 10–11 i 2,87 x 10–12 M), pri čemu se svaka koncentracija ispituje u dvostrukim porculanskim tanjirima sa udubljenjima.

Referentna norma (detaljno ispitivanje agonista)

E2 za detaljno ispitivanje sastoji se od serijskog razrjeđivanja u odnosu 1: 2 koje se sastoji od 11 koncentracija (u rasponu od 3,67 x 10–10 do 3,59 x 10–13 M) E2 u dvostrukim porculanskim tanjirima sa udubljenjima.

Referentna norma (utvrđivanje raspona antagonista)

Referentna norma kombinacija je supstanci Ral (CAS br. 84449-90-1) i E2 (CAS br. 50-28-2). Ral/E2 za ispitivanje za utvrđivanje raspona sastoji se od serijskog razrjeđivanja tri koncentracije supstanci Ral (3,06 x 10–9, 7,67 x 10–10 i 1,92 x 10–10 M) i fiksne koncentracije (9,18 × 10-11 M) E2 u dvostrukim porculanskim tanjirima sa udubljenjima.

Referentna norma (detaljno ispitivanje antagonista)

Ral/E2 za detaljno ispitivanje sastoji se od serijskog razrjeđivanja supstanci Ral u odnosu 1: 2 (u rasponu od 2,45 x 10–8 do 9,57 x 10–11 M) i fiksne koncentracije (9,18 × 10–11 M) E2, a obuhvata devet koncentracija supstanci Ral/E2 u dvostrukim porculanskim tanjirima sa udubljenjima.

Slaba pozitivna kontrola (agonist)

Slabu pozitivnu kontrolu čini 9,06 x 10–6 M p,p'-metoksihlora (metoksihlor; CAS br. 72-43-5) u EFM-u.

Slaba pozitivna kontrola (antagonist)

Slaba pozitivna kontrola sastoji se od tamoksifena (CAS br. 10540-29-1) 3,36 x 10–6 M s 9,18 × 10-11 M E2 u EFM-u.

Kontrola s E2 (samo za test antagonista)

Kontrolu s E2 čini 9,18 × 10–11 M E2 u EFM-u i koristi se kao osnovna negativna kontrola.

Multiplikacioni faktor indukcije (agonist)

Indukcija aktivnosti luciferaze referentne norme (E2) mjeri se tako da se prosječna vrijednost RLU najveće referentne norme E2 podijeli prosječnom vrijednosti RLU kontrole s DMSO-om i rezultat bi trebao biti veći od četvorostruke vrijednosti.

Multiplikacioni faktor smanjenja (antagonist)

Srednja aktivnost luciferaze za referentnu normu (Ral/E2) mjeri se tako da se prosječna vrijednost RLU najveće referentne norme Ral/E2 podijeli prosječnom vrijednosti RLU kontrole s DMSO-om i trebala bi biti veća od trostruke vrijednosti.

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija (vidjeti tabele 3. i 4.)

Nosač

Ispitivane hemikalije treba rastvoriti u rastvaraču koje rastvara tu ispitivanu hemikaliju te se može miješati s medijem za ćelije. Primjereni su nosači voda, etanol (čistoće od 95 % do 100 %) i DMSO. Ako se upotrebljava DMSO, ne bi se trebalo koristiti više od 1 % (v/v). Za sve bi nosače trebalo dokazati da najveći volumen koji se upotrebljava nije citotoksičan i da ne utiče na uspješnost testa. Referentne norme i kontrole rastvaraju se u 100-postotnom rastvraču i zatim se razrjeđuju na odgovarajuće koncentracije u EFM-u.

Priprema ispitivanih hemikalija

Ispitivane hemikalije rastvaraju se u 100-postotnom DMSO-u (ili odgovarajućem rastvaraču) i zatim se razrjeđuju na odgovarajuće koncentracije u EFM-u. Sve ispitivane hemikalije trebalo bi ostaviti tako da se njihova temperatura izjednači sa sobnom temperaturom prije nego što se rastvori i razrijedi. Za svaki eksperiment treba pripremiti svježi rastvor ispitivane hemikalije. U rastvorima ne smije biti primjetan talog ili zamućenje. Uzorci referentne norme i kontrole mogu se pripremati zbirno; međutim, za svaki eksperiment treba pripremiti svježu konačnu referentnu

normu, razrjeđivanja kontrole i ispitivane hemikalije i treba ih upotrijebiti u roku od 24 sata od pripreme.

Rastvorljivost i citotoksičnost: razmatranja o utvrđivanju raspona

Ispitivanje za utvrđivanje raspona sastoji se od serijskih razrjeđivanja u sedam tačaka u odnosu 1: 10 i sprovodi se dvaput. Ispitivane hemikalije prvo se ispituju do najveće koncentracije od 1 mg/ml (~ 1 mM) za test agonista i 20 µg/ml (~ 10 µM) za test antagonista. Eksperimenti za utvrđivanje raspona sprovode se kako bi se utvrdilo sljedeće:

— početne koncentracije ispitivane hemikalije koje će se upotrebljavati tokom detaljnog ispitivanja,
— razrjeđivanja ispitivane hemikalije (1: 2 ili 1: 5) koja će se upotrebljavati tokom detaljnog ispitivanja.

U protokole za test agonista i antagonista uključena je procjena vijabilnosti ćelija/citotoksičnosti te se ona uključuje u test za utvrđivanje raspona i detaljno ispitivanje. Metoda citotoksičnosti upotrijebljena za procjenu vijabilnosti ćelija tokom validacije testa VM7Luc ER TA bila je metoda odnosnog kvalitativnog vizualnog zapažanja; međutim, za utvrđivanje citotoksičnosti može se upotrijebiti kvantitativna metoda. Ne mogu se upotrebljavati podaci iz koncentracija ispitivane hemikalije koje uzrokuju smanjenje vijabilnosti veće od 20 %.

Izlaganje ispitivanoj hemikaliji i organizacija testne ploče

Ćelije se broje i nasađuju na ploče s kulturom tkiva s 96 udubljenja (2 × 105 ćelija po jažici) u EFM-u i inkubiraju se 24 sata kako bi se omogućilo da se ćelije pričvrste na ploču. EFM se uklanja i zamjenjuje ispitivanim i referentnim hemikalijama u EFM-u te se inkubira 19–24 sata. Posebnu pažnju treba posvetiti supstancama koje su jako isparljivo jer kontrolne posude sa udubljenjima koje se nalaze u blizini mogu dati lažno pozitivne rezultate. U tim slučajevima mogu pomoći „poklopci za ploče” kojima se efektivno izoluju pojedinačne posude sa udubljenjima pa se stoga preporučuje njihova upotreba.

Ispitivanja za utvrđivanje raspona

U ispitivanjima za utvrđivanje raspona upotrebljavaju se sve posude sa udubljenjima ploče s 96 udubljenja kako bi se dvaput ispitalo do šest ispitivanih hemikalija kao serijska razrjeđivanja u sedam tačaka u odnosu 1: 10 (vidjeti slike 1. i 2.).

— U ispitivanju za utvrđivanje raspona agonista upotrebljavaju se četiri koncentracije E2 u dva ponavljanja kao referentna norma i četiri posude sa udubljenjima s ponavljanjem za kontrolu s DMSO-om.
— U ispitivanju za utvrđivanje raspona antagonista upotrebljavaju se tri koncentracije supstanci Ral/E2 s 9,18 × 10-11 M E2 u dva ponavljanja kao referentna norma i tri posude sa udubljenjima s ponavljanjem za kontrole s E2 i DMSO-om.

Slika 1. **Raspored na ploči s 96 udubljenja kod ispitivanja za utvrđivanje raspona agonista**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Skraćenice: E2-1 do E2-4 = koncentracije referentne norme E2 (od visoke do niske); TC1-1 do TC1-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane hemikalije 1 (TC1); TC2-1 do TC2-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane hemikalije 2 (TC2); TC3-1 do TC3-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane hemikalije 3 (TC3); TC4-1 do TC4-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane hemikalije 4 (TC4); TC5-1 do TC5-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane hemikalije 5 (TC5); TC6-1 do TC6-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane hemikalije 6 (TC6); VC = kontrola s nosačem (DMSO (1 % v/v EFM-a)).

Slika 2. **Raspored na ploči s 96 udubljenja kod ispitivanja za utvrđivanje raspona antagonista**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Skraćenice: E2 = kontrola s E2; Ral-1 do Ral-3 = koncentracije raloksifena/referentne norme E2 (od visoke do niske); TC1-1 do TC1-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane hemikalije 1 (TC1); TC2-1 do TC2-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane hemikalije 2 (TC2); TC3-1 do TC3-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane hemikalije 3 (TC3); TC4-1 do TC4-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane hemikalije 4 (TC4); TC5-1 do TC5-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane hemikalije 5 (TC5); TC6-1 do TC6-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane hemikalije 6 (TC6); VC = kontrola s nosačem (DMSO [1 % v/v EFM-a]).

Napomena: Sve ispitivane hemikalije ispituju se s 9,18 × 10-11 M E2.

Preporučeni konačni volumen medija potrebnog za svaku kadicu iznosi 200 µl. Trebaju se upotrebljavati samo ispitne ploče kod kojih vijabilnost ćelija u svim porculanskim tanjirima sa udubljenjima iznosi 80 % ili više.

Utvrđivanje početne koncentracije za detaljno ispitivanje agonista detaljno je opisano u protokolu za agoniste. Ukratko, primjenjuju se sljedeći kriterijumi:

— ako na krivoj koncentracije ispitivane hemikalije nema tačaka koje su veće od srednje vrijednosti uvećane za tri standardne devijacije kontrole s DMSO-om, detaljno ispitivanje sprovesti će se upotrebom serijskog razrjeđivanja u 11 tačaka u odnosu 1: 2, počevši od najviše rastvorive koncentracije,
— ako na krivoj koncentracije ispitivane hemikalije postoje tačke koje su veće od srednje vrijednosti uvećane za tri standardne devijacije kontrole s DMSO-om, početna koncentracija koja se u detaljnom ispitivanju upotrebljava za plan razrjeđivanja od 11 tačaka treba biti jedan log viša od koncentracije koja je dala najvišu prilagođenu vrijednost RLU u ispitivanju za utvrđivanje raspona. Plan razrjeđivanja od 11 tačaka zasniva će se na odnosu 1: 2 ili 1: 5 u skladu sa sljedećim kriterijumima:
— serijsko razrjeđivanje od 11 tačaka u odnosu 1: 2 treba upotrijebiti ako će nastali raspon koncentracija obuhvatati cijeli raspon odgovora na osnovu krive koncentracija – odgovor koja je nastala u ispitivanju za utvrđivanje raspona. U suprotnom treba upotrijebiti razrjeđivanje u odnosu 1: 5,
— ako ispitivana hemikalija u ispitivanju za utvrđivanje raspona pokaže dvofazičnu krivu koncentracija – odgovor, obje faze treba utvrditi i u detaljnom ispitivanju.

Utvrđivanje početnih koncentracija za detaljno ispitivanje antagonista detaljno je opisano u protokolu za antagoniste. Ukratko, primjenjuju se sljedeći kriterijumi:

— ako na krivoj koncentracije ispitivane hemikalije nema tačaka koje su manje od srednje vrijednosti umanjene za tri standardne devijacije kontrole E2, detaljno ispitivanje sprovesti će se upotrebom serijskog razrjeđivanja u 11 tačaka u odnosu 1: 2, počevši od najviše rastvorive koncentracije,
— ako na krivoj koncentracije ispitivane hemikalije postoje tačke koje su manje od prosječne vrijednosti umanjene za tri standardne devijacije kontrole s E2, početna koncentracija koja se u detaljnom ispitivanju upotrebljava za plan razrjeđivanja od 11 tačaka treba biti jedna od sljedećih opcija:
— koncentracija koja daje najmanju prilagođenu vrijednost RLU u testu za utvrđivanje raspona,
— najviša rastvorljiva koncentracija (vidjeti protokol za antagoniste, slika 14-2.),
— najniža citotoksična koncentracija (vidjeti protokol za antagoniste, slika 14-3. za povezani primjer),
— plan razrjeđivanja od 11 tačaka zasnivat će se na serijskom razrjeđivanju u odnosu 1: 2 ili 1: 5 u skladu sa sljedećim kriterijumima:
— serijsko razrjeđivanje od 11 tačaka u odnosu 1: 2 treba upotrijebiti ako će nastali raspon koncentracija obuhvatati cijeli raspon odgovora na osnovu krive koncentracija – odgovor koja je nastala u ispitivanju za utvrđivanje raspona. U suprotnom treba upotrijebiti razrjeđivanje u odnosu 1: 5.

Detaljno ispitivanje

Detaljno ispitivanje sastoji se od serijskih razrjeđivanja od 11 tačaka (serijska razrjeđivanja u odnosu 1: 2 ili 1: 5 na osnovu početne koncentracije za kriterijume detaljnih testova), pri čemu se svaka koncentracija ispituje u trostrukim porculanskim tanjirima sa udubljenjima ploče s 96 udubljenja (vidjeti slike 3. i 4.).

— U detaljnom ispitivanju agonista kao referentna norma upotrebljava se 11 koncentracija E2 u dva ponavljanja. Svaka ploča uključuje četiri posude sa udubljenjima s

ponavljanjem za kontrolu s DMSO-om i četiri posude sa udubljenjima s ponavljanjem za kontrolu s metoksihlorom (9,06 x 10–6 M).

— U detaljnom ispitivanju antagonista kao referentna norma upotrebljava se devet koncentracija supstanci Ral/E2 s 9,18 × 10-11 M E2 u dva ponavljanja, s četiri posude sa udubljenjima s ponavljanjem za kontrolu 9,18 x 10–11 M E2, četiri posude sa udubljenjima s ponavljanjem za kontrolu s DMSO-om i četiri posude sa udubljenjima s ponavljanjem za tamoksifen 3,36 x 10-6 M.

Slika 3. **Raspored na ploči s 96 udubljenja kod detaljnog ispitivanja agonista**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	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

Skraćenice: TC1-1 do TC1-11 = koncentracije ispitivane hemikalije 1 (od visoke do niske); TC2-1 do TC2-11 = koncentracije ispitivane hemikalije 2 (od visoke do niske); E2-1 do E2-11 = koncentracije referentne norme E2 (od visoke do niske); Meth = slaba pozitivna kontrola p,p' metoksihlor; VC = kontrola s nosačem DMSO (1 % v/v) u EFM-u.

Slika 4. **Raspored na ploči s 96 udubljenja kod detaljnog ispitivanja antagonista**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Skraćenice: E2 = kontrola s E2; Ral-1 do Ral-9 = koncentracije raloksifena/referentne norme E2 (od visoke do niske); Tam = slaba pozitivna kontrola s tamoksifenom/E2; TC1-1 do TC1-11 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane hemikalije 1 (TC1); TC2-1 do TC2-11 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane hemikalije 2 (TC2); VC = kontrola s nosačem (DMSO [1 % v/v EFM-a]).

Napomena: kako je navedeno, sve referentne i ispitivane posude sa udubljenjima sadrže fiksnu koncentraciju E2 (9,18 x 10–11 M).

Ponavljanja detaljnih ispitivanja za istu hemikaliju treba sprovoditi na različite dane kako bi se osigurala nezavisnost. Treba sprovesti barem dva detaljna ispitivanja. Ako su rezultati testova kontradiktorni (npr. jedan je test pozitivan, a drugi negativan) ili ako jedan od testova nije primjeren, treba sprovesti treći dodatni test.

Mjera luminiscencije

Luminiscencija se mjeri u rasponu od 300 do 650 nm, upotrebom ubrizgavajućeg luminometra sa softverom koji sastojci volumen ubrizgavanja i interval mjerenja. Emisija svjetlosti iz svake posude sa udubljenjima izražava se kao RLU po posudi sa udubljenjem.

ANALIZA PODATAKA

Utvrđivanje vrijednosti EC_{50}/IC_{50}

Vrijednost EC50 (pola najveće efikasne koncentracije ispitivane hemikalije [agonisti]) i vrijednost IC50 (pola najveće inhibitorne koncentracije ispitivane hemikalije [antagonisti]) utvrđuju se na osnovu podataka o koncentraciji i odgovoru. Za ispitivane hemikalije koje su pozitivne pri jednoj koncentraciji ili njih više, koncentracija ispitivane hemikalije koja uzrokuje pola najvećeg odgovora (IC50 ili EC50) računa se upotrebom analize Hillove funkcije ili primjerene alternative. Hillova funkcija logistički je matematički model s četiri parametra kojim se povezuju koncentracija ispitivane hemikalije i odgovor (obično u obliku sigmoidne krive) primjenom sljedeće jednačine:

pri čemu je:

X= logaritam koncentracije

Y= odgovor (tj. RLU-ovi)

dno= najmanji odgovor

vrh= najveći odgovor

lg EC50 (ili lg IC50) = logaritam od X kao odgovor koji se nalazi tačno između vrha i dna

Hillov nagib= kosina krive.

Modelom se računa najbolja vrijednost za parametre vrha, dna, Hillova nagiba te vrijednosti IC50 i EC50. Za izračunavanje vrijednosti EC50 i IC50 treba upotrijebiti primjereni statistički softver (npr. statistički softver Graphpad PrismR).

Utvrđivanje netipičnih vrijednosti

Dobro statističko prosuđivanje moglo bi se olakšati uključivanjem (ali ne i isključivo) Q testa (vidjeti protokole za agoniste i antagoniste o utvrđivanju „neupotrebljivih” udubljenja koje će se isključiti iz analiza podataka).

Za ponovljene uzorke referentne norme E2 (dva uzorka) bilo koja prilagođena vrijednost RLU za ponovljeni uzorak pri određenoj koncentraciji E2 smatra se netipičnom vrijednosti ako je za više od 20 % veća ili manja od prilagođene vrijednosti RLU te koncentracije iz baze prošlih podataka.

Prikupljanje i prilagođavanje podataka luminometra za ispitivanje za utvrđivanje raspona

Neobrađene podatke iz luminometra treba prenijeti u predložak proračunske tabele koja je izrađena za test. Treba utvrditi postoje li netipične tačke koje treba ukloniti. (Vidjeti kriterijume prihvatljivosti ispitivanja za parametre koji se utvrđuju u analizama.) Trebalo bi sprovesti sljedeća izračunavanja.

Agonist

Korak 1. Izračunati srednju vrijednost za kontrolu s nosačem DMSO.
Korak 2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem DMSO od vrijednosti svake posude sa udubljenjima kako bi se podaci normalizuju.
Korak 3. Izračunati srednji multiplikacioni faktor indukcije za referentnu normu (E2).
Korak 4. Izračunati srednju vrijednost EC50 za ispitivane hemikalije.

Antagonist

Korak 1. Izračunati srednju vrijednost za kontrolu s nosačem DMSO.
Korak 2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem DMSO od vrijednosti svake posude sa udubljenjima kako bi se podaci normalizuju.
Korak 3. Izračunati srednji multiplikacioni faktor smanjenja za referentnu normu (Ral/E2).
Korak 4. Izračunati srednju vrijednost za referentnu normu E2.
Korak 5. Izračunati srednju vrijednost IC50 za ispitivane hemikalije.

Prikupljanje i prilagođavanje podataka luminometra za detaljna ispitivanja

Neobrađene podatke iz luminometra treba prenijeti u tabeli koja je izrađena za test. Treba utvrditi postoje li netipične tačke koje treba ukloniti. (Vidjeti kriterijume prihvatljivosti ispitivanja za parametre koji se utvrđuju u analizama.) Sprovode se sljedeća izračunavanja:

Agonist

Korak 1. Izračunati srednju vrijednost za kontrolu s nosačem DMSO.
Korak 2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem DMSO od vrijednosti svake posude sa udubljenjima kako bi se podaci normalizuju.
Korak 3. Izračunati srednji multiplikacioni faktor indukcije za referentnu normu (E2).
Korak 4. Izračunati srednju vrijednost EC50 za E2 i ispitivane hemikalije.
Korak 5. Izračunati srednju prilagođenu vrijednost RLU za metoksihlor.

Antagonist

Korak 1. Izračunati srednju vrijednost za kontrolu s nosačem DMSO.
Korak 2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem DMSO od vrijednosti svake posude sa udubljenjima kako bi se podaci normalizuju.
Korak 3. Izračunati srednji multiplikacioni faktor indukcije za referentnu normu (Ral/E2).
Korak 4. Izračunati srednju vrijednost IC50 za Ral/E2 i ispitivane hemikalije.
Korak 5. Izračunati srednju prilagođenu vrijednost RLU za tamoksifen.
Korak 6.Izračunati srednju vrijednost za referentnu normu E2.

Kriterijumi za tumačenje podataka

Test VM7Luc ER TA dio je pristupa snage dokaza kako bi se pomoglo utvrditi prioritetne supstance za in vivo ispitivanje endokrine disrupcije. Dio ovog postupka za utvrđivanje prioriteta će biti klasifikovanje ispitivane hemikalije kao pozitivne ili negativne u pogledu agonističkog ili antagonističkog djelovanja na estrogenski receptor. Kriterijumi za donošenje pozitivne i negativne odluke koji su upotrijebljeni u validacionoj studiji testa VM7Luc ER TA opisani su u tabeli 1.

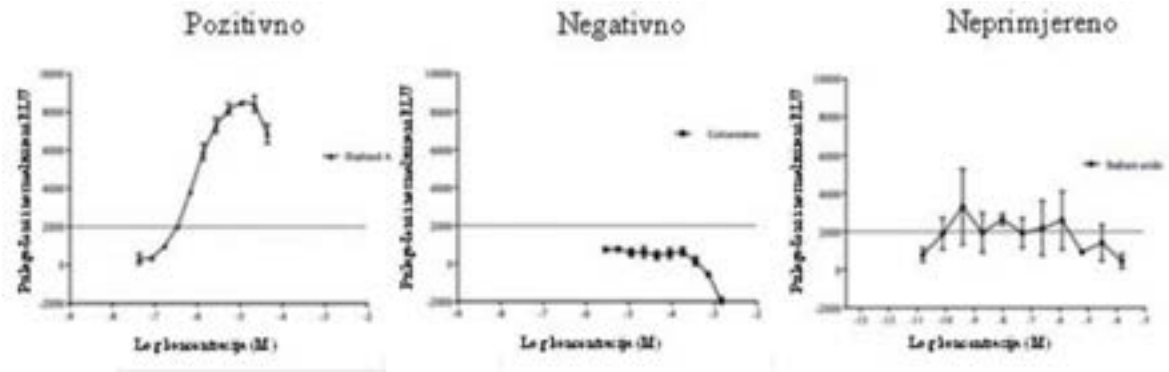
Tabela 1. **Kriterijumi za donošenje pozitivne i negativne odluke**

AGONISTIČKO DJELOVANJE	
Pozitivno	—Sve ispitivane hemikalije klasifikovane kao *pozitivne na* agonističko djelovanje na estrogenski receptor trebaju imati krivu koncentracija – odgovor koja se sastoji od osnovice, nakon koje dolazi pozitivan nagib i završava platoom ili najvišom tačkom. U nekim se slučajevima mogu utvrditi samo dva svojstva (osnovica – nagib ili nagib – najviša tačka). —Linija koja označava pozitivan nagib treba da sadrži najmanje tri tačke sa kolonama greške koje se ne preklapaju (srednja vrijednost ± standardna devijacija). Isključene su tačke koje čine osnovicu, ali linearni dio krive može uključivati najvišu tačku ili prvu tačku platoa. —Za klasifikovanje hemikalije kao pozitivne potrebna je amplituda odgovora (razlika između osnovice i najviše tačke) od najmanje 20 % najveće vrijednosti za referentnu normu, E2 (tj. 2 000 RLU-ova ili više ako je najveća vrijednost odgovora referentnih normi [E2] prilagođena na 10 000 RLU-ova). —Ako je moguće, treba izračunati vrijednost EC_{50} za svaku pozitivnu ispitivanu hemikaliju.
Negativno	Prosječni prilagođeni RLU za određenu koncentraciju jednak je ili manji od srednje vrijednosti RLU kontrole s DMSO-om uvećane za tri standardne devijacije RLU-a DMSO-a.
Neprimjereno	Podaci koji se ne mogu tumačiti kao valjani za pokazivanje prisutnosti ili izostanka aktivnosti zbog velikih kvalitativnih ili kvantitativnih ograničenja smatraju se neprimjerenima i ne mogu se koristiti za utvrđivanje je li ispitivana hemikalija pozitivna ili negativna. Hemikalije treba ponovno ispitati.
ANTAGONISTIČKO DJELOVANJE	
Pozitivno	—Podaci o ispitivanoj hemikaliji daju krivu koncentracija – odgovor koji se sastoji od osnovice, nakon koje dolazi negativan nagib. —Linija koja označava negativan nagib treba da sadrži najmanje tri tačke sa kolonama greške koje se ne preklapaju; isključene su tačke koje čine

	osnovicu, ali linearni dio krive može uključivati prvu tačku platoa. —Trebalo bi postojati smanjenje aktivnosti od najmanje 20 % najveće vrijednosti za referentnu normu, supstanca Ral/E2 (tj. 8 000 RLU-ova ili manje ako je najveća vrijednost odgovora referentne norme [Ral/E2] prilagođena na 10 000 RLU-ova). —Najviše koncentracije ispitivane hemikalije koje nisu citotoksične trebale bi biti 1 x 10^{-5} M ili niže. —Ako je moguće, treba izračunati vrijednost IC_{50} za svaku pozitivnu ispitivanu hemikaliju.
Negativno	Sve tačke iznad su vrijednosti EC_{80} (80 % odgovora E2 ili 8 000 RLU-ova), pri koncentracijama nižima od 1,0 × 10^{-5} M.
Neprimjereno	Podaci koji se ne mogu tumačiti kao valjani za pokazivanje prisutnosti ili izostanka aktivnosti zbog velikih kvalitativnih ili kvantitativnih ograničenja smatraju se neprimjerenima i ne mogu se koristiti za utvrđivanje je li ispitivana hemikalija pozitivna ili negativna. Hemikaliju treba ponovno ispitati.

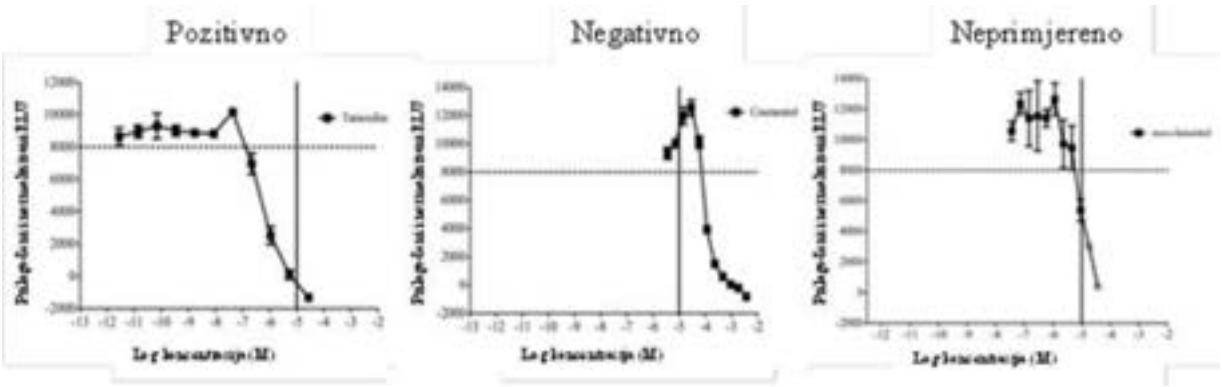
Ako je moguće, pozitivne rezultate karakterizisaće i odnos efekta i koncentracija pri kojoj dolazi do efekta. Primjeri pozitivnih, negativnih i neprimjerenih podataka prikazani su na slikama 5. i 6.

***Slika 5.*Primjeri agonista: pozitivni, negativni i neprimjereni podaci**



Isprekidana linija pokazuje 20 % odgovora E2, 2 000 prilagođenih i normaliziranih RLU-ova.

***Slika 6.* Primjeri antagonista: pozitivni, negativni i neprimjereni podaci**



Isprekidana linija pokazuje 80 % odgovora Ral/E2, 8 000 prilagođenih i normaliziranih RLU-ova.

Puna linija pokazuje 1,00 × 10–5 M. Da bi se odgovor smatrao pozitivnim, treba se nalaziti ispod linije 8 000 RLU-ova i pri koncentracijama nižima od 1,00 × 10–5 M.

Koncentracije označene zvjezdicama na grafikonu mezo-heksestrola pokazuju rezultate vijabilnosti od „2" ili veće.

Rezultati ispitivanja za mezo-heksestrol smatraju se neprimjerenim podacima jer se do jedinog odgovora koji se nalazi ispod 8 000 RLU-ova dolazi pri 1,00 × 10–5 M.

Vrijednosti EC50 i IC50 mogu se izračunati primjenom Hillove funkcije s četiri parametra (više pojedinosti potražiti u protokolima za agoniste i antagoniste. Ispunjavanje kriterijuma prihvatljivosti znači da sistem pravilno funkcioniše, ali time se ne osigurava da će svaki pojedinačni ciklus dati tačne rezultate. Ponavljanje rezultata prvog ciklusa najbolje je garantuje toga da su dobijeni tačni podaci

IZVJEŠTAJ O ISPITIVANJU

LITERATURA

Dodatak 4.

TEST TRANSAKTIVACIJE STABILNO TRANSFICIRANOG LJUDSKOG ESTROGENSKOG RECEPTORA-A ZA OTKRIVANJE ESTROGENSKOG AGONISTIČKOG I ANTAGONISTIČKOG DJELOVANJA HEMIKALIJA PRIMJENOM ĆELIJSKE LINIJE ERA CALUX

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA (VIDJETI I OPŠTI UVOD)

U testu transaktivacije ERα CALUX upotrebljava se humana ćelijska linija U2OS radi otkrivanja estrogenskog agonističkog i antagonističkog djelovanja kojim posreduje ljudski estrogenski receptor alfa (hERα). Validaciona studija biotesta sa stabilno transficiranim ćelijama ERα CALUX koju je sproveo BioDetection Systems BV pokazala je relevantnost i pouzdanost testa za predviđenu svrhu. Ćelijska linija ERα CALUX eksprimira samo stabilno transficirani humani ERα.

Ovaj je test posebno osmišljen za otkrivanje transaktivacije kojom posreduje hERα mjerenjem bioluminiscencije kao krajnje tačke. Bioluminiscencija se često upotrebljava u biotestovima zbog visokog odnosa signala i šuma.

Postoje izvještaja o tome da koncentracije fitoestrogena veće od 1 μM pretjerano aktiviraju reporterski gen za luciferazu, što dovodi do luminiscencije kojom ne posreduju receptori. Stoga veće koncentracije fitoestrogena ili drugih sličnih jedinjenjeeva koji mogu pretjerano aktivirati ekspresiju luciferaze treba pažljivo ispitati testovima transaktivacije stabilno transficiranog estrogenskog receptora

NAČELO TESTA (VIDJETI I OPŠTI UVOD)

POSTUPAK

Biotest se upotrebljava kako bi se procijenilo vezivanje estrogenskog receptora i liganda te kasnija translokacija kompleksa receptora i liganda u jezgru. U jezgri se kompleks receptora i liganda veže na specifične elemente DNK odgovora i transaktivira reporterski gen za luciferazu svitaca, što dovodi do povećane ćelijske ekspresije enzima luciferaze. Nakon dodavanja supstrata luciferaze luciferinu, luciferin se pretvara u bioluminescentan proizvod. Proizvedeno svjetlo može se jednostavno uočiti i kvantifikovati s pomoću luminometra.

U ispitnom sistemu upotrebljavaju se stabilno transficirane ćelije ERα CALUX. Ćelije ERα CALUX potječu od ćelijske linije U2OS humanog osteoblastičnog osteosarkoma. Humane ćelije U2OS stabilno su transficirane konstruktima 3xHRE-TATA-Luc i pSG5-neo-hERα upotrebom metode zajedničkog taloženja s kalcijum fosfatom. Ćelijska linija U2OS odabrana je kao najbolji kandidat za reportersku ćelijsku liniju koja reaguju na estrogen (i ostale steroidne hormone) na osnovu zapažanja da ćelijska linija U2OS pokazuje slabu endogenu aktivnost receptora ili je uopšte ne pokazuje. Odsustvo endogenih receptora procijenjeno je upotrebom samo reporterskih plazmida za luciferazu, koji nisu pokazali nikakvu aktivnost kada su dodani ligandi na receptor. Nadalje, ta je ćelijska linija dala snažne odgovore posredovane hormonima kada su privremeno uvedeni srodni receptori.

Ispitivanje hemikalija radi utvrđivanja estrogene ili antiestrogene aktivnosti upotrebom ćelijske linije ERα CALUX uključuje ciklus predizbora i detaljne cikluse. Tokom ciklusa predizbora utvrđuju se rastvorljivost, citotoksičnost i raspon koncentracija ispitivanih hemikalija za detaljno ispitivanje. Tokom detaljnih ciklusa rasponi koncentracija ispitivanih hemikalija ispituju se biotestovima ERα CALUX, nakon čega slijedi klasifikovanje ispitivanih hemikalija u pogledu agonizma ili antagonizma.

Ukratko, ispitivana hemikalija smatra se pozitivnom za agonizam ako barem dvije uzastopne koncentracije ispitivane hemikalije pokažu odgovor koji iznosi 10 % najvećeg odgovora referentne norme 17β-estradiol ili više (PC10). Ispitivana hemikalija smatra se pozitivnom za antagonizam ako barem dvije uzastopne koncentracije ispitivane hemikalije pokažu odgovor koji iznosi 80 % najvećeg odgovora referentne norme tamoksifena ili manje (PC80).

Ćelijske linije

Za test bi se trebala upotrebljavati stabilno transfikovana ćelijska linija U2OS ERα CALUX. Ćelijska linija može se dobiti od društva BioDetection Systems BV, Amsterdam, Holandija, sklapanjem tehničkog sporazuma o licenciranju.

Treba upotrebljavati samo ćelijske kulture u kojima nema mikoplazme. Šarže ćelija koje se upotrebljavaju trebaju imati potvrdu da nisu kontaminirane mikoplazmom ili prije upotrebe treba sprovesti test na mikoplazmu. Za osjetljivo otkrivanje zaraze mikoplazmom treba upotrijebiti RT-PCR (lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu).

Stabilnost ćelijske linije

Kako bi se održali stabilnost i integritet ćelija CALUX, ćelije treba čuvati u tečnom azotu (–80 °C). Nakon odmrzavanja ćelija kako bi se razvila nova kultura, ćelije treba supkultivirati barem dva puta prije nego što ih se upotrijebi za procjenu estrogenskog agonističkog i antagonističkog djelovanja hemikalija. Ćelije se ne bi se trebale supkultivirati za više od 30 pasaža.

Kako bi se pratila stabilnost ćelijske linije tokom vremena, treba potvrditi osjetljivost ispitnog sistema za agonizam i antagonizam procjenom vrijednosti EC50 ili IC50 referentne norme. Osim toga, treba pratiti relativnu indukciju pozitivnog kontrolnog uzorka (PC) i negativnog kontrolnog uzorka (NC). Rezultati bi trebali biti u skladu s kriterijumima prihvatljivosti za agonistički (tabela 3.C) ili antagonistički biotest ERα CALUX (tabela 4.C). Referentne norme, pozitivne i negativne kontrole navedene su u tabeli 1. za agonistički oblik i tabeli 2. za antagonistički oblik.

Ćelijska kultura i uslovi nasađivanja

Ćelije U2OS treba uzgajati u medijumu za uzgoj (medij DMEM/F12 (1: 1) s fenol crvenom kao indikatorom pH-vrijednosti, obogaćenom fetalnim goveđim serumom (7,5 %), neesencijalnim aminokiselinama (1%), s 10 jedinica/ml penicilina, streptomicina i geneticina (G-418) kao markerom za selekciju). Ćelije treba staviti u inkubator CO2 (5 % CO2) na 37 °C uz 100-postotnu vlažnost. Kada ćelije dosegnu konfluenciju od 85 do 95 %, treba ih supkultivirati ili pripremiti za nasađivanje na mikrotitracione ploče s 96 udubljenja. U poslednjem slučaju, ćelije treba ponovno suspendovati u koncentraciji 1 × 105 ćelija/ml u medijumu za test bez estrogena (DMEM/F12 (1: 1) bez fenol crvene, obogaćenom fetalnim goveđim serumom tretiranim ugljem premazanim dekstranom (5 % v/v), neesencijalnim aminokiselinama (1 % v/v), s 10 jedinica/ml penicilina i streptomicina) te nasaditi u posude sa udubljenjima mikrotitracionih ploča s 96 udubljenja (100 µl homogenizirane suspenzije ćelija). Ćelije treba predinkubirati u inkubatoru CO2 (5 % CO2, 37 °C, 100-postotna vlažnost) 24 sata prije izlaganja. U plastičnoj opremi ne smije biti estrogena.

Kriterijumi prihvatljivosti

Agonističko i antagonističko djelovanje ispitivanih hemikalija ispituju se u nizovima ispitivanja. Niz ispitivanja sastoji se od najviše šest mikrotitracionih ploča. Svaki niz ispitivanja sadrži najmanje jednu cijelu seriju razrjeđivanja referentne norme, pozitivan kontrolni uzorak, negativan kontrolni uzorak i kontrole s rastvaračem. Na slikama 1. i 2. prikazan je raspored ploča za nizove ispitivanja agonizma i antagonizma.

Svako razrjeđivanje referentnih normi, ispitivane hemikalije, sve kontrole s rastvaračem te pozitivne i negativne kontrole treba analizirati u tri ponavljanja. Svaka analiza triju ponavljanja treba ispuniti zahtjeve navedene u tabeli 3.A i tabeli 4.A.

Cijela serija razrjeđivanja referentne norme (17β-estradiol za agonizam; tamoksifen za antagonizam) mjeri se na prvoj ploči u svakom nizu ispitivanja. Kako bi se rezultati analize preostalih pet mikrotitracionih ploča mogli uporediti s prvom mikrotitracijskom pločom koja

sadrži cijelu krivu koncentracija – odgovor referentne norme, sve bi ploče trebale da sadrži tri kontrolna uzorka: kontrolu s rastvaračem, najvišu koncentraciju ispitane referentne norme i približnu koncentraciju EC50 (agonizam) ili IC50 (antagonizam) referentne norme. Odnos prosječnih kontrolnih uzoraka na prvoj ploči i preostalih pet ploča treba ispunjavati zahtjeve navedene u tabeli 3.C (agonizam) ili tabeli 4.C (antagonizam).

Za sve mikrotitracione ploče u nizu ispitivanja računa se z-faktor (10.). Z-faktor treba izračunati upotrebom odgovora pri najvišoj i najnižoj koncentraciji referentne norme. Mikrotitraciona ploča smatra se valjanom ako ispunjava zahtjeve kako su navedeni u tabeli 3.C (agonizam) ili tabeli 4.C (antagonizam).

Referentna norma treba pokazati sigmoidnu krivu doza – odgovor. EC50 ili IC50 izvedeni iz odgovora serije razrjeđivanja referentne norme trebaju ispunjavati zahtjeve kako su navedeni u tabeli 3.C (agonizam) ili tabeli 4.C (antagonizam).

Svaki niz ispitivanja treba da sadrži pozitivni i negativni kontrolni uzorak. Izračunana relativna indukcija i pozitivnog i negativnog kontrolnog uzorka treba ispunjavati zahtjeve kako su navedeni u tabeli 3.C (agonizam) ili tabeli 4.C (antagonizam).

Tokom svih mjerenja faktor indukcije najviše koncentracije referentne norme treba izmjeriti tako da se prosječni najviši odgovor u obliku relativne jedinice svjetlosti (RLU) na referentnu normu 17β-estradiol podijeli prosječnim odgovorom u obliku RLU-a na referentnu kontrolu s rastvaračem. Taj faktor indukcije treba ispuniti minimalne zahtjeve za multiplikacioni faktor indukcije kako je navedeno u tabeli 3.C (agonizam) ili tabele 4.C (antagonizam).

Valjanima se smatraju samo mikrotitracione ploče koje ispunjavaju sve prethodno navedene kriterijume prihvatljivosti i samo se one mogu koristiti za procjenu odgovora ispitivanih hemikalija.

Kriterijumi prihvatljivosti primjenjivi su i na predizbor i na detaljne cikluse.

Tabela 1. **Koncentracije referentne norme, pozitivne kontrole (PC) i negativne kontrole (NC) za agonistički biotest CALUX**

	Supstanca	**CAS br.**	**Raspon ispitivanja (M)**
Referentna norma	17β-estradiol	50-28-2	$1 * 10^{-13}$ – $1 * 10^{-10}$
Pozitivna kontrola (PC)	17α-metiltestosteron	58-18-4	$3 * 10^{-6}$
Negativna kontrola (NC)	kortikosteron	50-22-6	$1 * 10^{-8}$

Tabela 2. **Koncentracije referentne norme, pozitivne kontrole (PC) i negativne kontrole (NC) za antagonistički biotest CALUX**

	Supstanca	CAS br.	Raspon ispitivanja (M)
Referentna norma	tamoksifen	10540-29-1	$3 * 10^{-9} – 1 * 10^{-5}$
Pozitivna kontrola (PC)	4-hidroksitamoksifen	68047-06-3	$1 * 10^{-9}$
Negativna kontrola (NC)	resveratrol	501-36-0	$1 * 10^{-5}$

***Tabela 3.*Kriterijumi prihvatljivosti za agonistički biotest ERα CALUX**

A – pojedinačni uzorci na ploči		Kriterijum
1	Najveći % standardne devijacije udubljenja s tri ponavljanja (za NC, PC, svako razrjeđivanje ispitivane hemikalije i referentne norme, osim C0)	< 15 %
2	Najveći % standardne devijacije udubljenja s tri ponavljanja (za kontrole s rastvaračem referentne norme i ispitivane hemikalije (C0, SC))	< 30 %
3	Najveće propuštanje LDH-a, kao mjera citotoksičnosti	< 120 %
B – unutar jedne mikrotitracione ploče		
4	Odnos kontrole s rastvaračem referentne norme (C0; ploča 1) i kontrole s rastvaračem ispitivane hemikalije (SC; od ploče 2 do ploče x)	0,5 do 2,0
5	Odnos približ. vrijednosti EC_{50} i najviših koncentracija referentne norme na ploči 1 i približ. vrijednosti EC_{50} i najviših koncentracija referentne norme na ploči 2 do ploče x (C4, C8)	0,70 do 1,30
6	Z-faktor za svaku ploču	> 0,6
C – unutar jednog niza analiza (sve ploče u jednom nizu)		
7	Sigmoidna kriva referentne norme	Da (17ß-estradiol)
8	Raspon EC_{50} referentne norme 17ß-estradiol	$4 * 10^{-12} – 4 * 10^{-11}$ M

9	Najmanji multiplikacioni faktor indukcije najviše koncentracije 17ß-estradiola, s obzirom na kontrolu s rastvaračem referentne norme	5
10	Relativna indukcija (%) PC-a	> 30 %
11	Relativna indukcija (%) NC-a	< 10 %

Približ. približno; PC: pozitivna kontrola; NC: negativna kontrola; SC: kontrola s rastvaračem ispitivane hemikalije; C0: kontrola s rastvaračem referentne norme; SD: standardna devijacija; LDH: laktat dehidrogenaza.

***Tabela 4.*Kriterijumi prihvatljivosti za antagonistički biotest ERα CALUX**

A – pojedinačni uzorci na ploči		**Kriterijum**
1	Najveći % standardne devijacije trostrukih udubljenja (za NC, PC, svako razrjeđivanje ispitivane hemikalije i referentne norme, kontrolu s rastvaračem (C0))	< 15 %
2	Najveći % standardne devijacije trostrukih udubljenja (za kontrolu s nosačem (VC) i najvišu koncentraciju referentne norme (C8))	< 30 %
3	Najveće propuštanje LDH-a, kao mjera citotoksičnosti	< 120 %
B – unutar jedne mikrotitracione ploče		
4	Odnos kontrole s rastvaračem referentne norme (C0; ploča 1) i kontrole s rastvaračem ispitivane hemikalije (SC; od ploče 2 do ploče x)	0,70 do 1,30
5	Odnos približ. vrijednosti IC_{50} koncentracija referentne norme na ploči 1 i približ. vrijednosti IC_{50} koncentracija referentne norme na ploči 2 do ploče x (C4)	0,70 do 1,30
6	Odnos najviših koncentracija referentne norme na ploči 1 i najviših koncentracija referentne norme na ploči 2 do ploče x (C8)	0,50 do 2,0
7	Z-faktor za svaku ploču	> 0,6
C – unutar jednog niza analiza (sve ploče u jednom nizu)		
8	Sigmoidna kriva referentne norme	Da (tamoksifen)

9	Raspon IC_{50} referentne norme (tamoksifen)	$1 * 10^{-8}$ – $1 * 10^{-7}$ M
10	Najmanji multiplikacioni faktor indukcije kontrole s rastvaračem referentne norme, s obzirom na najvišu koncentraciju tamoksifena	2,5
11	Relativna indukcija (%) PC-a	< 70 %
12	Relativna indukcija (%) NC-a	> 85 %

Približ. približno; PC: pozitivna kontrola; NC: negativna kontrola; VC: kontrola s nosačem (kontrola s rastvaračem bez fiksne koncentracije referentne norme agonista); SC: kontrola s rastvaračem ispitivane hemikalije; C0: kontrola s rastvaračem referentne norme; SD: standardna devijacija; LDH: laktat dehidrogenaza.

Kontrola s rastvaračem/nosačem, referentne norme, pozitivne kontrole, negativne kontrole

I za ciklus predizbora i za detaljne cikluse treba upotrebljavati istu kontrolu s rastvaračem/nosačem, referentne norme, pozitivne i negativne kontrole. Osim toga, koncentracija referentnih normi, pozitivnih i negativnih kontrola treba biti ista.

Kontrola s rastvaračem

Rastvarač koje se upotrebljava za rastvaranje ispitivanih hemikalija treba ispitati kao kontrolu s rastvaračem. Tokom validacije biotesta ERα CALUX kao nosač se upotrebljavao dimetilsulfoksid (DMSO, 1 % (v/v); CAS br. 67-68-5). Ako se upotrebljava rastvarač koje nije DMSO, sve referentne norme, kontrole i ispitivane hemikalije treba ispitati u istom nosaču. Potrebno je napomenuti da kontrola s rastvaračem za antagonističke studije sadrži fiksnu koncentraciju 17β-estradiola – referentne norme agonista (približno koncentracija EC50). Kako bi se ispitalo rastvarač koje se upotrebljava u antagonističkim studijama, treba pripremiti i ispitati kontrolu s nosačem.

Kontrola s nosačem (antagonizam)

Kod ispitivanja antagonizma medij za test obogaćuje se fiksnom koncentracijom 17β-estradiola – referentne norme agonista (približno koncentracija EC50). Kako bi se ispitalo rastvarač koje se upotrebljava za rastvaranje ispitivanih hemikalija za antagonizam, treba pripremiti medij za test bez fiksne koncentracije 17β-estradiola – referentne norme agonista. Taj se kontrolni uzorak označava kao kontrola s nosačem. Tokom validacije biotesta ERα CALUX kao nosač se upotrebljavao dimetilsulfoksid (DMSO, 1 % (v/v); CAS br. 67-68-5). Ako se upotrebljava rastvarač koje nije DMSO, sve referentne norme, kontrole i ispitivane hemikalije treba ispitati u istom nosaču.

Referentne norme

Referentnu normu agonista čini 17β-estradiol (tabela 1.). Referente norme sastoje se od serije razrjeđivanja osam koncentracija 17β-estradiola (1 * 10–13, 3 * 10–13, 1 * 10–12, 3 * 10–12, 6 * 10–12, 1 * 10–11, 3 * 10–11, 1 * 10–10 M).

Referentnu normu antagonista čini tamoksifen (tabela 2.). Referente norme sastoje se od serije razrjeđivanja osam koncentracija tamoksifena (3 * 10–9, 1 * 10–8, 3 * 10–8, 1 * 10–7, 3 * 10–7, 1 * 10–6, 3 * 10–6, 1 * 10–5 M). Svaka koncentracija referentne norme antagonista inkubira se zajedno s fiksnom koncentracijom 17β-estradiola – referentnom normom agonista (3 * 10–12 M).

Pozitivna kontrola

Pozitivnu kontrolu za agonističke studije čini 17α-metiltestosteron (tabela 1.).

Pozitivnu kontrolu za antagonističke studije čini 4-hidroksitamoksifen (tabela 2.). Pozitivna kontrola antagonista inkubira se zajedno s fiksnom koncentracijom 17β-estradiola – referentnom normom agonista (3 * 10–12 M).

Negativna kontrola

Negativnu kontrolu za agonističke studije čini kortikosteron (tabela 1.).

Negativnu kontrolu za antagonističke studije čini resveratrol (tabela 2.). Negativna kontrola antagonista inkubira se zajedno s fiksnom koncentracijom 17β-estradiola – referentnom normom agonista (3 * 10–12 M).

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija (vidjeti tabele 3. i 4.)

Nosač

Rastvarač koje se upotrebljava za rastvaranje ispitivanih hemikalija treba potpuno rastvoriti ispitivanu hemikaliju i mora se moći miješati s medijem za ćelije. Primjerena su rastvarača DMSO, voda i etanol (čistoće od 95 % do 100 %). Ako se kao rastvarač upotrebljava DMSO, najviša koncentracija DMSO-a tokom inkubacije ne treba biti veća od 1 % (v/v). Rastvarač prije upotrebe treba ispitati kako bi se utvrdilo da nije citotoksično i da ne utiče na uspješnost testa.

Priprema referentnih normi, pozitivnih kontrola, negativnih kontrola i ispitivanih hemikalija

Referentne norme, pozitivne kontrole, negativne kontrole i ispitivane hemikalije rastvaraju se u 100-postotnom DMSO-u (ili primjerenom rastvraču). U istom rastvraču zatim treba pripremiti i primjerena (serijska) razrjeđivanja. Prije rastvaranja sve supstance treba ostaviti tako da se njihova temperatura izjednači sa sobnom temperaturom. U svježe pripremljenim glavnim rastvorima referentnih normi, pozitivnih kontrola, negativnih kontrola i ispitivanih hemikalija ne smije biti primjetan talog ili zamućenje. Uzorci referentne norme i kontrole mogu se pripremati zbirno. Prije svakog eksperimenta treba pripremiti glavne rastvora ispitivanih hemikalija. Za svaki eksperiment treba pripremiti svježa konačna razrjeđivanja referentnih normi, pozitivnih kontrola, negativnih kontrola i ispitivanih hemikalija te ih treba upotrijebiti u roku od 24 sata od pripreme.

Rastvorljivost, citotoksičnost i utvrđivanje raspona

Tokom ciklusa predizbora utvrđuje se rastvorljivost ispitivanih hemikalija u odabranom rastvraču. Priprema se najviša koncentracija glavne rastvora od 0,1 M. Ako se pri toj koncentraciji pojave poteškoće s rastvorljivosti, treba pripremiti glavne rastvora niže

koncentracije dok se ispitivane hemikalije potpuno ne otope. Tokom ciklusa predizbora ispituju se serijska razrjeđivanja ispitivane hemikalije u odnosu 1: 10. Najveća koncentracija u testu za ispitivanje agonista i antagonista iznosi 1 mM. Nakon predizbora izvodi se primjereni rafinirani raspon koncentracija za ispitivane hemikalije koji treba ispitati tokom detaljnih ciklusa. U detaljnom ispitivanju trebaju se ispitati razrjeđivanja od 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x i 3000x.

Ispitivanje citotoksičnosti uključeno je u protokol za test agonista i antagonista (11.). Ispitivanje citotoksičnosti uključeno je i u ciklus predizbora i u detaljne cikluse. Metoda upotrijebljena za procjenu citotoksičnosti tokom validacije biotesta ERα CALUX bio je test propuštanja laktat dehidrogenaze (LDH) u kombinaciji s kvalitativnim vizualnim pregledom ćelija (vidjeti Dodatak 4.1.) nakon izlaganja ispitivanim hemikalijama. Međutim, za utvrđivanje citotoksičnosti mogu se upotrijebiti druge kvantitativne metode (npr. kolorimetrijski test na osnovu tetrazolija (MTT) ili biotest citotoksičnosti CALUX). Generalno, koncentracije ispitivane hemikalije koje pokažu smanjenje vijabilnosti ćelija veće od 20 % smatraju se citotoksičnima i stoga se ne mogu upotrijebiti za procjenu podataka. Kad je riječ o testu propuštanja LDH-a, koncentracija ispitivane hemikalije smatra se citotoksičnom ako je postotak propuštanja LDH-a veći od 120 %.

Izlaganje ispitivanoj hemikaliji i organizacija testne ploče

Nakon tripsinizacije konfluentne tikvice uzgojenih ćelija, ćelije se ponovno suspendujeju pri koncentraciji od 1 x 105 ćelija/ml u medijumu za test bez estrogena. Sto µl ćelija koje su ponovno suspendujene nasađuju se u unutarnje posude sa udubljenjima mikrotitracione ploče s 96 udubljenja. Spoljašnje posude sa udubljenjima pune se s 200 µl fiziološke rastvora puferirane fosfatnim puferom (PBS) (vidjeti slike 1. i 2.). Nasađene ćelije predinkubiraju se 24 sata u inkubatoru CO2 (5 % CO2, 37 °C, 100-postotna vlažnost).

Nakon predinkubacije ploče se pregledavaju kako bi se vizualno utvrdile citotoksičnost (vidjeti Dodatak 4.1.), kontaminacija i konfluencija. Za ispitivanje se koriste samo ploče na kojima nema vizualnih znakova citotoksičnosti, kontaminacije i kod kojih konfluencija iznosi najmanje 85 %. Medij iz unutarnjih udubljenja pažljivo se uklanja i zamjenjuje s 200 µl medija za test bez estrogena koji sadrži primjerene serije razrjeđivanja referentnih normi, ispitivanih hemikalija, pozitivnih kontrola, negativnih kontrola i kontrola s rastvaračem (tabela 5.: studije agonista; tabela 6.: studije antagonista). Sve referentne norme, ispitivane hemikalije, pozitivne kontrole, negativne kontrole i kontrole s rastvaračem ispituju se u tri ponavljanja. Na slici 1. prikazan je raspored na ploči za ispitivanje agonista. Na slici 2. prikazan je raspored na ploči za ispitivanje antagonista. Raspored na ploči za predizbor isti je kao i za detaljno ispitivanje. Kod ispitivanja antagonista sve unutarnje posude sa udubljenjima, osim udubljenja za kontrolu s nosačem (VC), sadržiju i fiksnu koncentraciju 17β-estradiola – referentne norme agonista (3 * 10–12 M). Treba napomenuti da referentne norme C8 i C4 treba dodati svakoj ploči s ispitivanom hemikalijom.

Nakon izlaganja ćelija svim hemikalijama, mikrotitracione ploče s 96 udubljenja treba inkubirati još 24 sata u inkubatoru CO2 (5 % CO2, 37 °C, 100-postotna vlažnost).

Slika 1. *R*aspored na mikrotitracijskoj ploči s 96 udubljenja za predizbor i procjenu agonističkog efekta

Plate 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Subsequent plates

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = rastvarač referentne norme.

C(1 – 8) = serije razrjeđivanja (1 – 8, koncentracije od niže do više) referentne norme.

PC = pozitivna kontrola.

NC = negativna kontrola.

TCx-(1 – 8) = razrjeđivanja (1 – 8, koncentracije od niže do više) ispitivane hemikalije za ciklus predizbora i procjenu agonističkog efekta ispitivane hemikalije x.

SC = kontrola s rastvaračem ispitivane hemikalije (po mogućnosti isto rastvarač kao i pod C0, ali moguće iz druge šarže).

Siva polja: = spoljašnje posude sa udubljenjima, napunjene s 200 µl PBS-a.

Slika 2. **Raspored na mikrotitracijskoj ploči s 96 udubljenja za antagonistički predizbor i procjenu antagonističkog efekta**

Plate 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Subsequent plates

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = rastvarač referentne norme.

C(1 – 8) = serije razrjeđivanja (1 – 8, koncentracije od niže do više) referentne norme.

NC = negativna kontrola.

PC = pozitivna kontrola.

TCx-(1 – 8) = razrjeđivanja (1 – 8, koncentracije od niže do više) ispitivane hemikalije za ciklus predizbora i procjenu agonističkog efekta ispitivane hemikalije x.

SC = kontrola s rastvaračem ispitivane hemikalije (po mogućnosti isto rastvarač kao i pod C0, ali moguće iz druge šarže).

VC = kontrola s nosačem (kontrola s rastvaračem bez fiksne koncentracije referentne norme agonista – 17β-estradiola).

Siva polja: = spoljašnje posude sa udubljenjima, napunjene s 200 µl PBS-a.

Napomena: sve unutarnje posude sa udubljenjima, osim udubljenja za kontrolu s nosačem (VC), sadržiju i fiksnu koncentraciju 17β-estradiola – referentne norme agonista ($3,0 * 10^{-12}$ M).

Mjerenje luminiscencije

Mjerenje luminiscencije detaljno je opisano u protokolu za test agonista i antagonista. Medij treba ukloniti iz udubljenja i ćelije treba lizirati nakon 24 sata inkubacije kako bi se otvorila ćelijska membrana i omogućilo mjerenje aktivnosti luciferaze.

Kod mjerenja luminiscencije za taj je postupak potreban luminometar s dva ubrizgavača. Reakcija luciferaze pokreće se ubrizgavanjem supstrata luciferina. Reakcija se zaustavlja dodavanjem 0,2 M NaOH. Reakcija se zaustavlja kako bi se spriječilo prenošenje luminiscencije iz jedne posude sa udubljenjima u drugu.

Emisija svjetlosti iz svake posude sa udubljenjima izražava se kao relativna jedinica svjetlosti (RLU) po jažici.

Ciklus predizbora

Rezultati analize predizbora upotrebljavaju se za utvrđivanje rafinisanog raspona koncentracija ispitivanih hemikalija za detaljna ispitivanja. Procjena rezultata analize predizbora i utvrđivanja rafinirsanog raspona koncentracije ispitivanih hemikalija za detaljno ispitivanje detaljno je opisana u protokolu za test agonista i antagonista. Ovdje je naveden kratak rezime postupaka za utvrđivanje raspona koncentracije ispitivanih hemikalija za ispitivanje agonista i antagonista. Smjernice o dizajnu serijskog razrjeđivanja potražiti u tabelama 5. i 6.

Izbor koncentracija za procjenu agonističkih efekata

Tokom ciklusa predizbora ispitivane hemikalije treba ispitati upotrebom serija razrjeđivanja kako je prikazano u tabelama 5. (agonizam) i 6. (antagonizam). Sve koncentracije treba ispitati u trostrukim porculanskim tanjirima sa udubljenjima u skladu s rasporedom na ploči kako je prikazano na slici 1. (agonizam) ili slici 2. (antagonizam).

Valjanima se smatraju samo rezultati analize koji ispunjavaju kriterijume prihvatljivosti (tabela 3.) i samo se oni mogu koristiti za procjenu odgovora ispitivanih hemikalija. Ako jedna mikrotitraciona ploča ili više mikrotitracionih ploča u analitičkoj seriji ne ispune kriterijume prihvatljivosti, te mikrotitracione ploče treba ponovno analizirati. Ako prva ploča koja sadrži cijelu seriju razrjeđivanja referentne norme ne ispuni kriterijume prihvatljivosti, mora se ponovno analizirati cijeli niz ispitivanja (šest ploča).

Treba prilagoditi početne raspone koncentracija ispitivanih hemikalija i ponoviti ciklus predizbora:

— ako se uoči citotoksičnost. Postupak predizbora treba ponoviti s nižim koncentracijama ispitivane hemikalije koje nisu toksične,
— ako predizbor ispitivane hemikalije ne pokaže cijelu krivu doza – odgovor jer ispitane koncentracije uzrokuju najveću indukciju. Ciklus predizbora treba ponoviti s nižim koncentracijama ispitivane hemikalije.

Kada se uoči valjani odgovor na dozu, treba odabrati (najnižu) koncentraciju pri kojoj se uoči najveća indukcija i koja ne pokazuje citotoksičnost. Najviša koncentracija ispitivane hemikalije koju treba ispitati u detaljnim ciklusima treba biti tri puta veća od te odabrane koncentracije.

Treba pripremiti cijelu seriju razrjeđivanja ispitivane hemikalije u skladu s koracima razrjeđivanja kako su navedeni u tabeli 5., počevši od najviše koncentracije kako je prethodno utvrđena.

Ispitivanu hemikaliju koja ne izazove nikakav agonistički efekat treba ispitati u detaljnim ciklusima, počevši od najviše koncentracije koja nije citotoksična, a koja je utvrđena tokom predizbora.

Izbor koncentracija za procjenu antagonističkih efekata

Valjanima se smatraju samo rezultati analize koji ispunjavaju kriterijume prihvatljivosti (tabela 4.) i samo se oni mogu koristiti za procjenu odgovora ispitivanih hemikalija. Ako jedna mikrotitraciona ploča ili više mikrotitracionih ploča u analitičkoj seriji ne ispune kriterijume prihvatljivosti, te mikrotitracione ploče treba ponovno analizirati. Ako prva ploča koja sadrži cijelu seriju razrjeđivanja referentne norme ne ispuni kriterijume prihvatljivosti, mora se ponovno analizirati cijeli niz ispitivanja (šest ploča).

Treba prilagoditi početne raspone koncentracija ispitivanih hemikalija i ponoviti ciklus predizbora:

— ako se uoči citotoksičnost. Postupak predizbora treba ponoviti s nižim koncentracijama ispitivane hemikalije koje nisu toksične,
— ako predizbor ispitivane hemikalije ne pokaže cijelu krivu doza – odgovor jer ispitane koncentracije uzrokuju najveću inhibiciju. Predizbor treba ponoviti s nižim koncentracijama ispitivane hemikalije.

Kada se pronađe valjani odgovor na dozu treba odabrati (najnižu) koncentraciju pri kojoj se uoči najveća inhibicija i koja ne pokazuje citotoksičnost. Najviša koncentracija ispitivane hemikalije koju treba ispitati u detaljnim ciklusima treba biti tri puta veća od te odabrane koncentracije.

Treba pripremiti cijelu seriju razrjeđivanja ispitivane hemikalije u skladu s koracima razrjeđivanja kako su navedeni u tabeli 6., počevši od najviše koncentracije kako je prethodno utvrđena.

Ispitivane hemikalije koje ne izazovu nikakve antagonističke efekte treba ispitati u detaljnim ciklusima, počevši od najviše koncentracije koja nije citotoksična, a koja je ispitana tokom predizbora.

Detaljni ciklusi

Nakon izbora raspona koncentracija ispitivane hemikalije treba detaljno ispitati upotrebom serija razrjeđivanja kako je prikazano u tabelama 5. (agonizam) i 6. (antagonizam). Sve koncentracije treba ispitati u trostrukim porculanskim tanjirima sa udubljenjima u skladu s rasporedom na ploči kako je prikazano na slici 1. (agonizam) ili slici 2. (antagonizam).

Valjanima se smatraju samo rezultati analize koji ispunjavaju kriterijume prihvatljivosti (tabele 3. i 4.) i samo se oni mogu koristiti za procjenu odgovora ispitivanih hemikalija. Ako jedna mikrotitraciona ploča ili više mikrotitracionih ploča u analitičkoj seriji ne ispune kriterijume prihvatljivosti, te mikrotitracione ploče treba ponovno analizirati. Ako prva ploča koja sadrži cijelu seriju razrjeđivanja referentne norme ne ispuni kriterijume prihvatljivosti, mora se ponovno analizirati cijeli niz ispitivanja (šest ploča).

Tabela 5. **Koncentracija i razrjeđivanja referentnih normi, kontrola i ispitivanih hemikalija koje se koriste za ispitivanje agonista**

Referentni 17β-estradiol		**TCx – ciklus predizbora –**		**TCx – detaljni ciklus –**		**Kontrole**	
konc. (M)		**razrjeđivanje**		**razrjeđivanje**		**konc. (M)**	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$3 * 10^{-6}$
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 – ispitivana hemikalija x

PC – pozitivna kontrola (17α-metiltestosteron)

NC – negativna kontrola (kortikosteron)

C0 – kontrola s rastvaračem referentne norme

SC – kontrola s rastvaračem ispitivane hemikalije

Tabela 6. **Koncentracija i razrjeđivanja referentnih normi, kontrola i ispitivanih hemikalija koje se koriste za ispitivanje antagonista**

Referentni tamoksifen		**TCx – ciklus predizbora –**		**TCx – detaljni ciklus –**		**Kontrole**	
konc. (M)		**razrjeđivanje**		**razrjeđivanje**		**konc. (M)**	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$1 * 10^{-9}$
C1	$3 * 10^{-9}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1 * 10^{-5}$
C2	$1 * 10^{-8}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3 * 10^{-8}$	TCx-4	10000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1 * 10^{-7}$	TCx-5	1000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3 * 10^{-}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Obogaćeni agonist**	
C6	$1 * 10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**konc. (M)**	

C7	3 * 10^{-6}	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-estradiol	3 * 10^{-12}
C8	1 * 10^{-5}						

TCx – ispitivana hemikalija x

PC – pozitivna kontrola (4-hidroksitamoksifen)

NC – negativna kontrola

C0 – kontrola s rastvaračem referentne norme

SC – kontrola s rastvaračem ispitivane hemikalije

VC – kontrola s nosačem (ne sadrži fiksnu koncentraciju 17β-estradiola – referentne norme agonista (3,0 * 10^{-12} M))

Prikupljanje i analiza podataka

Nakon ciklusa predizbora i detaljnih ciklusa treba utvrditi EC10, EC50, PC10, PC50 i najveću indukciju (TCxmax) ispitivane hemikalije za agonističko ispitivanje. Za antagonističko ispitivanje treba izračunati IC20, IC50, PC80, PC50 i najmanju indukciju (TCxmin). Na slikama 3. (agonizam) i 4. (antagonizam) nalazi se grafički prikaz tih parametara. Potrebni parametri računaju se na osnovu relativne indukcije svake ispitivane hemikalije (u odnosu na najveću indukciju referentne norme (= 100 %)). Za procjenu podataka treba upotrebljavati nelinearnu regresiju (varijabilan nagib, četiri parametra) prema sljedećoj jednačini:

$$Y = dno\ \frac{vrh - dno}{1 + 10^{\ lgEC50 - X\ x\ Hillov\ nagib}}$$

gdje je: X = log doze ili koncentracije, Y = odgovor (relativna indukcija (%)), Vrh = najveća indukcija (%), Dno = najmanja indukcija (%), LogEC50 = log koncentracije pri kojoj se uočava 50 % najvećeg odgovora I Hillov nagib = faktor nagiba ili Hillov nagib.

Neobrađene podatke iz luminometra, izražene kao relativne jedinice svjetlosti (RLU-ovi), treba prenijeti u proračunsku tabelu za analizu podataka koja je izrađena za cikluse predizbora i detaljne cikluse. Neobrađeni podaci trebaju ispunjavati kriterijume prihvatljivosti kako su navedeni u tabelama 3.A i 3.B (agonizam) ili 4.A i 4.B (antagonizam). Ako neobrađeni podaci ispunjavaju kriterijume prihvatljivosti, sprovode se sljedeći koraci za izračun kako bi se utvrdili potrebni parametri.

Agonizam

- Oduzeti prosječni RLU kontrole s rastvaračem referentne norme od svakog sirovog podatka iz analize referentnih normi.

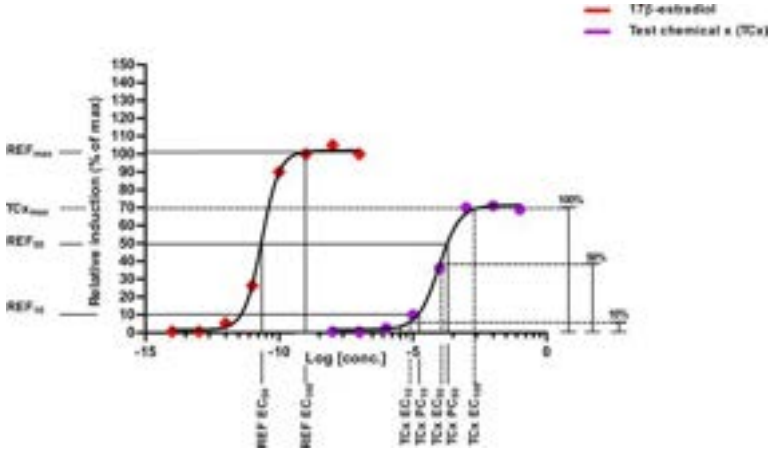
- Oduzeti prosječni RLU za kontrolu s rastvaračem ispitivane hemikalije od svakog sirovog podatka iz analize ispitivanih hemikalija.
- Izračunati relativnu indukciju svake koncentracije referentne norme. Postaviti indukciju najviše koncentracije referentne norme na 100 %.
- Izračunati relativnu indukciju svake koncentracije ispitivane hemikalije u poređenju s najvišom koncentracijom referentne norme kao 100 %.
- Procijeniti rezultate analize nakon nelinearne regresije (varijabilan nagib, četiri parametra).
- Utvrditi EC50 i EC10 referentne norme.
- Utvrditi EC50 i EC10 ispitivanih hemikalija.
- Utvrditi najveću relativnu indukciju ispitivane hemikalije (TCmax).
- Utvrditi PC10 i PC50 ispitivanih hemikalija.

Kod ispitivanih hemikalija ne može se uvijek dobiti cijela kriva doza – odgovor, na primjer zbog citotoksičnosti ili poteškoća s rastvorljivosti. Stoga se ne mogu utvrditi vrijednosti EC50, EC10 i PC50. U tom se slučaju mogu utvrditi samo vrijednosti PC10 i TCmax.

Antagonizam

— Oduzeti prosječni RLU najviše koncentracije referentne norme od svakog sirovog podatka iz analize referentnih normi.
— Oduzeti prosječni RLU najviše koncentracije referentne norme od svakog sirovog podatka iz analize ispitivanih hemikalija.
— Izračunati relativnu indukciju svake koncentracije referentne norme. Postaviti indukciju najniže koncentracije referentne norme na 100 %.
— Izračunati relativnu indukciju svake koncentracije ispitivane hemikalije u u poređenju s najnižom koncentracijom referentne norme kao 100 %.
— Procijeniti rezultate analize nakon nelinearne regresije (varijabilan nagib, četiri parametra).
— Utvrditi IC50 i IC20 referentne norme.
— Utvrditi IC50 i IC20 ispitivanih hemikalija.
— Utvrditi najmanju relativnu indukciju ispitivane hemikalije (TCmin).
— Utvrditi PC80 i PC50 ispitivanih hemikalija.

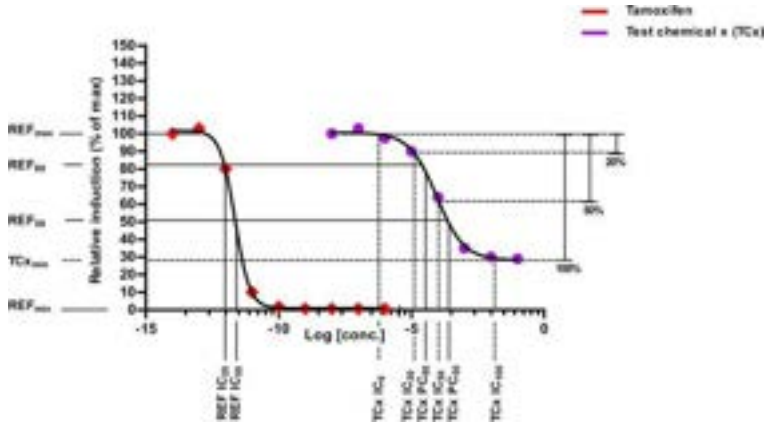
Slika 3. **Pregled parametara koji se utvrđuju u testu agonista**



EC_{10} = koncentracija supstanci pri kojoj se uočava 10 % njena najvećeg odgovora.
EC_{50} = koncentracija supstanci pri kojoj se uočava 50 % njena najvećeg odgovora.

PC_{10} = koncentracija ispitivane hemikalije pri kojoj je njen odgovor jednak vrijednosti EC_{10} referentne norme.
PC_{50} = koncentracija ispitivane hemikalije pri kojoj je njen odgovor jednak vrijednosti EC_{50} referentne norme.
TCx_{max} = najveća relativna indukcija ispitivane hemikalije.

Slika 4. **Pregled parametara koji se utvrđuju u testu antagonista**



IC_{20} = koncentracija supstanci pri kojoj se uočava 80 % njena najvećeg odgovora (20-postotna inhibicija).
IC_{50} = koncentracija supstanci pri kojoj se uočava 50 % njena najvećeg odgovora (50-postotna inhibicija).
PC_{80} = koncentracija ispitivane hemikalije pri kojoj je njen odgovor jednak vrijednosti IC_{20} referentne norme.
PC_{50} = koncentracija ispitivane hemikalije pri kojoj je njen odgovor jednak vrijednosti IC_{50} referentne norme.
TCx_{min} = najmanja relativna indukcija ispitivane hemikalije.

Kod ispitivanih hemikalija ne može se uvijek dobiti cijela kriva doza – odgovor, na primjer zbog citotoksičnosti ili poteškoća s rastvorljivosti. Stoga se ne mogu utvrditi vrijednosti IC_{50}, IC_{20} i PC_{50}. U tom se slučaju mogu utvrditi samo vrijednosti PC_{20} i TC_{min}.

Rezultati se trebaju bazirati na dva (ili tri) nezavisna ciklusa. Ako se u dva ciklusa dobiju uporedivi, a time i ponovljivi rezultati, ne mora se sprovoditi treći ciklus. Da bi bili prihvatljivi, rezultati trebaju:

— ispunjavati kriterijume prihvatljivosti
— biti ponovljivi.

Kriterijumi za tumačenje podataka

Za tumačenje podataka i odluku o tome smatra li se ispitivana hemikalija pozitivnom ili negativnom treba primjenjivati sljedeće kriterijume.

Agonizam

U svakom detaljnom ciklusu ispitivana hemikalija smatra se pozitivnom:

- ako je TCmax jednak ili veći od 10 % najvećeg odgovora referentne norme (REF10);

- ako su najmanje dvije uzastopne koncentracije ispitivane hemikalije jednake vrijednosti REF10 ili veće od nje.

U svakom detaljnom ciklusu ispitivana hemikalija smatra se negativnom:

- ako TCmax nije veći od 10 % najvećeg odgovora referentne norme (REF10);
- ako su manje od dvije koncentracije ispitivane hemikalije jednake vrijednosti REF10 ili veće od nje.

Antagonizam

U svakom detaljnom ciklusu ispitivana hemikalija smatra se pozitivnom:

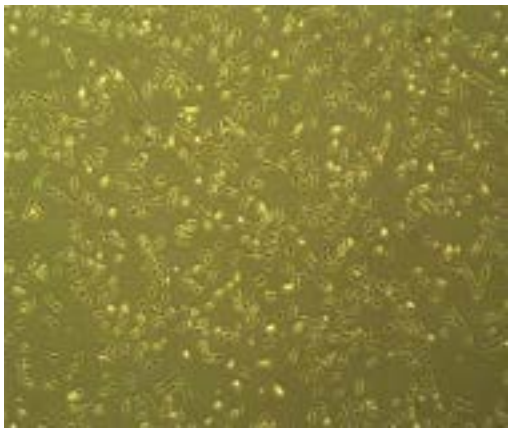
- ako je TCmin jednak ili manji od 80 % najvećeg odgovora referentne norme (REF80 = 20-postotna inhibicija);
- ako su najmanje dvije uzastopne koncentracije ispitivane hemikalije jednake vrijednosti REF80 ili manje od nje.

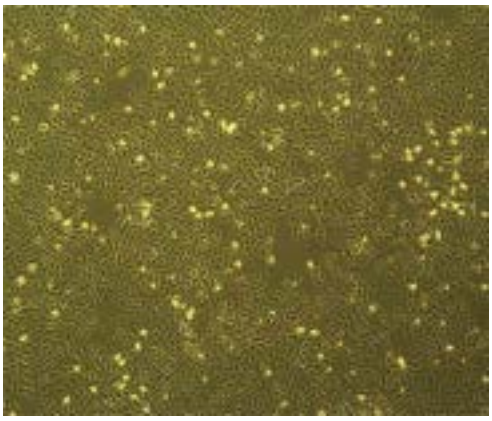
U svakom detaljnom ciklusu ispitivana hemikalija smatra se negativnom:

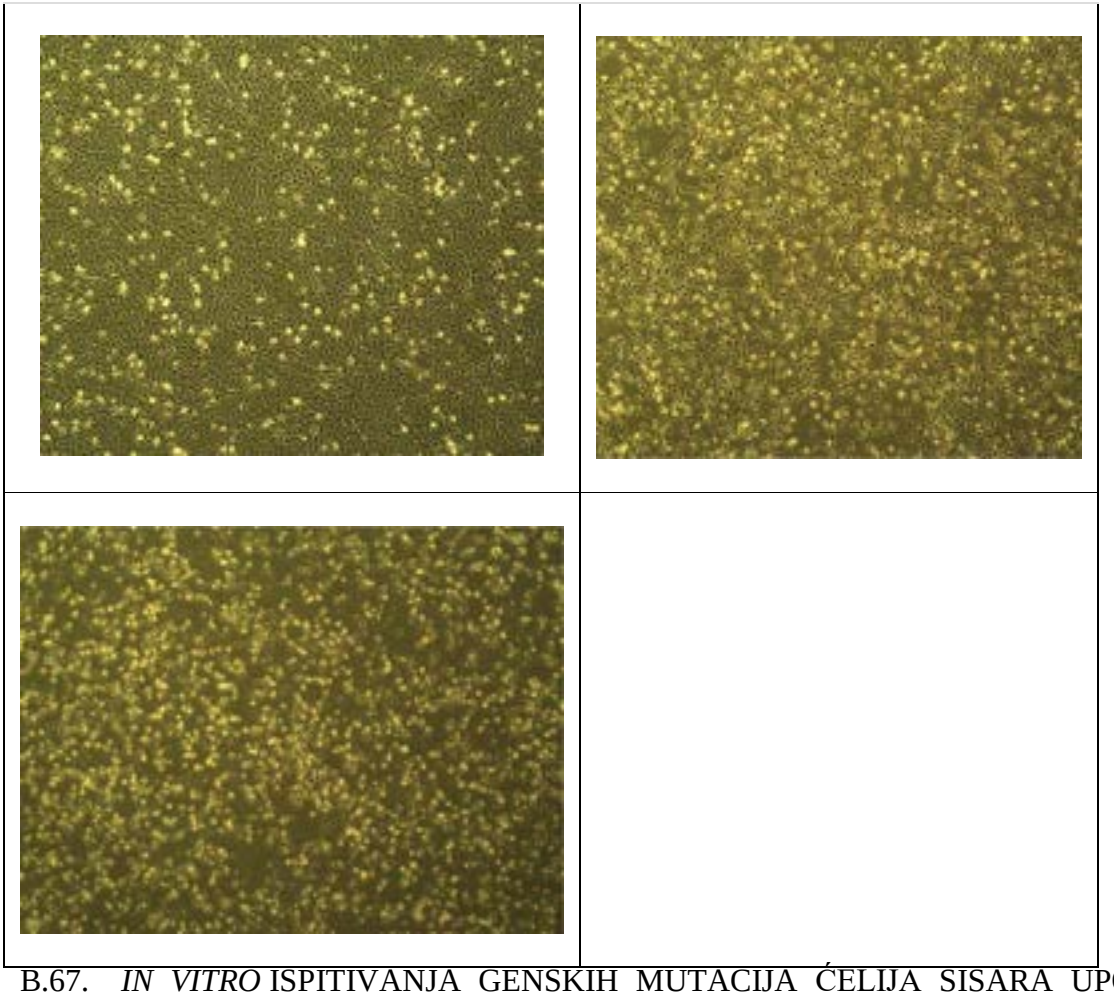
- ako je TCmin veći od 80 % najvećeg odgovora referentne norme (REF80 = 20-postotna inhibicija);
- ako su manje od dvije koncentracije ispitivane hemikalije jednake vrijednosti REF80 ili manje od nje.

Kako bi se opisala jakost pozitivnog odgovora ispitivane hemikalije, treba navesti odnos efekta (agonizam: TCmax; antagonizam: TCmin) i koncentraciju pri kojoj dolazi do efekta (agonizam: EC10, EC50, PC10, PC50; antagonizam: IC20, IC50, PC80, PC50).

IZVJEŠTAJ O ISPITIVANJU *Dodatak 4.1.* VIZUALNI PREGLED VIJABILNOSTI ĆELIJA







B.67. *IN VITRO* ISPITIVANJA GENSKIH MUTACIJA ĆELIJA SISARA UPOTREBOM GENA ZA TIMIDIN KINAZU

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 490. Ispitne metode periodično se preispituju i revidiraju uzimajući u obzir naučni napred, regulatorne potrebe i dobrobit životinja. Test limfoma miša (MLA) i test TK6 u kojima se upotrebljava lokus timidin kinaze (TK) izvorno su bili dio ispitne metode B.17. Kasnije je Stručna grupa za MLA Međunarodne radionice o ispitivanju genotoksičnosti (IWGT) razvila međunarodno usklađene preporuke za kriterijume prihvatljivosti testova i tumačenje podataka za MLA i te su preporuke uključene u ovu novu ispitnu metodu B.67. Ova je ispitna metoda napisana za MLA i za test TK6 jer se i u njemu upotrebljava lokus timidin kinaze. Dok se MLA često upotrebljava u regulatorne svrhe, TK6 se upotrebljava mnogo rjeđe. Treba napomenuti da te dvije ćelijske linije nisu međusobno zamjenjive unatoč sličnosti između krajnjih tačaka te se u regulatornim programima s pravom može dati prednost jednoj od tih metoda za određenu regulatornu upotrebu. Na primjer, u validaciji testa MLA pokazala se primjerenost tog testa za otkrivanje genskih mutacija, ali i sposobnost ispitivanih hemikalija da indukujeju strukturno oštećenje hromosoma. Ova je ispitna metoda dio niza ispitnih metoda u području genetske toksikologije. OECD je sastavio dokument u kojem se daju sažete informacije o ispitivanju u području genetske toksikologije te pregled novijih promjena smjernica OECD-a za ispitivanje genotoksičnosti.

Svrha je in vitro testova genskih mutacija ćelija sisara otkrivanje genskih mutacija (uzrokovanih) hemikalijama. Ćelijske linije koje se upotrebljavaju u ovim testovima mjere napredne mutacije na reporterskim genima, tačnije genu za endogenu timidin kinazu (TK za ljudske ćelije i Tk za ćelije glodara, koje se u ovoj ispitnoj metodi zajedno nazivaju TK). Ova ispitna metoda namijenjena je za upotrebu s dvjema ćelijskim linijama: ćelijskom linijom limfoma miša L5178Y TK+/–3.7.2C (obično se naziva L5178Y) i ćelijskom linijom ljudskih limfoblastoida TK6 (obično se naziva TK6). Iako se te dvije ćelijske linije razlikuju po svojem porijeklu, rastu ćelija, statusu p53 itd., testovi mutacija gena TK mogu se sprovesti na sličan način za obje vrste ćelija, kako je opisano u ovoj ispitnoj metodi.

Autosomalna i heterozigotna priroda gena za timidin kinazu omogućuje uočavanje vijabilnih kolonija čijim ćelijama nedostaje enzim timidin kinaza nakon mutacije iz TK+/- u TK-/-. Taj nedostatak može biti posljedica genetskih pojava koje utiču na gen TK, uključujući i genske mutacije (tačkaste mutacije, mutacije pomaka okvira očitavanja, manje delecije itd.) i hromosomske pojave (velike delecije, premještanja hromosoma i mitotske rekombinacije). Poslednje pojave eksprimiraju se kao gubitak heterozigotnosti, a to je uobičajena genetska promjena gena supresora tumora u karcinogeneze kod ljudi. U teoriji se testom MLA može otkriti gubitak cijelog hromosoma koji nosi gen TK, što je posljedica oštećenja diobenog vretena i/ili mitotskog nerazdvajanja. Kombinacija citogenetske i molekularne analize jasno pokazuje da su neki mutanti TK u testu MLA posljedica nerazdvajanja. Međutim, analiza snage dokaza ukazuje na to da ispitivanja mutacija gena TK ne mogu pouzdano otkriti aneugene kada se primjenjuju standardni kriterijumi citotoksičnosti (kako je opisano u ovoj ispitnoj metodi) i stoga nije primjereno upotrebljavati te testove za otkrivanje aneugena.

U testovima mutacije gena TK nastaju dvije različite klase fenotipa mutanata TK: mutanti koji rastu normalno istom brzinom kao i heterozigotne ćelije TK-a i mutanti koji rastu sporo i imaju produženo vrijeme udvostručivanja. Mutanti koji rastu normalno i mutanti koji rastu sporo prepoznaju se kao mutanti u velikim kolonijama i mutanti u malim kolonijama u testu MLA te kao mutanti u kolonijama koje se javljaju rano i koje se javljaju kasno u testu TK6. Molekularna i citogenetska svojstva mutanata u velikim i malim kolonijama u testu MLA detaljno su ispitana. Detaljno su ispitana i molekularna i citogenetska svojstva mutanata koji se javljaju rano i koji se javljaju kasno u testu TK6. Mutanti koji rastu sporo za obje vrste ćelija pretrpjeli su genetsko oštećenje koje pogađa gene koji navodno regulišeju rast u blizini lokusa timidin kinaze, što dovodi do produženih vremena udvostručivanja i nastanka kolonija koje se javljaju kasno ili malih kolonija. Indukcija mutanata koji rastu sporo povezuje se s hemikalijama koje izazivaju velike strukturne promjene na nivou hromosoma. Ćelije kojima nisu oštećeni geni koji navodno regulišeju rast u blizini lokusa timidin kinaze rastu brzinom koja je slična roditeljskim ćelijama i postaju mutanti koji rastu normalno. Indukcija mutanata koji prvenstveno rastu normalno povezana je s hemikalijama koje prvenstveno djeluju kao mutageni koji uzrokuju tačkaste mutacije. Stoga je od ključne važnosti izbrojiti i mutante koji rastu sporo i one koji rastu normalno kako bi se dobili svi mutanti i određeni uvid u vrste oštećenja (mutageni u odnosu na klastogene) koje indukuje ispitivana hemikalija.

Ispitna metoda organizovana je tako da se daju opšte informacije koje se primjenjuju i na MLA i TK6 te specijalizovane smjernice za pojedinačne testove.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

Testovi koji se obavljaju in vitro obično zahtijevaju primjenu egzogenog izvora metaboličke aktivacije. Egzogenim sistemom metaboličke aktivacije ne oponašaju se u cijelosti in vivo uslovi.

Trebalo bi voditi računa o tome da se izbjegnu uslovi koji bi mogli dovesti do lažno pozitivnih rezultata (odnosno moguće interakcije s ispitnim sistemom) koji nisu uzrokovani interakcijom ispitivane hemikalije i genetskog materijala ćelije; takvi uslovi uključuju promjene pH-vrijednosti ili osmolalnosti, interakciju s komponentama medija ili prekodnosne nivoa citotoksičnosti. Citotoksičnost koja prekoračuje preporučene najviše nivoa citotoksičnosti, kako su definisane smatra se MLA i TK6. Osim toga, treba napomenuti da ispitivane hemikalije koje su analogne timidinu ili se ponašaju kao da su analogne timidinu mogu povećati učestalost pojave mutanata selektivnim rastom spontanih pozadinskih mutanata tokom tretiranja ćelija te su za primjerenu procjenu potrebne dodatne ispitne metode.

U slučaju proizvedenih nanomaterijala mogu biti potrebne posebne prilagođavanja ove ispitne metode, ali one nisu opisane u ovoj ispitnoj metodi.

Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni za ispitivanje smješe radi dobijanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smješe.

Mutirane ćelije bez aktivnosti enzima timidin kinaze otporne su na citostatske efekte analoga primidona, trifluorotimidina (TFT), zbog mutacije TK+/- u TK-/- . Ćelije koje sadržiju dosta TK-a osjetljive su na TFT, što uzrokuje inhibiciju staničnog metabolizma i sprečava dalju diobu ćelija. Tako se mutirane ćelije uz prisutnost TFT-a mogu razmnožavati i stvarati vidljive kolonije, dok ćelije koje sadržiju enzim TK ne mogu.

NAČELO ISPITIVANJA

Ćelije u suspenziji izlažu se u odgovarajućem trajanju ispitivanoj hemikaliji, s egzogenim izvorom metaboličke aktivacije i bez njega, te se zatim supkultiviraju da bi se utvrdila citotoksičnost i omogućila fenotipska ekspresija prije selekcije mutanata. Citotoksičnost se utvrđuje relativnim ukupnim rastom (RTG) za MLA i relativnom stopom preživljavanja (RS) za TK6. Tretirane se kulture drže u medijumu za rast tokom dovoljno dugog perioda, koje je karakteristično za svaki tip ćelije, što omogućuje skoro optimalnu fenotipsku ekspresiju indukovanih mutacija. Nakon fenotipske ekspresije učestalost pojave mutanata utvrđuje se nasađivanjem poznatog broja ćelija u medij koji sadrži selektivni agens kako bi se otkrile kolonije mutanata odnosno u medij bez selektivnog agensa kako bi se odredila efektivnost kloniranja (vijabilnost). Nakon odgovarajućeg perioda inkubacije kolonije se prebroje. Učestalost pojave mutanata računa se na osnovu broja kolonija mutanata koji se ispravlja efektivnošću kloniranja u trenutku selekcije mutanata.

OPIS METODE

Pripreme

Ćelije

Za MLA: budući da je MLA razvijen i opisan za upotrebu podlinije TK+/- –3.7.2C ćelija L5178Y, za MLA se mora upotrebljavati upravo ta podlinija. Ćelijska linija L5178Y izvedena je iz limfoma timusa DBA-2 miša indukovanog metilkolantrenom. Clive i suradnici tretirali su ćelije L5178Y

(koje je Clive odredio kao TK+/+ –3) etil metansulfonatom i izolirali klon TK-/- (određen kao TK-/- –3.7) primjenom bromodeoksiuridina kao selektivnog agensa. Iz klona TK-/- izolirani su spontani klon TK+/- (određen kao TK+/- –3.7.2.) i podklon (određen kao TK+/- –3.7.2C) te su opisani za upotrebu u testu MLA. Objavljen je kariotip za ćelijsku liniju. Modalni je broj hromosoma 40. Postoji jedan metacentrični hromosom (t12;13) koji treba brojiti kao jedan hromosom. Lokus timidin kinaze miša nalazi se na distalnom kraju hromosoma 11. Ćelijska linija L5178Y TK+/- –3.7.2C ima mutacije na oba alela p53 i proizvodi protein mutanta p53. Status p53 ćelijske linije TK+/- –3.7.2C vjerovatno omogućuje da se testom otkrije veliko oštećenje.

Za TK6: TK6 je ćelijska linija ljudskih limfoblastoida. Roditeljsku ćelijsku liniju čini WI-L2, ćelijska linija transformirana Epstein-Barrovim virusom, koja je izvorno izvedena iz petogodišnjeg mužjaka s hereditarnom sferocitozom. Prvi izolirani klon, HH4, mutageniran je mutagenom ICR191 i stvorena je heterozigotna ćelijska linija TK-a – TK6. Ćelije TK6 skoro su diploidne i reprezentativni je kariotip 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21). Lokus ljudske timidin kinaze nalazi se na dugom kraku hromosoma 17. TK6 je ćelijska linija kompetentna u pogledu p53 jer ima slijed p53 divljeg tipa na oba alela i eksprimira samo protein p53 divljeg tipa.

I kod testa MLA i testa TK6 preporučuje se da laboratorij koji obavlja ispitivanje osigura odsustvo kontaminacije mikoplazmom, odredi kariotip ćelija ili oboji hromosome koji imaju lokus timidin kinaze te da provjeri vremena udvostručenja populacije kada se glavni uzorak prvi put stvara ili nadopunjuje. Trebalo bi utvrditi uobičajeno trajanje staničnog ciklusa upotrijebljenih ćelija u ispitnom laboratoriju i ono bi trebalo biti usklađeno s objavljenim svojstvima ćelija. Taj glavni uzorak treba čuvati na temperaturi od –150 °C ili nižoj i upotrebljavati za pripremu svih radnih uzoraka ćelija.

Prije stvaranja velikog broja krioprezerviranih radnih uzoraka ili neposredno prije upotrebe u eksperimentu iz kultura će možda trebati odstraniti mutirane ćelije koje postoje otprije [osim ako je učestalost pojave mutanata (MF) u kontroli s rastvaračem već unutar prihvatljivog raspona – vidjeti tabelu 2. za test MLA)]. To se postiže upotrebom metotreksata (aminopterin) kako bi se izdvojile ćelije koje ne sadržiju timidin kinazu te dodavanjem timidina, hipoksantina i glicina (L5178Y) ili 2'-deoksicitidina (TK6) kulturi kako bi se osigurao optimalan rast ćelija kompetentnih u pogledu timidin kinaze za test TK6. Opšti savjeti o dobroj praksi za održavanje ćelijskih kultura i savjeti specifični za ćelije L5178Y i TK6 mogu se naći u literaturi. Za laboratorije koji trebaju matične uzorke za započinjanje testa MLA ili TK6 ili za dobijanje novih matičnih uzoraka dostupan je repozitorij ćelija koje su dobro opisane.

Uslovi koje moraju zadovoljavati mediji i culture

U oba bi testa u svrhu održavanja kultura trebalo primijeniti prikladne uslove za medij za uzgoj kulture i uslove inkubacije (npr. posude za kulture, vlažne atmosferske uslove od 5 % CO2 i temperaturu inkubacije od 37 °C). Ćelijske kulture uvijek bi se trebale održavati u uslovima kojima se osigurava da one rastu u logaritamskoj fazi. Posebno je važno odabrati uslove u pogledu medija i kultura kojima se osiguravaju optimalan rast ćelija tokom perioda ekspresije i kloniranje kako mutiranih tako i nemutiranih ćelija. Za MLA i TK6 važno je i da uslovi kulture osiguraju optimalan rast TK mutanata i u velikim kolonijama/mutanata koji se javljaju rano i mutanata u malim kolonijama/mutanata koji se javljaju kasno. Više pojedinosti o kulturi, uključujući potrebu da se konjski serum pravilno inaktivira toplinom ako se tokom selekcije mutanata upotrebljava medij RPMI, dostupno je u literature.

Priprema kultura

Ćelije se razmnožavaju iz matičnih kultura te se nasađuju u medij za uzgoj kulture takvom gustinom da kulture u suspenziji nastave eksponencijalno rasti tokom perioda tretiranja i ekspresije.

Metabolička aktivacija

Kod upotrebe ćelija L5178Y i TK6 trebalo bi upotrebljavati egzogene sisteme metaboličkog djelovanja jer te ćelije nemaju odgovarajuću endogenu metaboličku sposobnost. Sistem koji se najčešće upotrebljava i automatski preporučuje, osim ako je drukčije opravdano, jest postmitohondrijska frakcija s dodanim kofaktorom (S9), pripravljena od jetre glodara (Generalno pacova), koja je bila tretirana sredstvima za indukciju enzima, kao što je Aroclor 1254, ili mješavinom fenobarbitala i β-naftoflavona. Upotreba navedene smješe nije u suprotnosti sa Stockholmskom konvencijom o POPs i dokazano je da je jednako efikasna za indukciju oksidaza s miješanom funkcijom kao Aroclor 1254. Frakcija S9 obično se upotrebljava u koncentracijama u rasponu od 1 do 2 %, ali može se povećati na 10 % (v/v) u konačnom ispitnom medijumu. Na izbor vrste i koncentracije upotrijebljenog egzogenog sistema metaboličke aktivacije ili metaboličkog pokretača može uticati kategorija ispitivanih hemikalija.

Priprema ispitivane hemikalije

Prije tretiranja ćelija čvrste ispitivane hemikalije trebalo bi pripremiti u prikladnim rastvaračima i prema potrebi razrijediti. Tečne ispitivane hemikalije mogu se dodati direktno u ispitni sistem i/ili razrijediti prije tretiranja ispitnog sistema. gasovite ili isparljive ispitivane hemikalije trebalo bi ispitivati nakon što se prikladno izmijene standardni protokoli, kao što je tretiranje u hermetički zatvorenim posudama za kulture. Ispitivanu hemikaliju potrebno je pripremiti neposredno prije tretiranja, osim ako je prema podacima o stabilnosti prihvatljivo skladištenje.

ISPITNI USLOVI

Rastvarača

Rastvarač bi trebalo odabrati tako da se optimizira rastvorljivost ispitivane hemikalije bez negativnih efekata na primjenu testa, kao što su npr. promjena rasta ćelija, efekat na integritet ispitivane hemikalije, reaguje s posudama za kulture ili oštećenje sistema metaboličke aktivacije. Preporučuje se da se, kada god je to moguće, prvo uzme u obzir upotreba vodenog rastvarača (ili medija za uzgoj kulture). Uobičajena su rastvarača voda ili dimetilsulfoksid. Generalno, organska rastvarača ne bi trebala prelaziti 1 % (v/v), dok vodena rastvarača (fiziološki rastvor ili voda) ne bi trebala prelaziti 10 % (v/v) u medijumu za završno tretiranje. Upotrebu neuobičajenih rastvarača (npr. etanola ili acetona) potrebno je opravdati podacima koji govore da su ta rastvarača kompatibilna s ispitivanim hemikalijama i ispitnim sistemom te da ne djeluju genotoksično pri upotrijebljenoj koncentraciji. Ako ne postoje takvi popratni podaci, važno je dodati netretirane kontrole kako bi se dokazalo da odabrani rastvarač nema štetne ili mutagene efekte.

MJERENJE CITOTOKSIČNOSTI I IZBOR KONCENTRACIJA TRETIRANJA

Pri utvrđivanju najviše koncentracije ispitivane hemikalije trebalo bi izbjegavati koncentracije koje imaju sposobnost izazivanja lažno pozitivnih odgovora, kao što su koncentracije koje izazivaju prekodnosnu citotoksičnost, taloženje u medijumu za uzgoj kulture ili znatne promjene pH-vrijednosti ili osmolalnosti. Ako ispitivana hemikalija u trenutku dodavanja uzrokuje znatnu

promjenu pH-vrijednosti medija, pH-vrijednost može se prilagoditi puferisanjem medija za završno tretiranje kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati te održali primjereni uslovi za uzgoj kulture.

Izbor koncentracije zasniva se na citotoksičnosti i drugim razmatranjima. Iako ocjena citotoksičnosti u početnom ispitivanju može biti korisna za bolje određivanje koncentracija koje će se upotrebljavati u glavnom eksperimentu, početno ispitivanje nije potrebno. Čak i ako se sprovodi početna ocjena citotoksičnosti, i dalje je obavezno mjerenje citotoksičnosti za svaku kulturu u glavnom eksperimentu. Ako se sprovodi eksperiment za utvrđivanje raspona, on treba obuhvatiti širok raspon koncentracija i može se završiti 1. dana nakon tretiranja ili nastaviti na 2. dan ekspresije i do selekcije mutanata (ako se pokaže da su upotrijebljene koncentracije primjerene).

Citotoksičnost treba utvrditi za svaku pojedinačnu ispitnu kulturu i kontrolnu kulturu: metode za MLA i TK6 utvrđene su međunarodno prihvaćenom praksom.

I za verziju testa MLA s agarom i s mikroporculanskim tanjirima sa udubljenjima citotoksičnost treba procijeniti upotrebom relativnog ukupnog rasta (RTG), koji su izvorno definišeli Clive i Spector 1975. Ta mjera uključuje relativni rast u suspenziji (RSG: ispitna kultura u u poređenju s kontrolom s rastvaračem) tokom tretiranja ćelija, vrijeme ekspresije i relativnu efektivnost kloniranja (RCE: ispitna kultura u u poređenju s kontrolom s rastvaračem) u trenutku izbora mutanata. Treba napomenuti da RSG obuhvata bilo kakav gubitak ćelija do kojeg dolazi u ispitnoj kulturi tokom tretiranja.

Za TK6: citotoksičnost bi se trebala ocjenjivati primjenom relativne stope preživljavanja (RS), tj. efektivnošću kloniranja ćelija koje se nasade odmah nakon tretiranja, prilagođeno za mogući gubitak ćelija tokom tretiranja, na osnovu broja ćelija u u poređenju s negativnom kontrolom (kojoj se dodjeljuje stopa preživljavanja od 100 %).

Potrebno je ocijeniti najmanje četiri ispitne koncentracije (ne uključujući kontrolu s rastvaračem i pozitivnu kontrolu) koje ispunjavaju kriterijume prihvatljivosti (odgovarajuća citotoksičnost, broj ćelija itd.). Iako se preporučuje upotreba uporednih kultura, za svaku se ispitivanu koncentraciju može upotrijebiti samo jedna tretirana kultura ili više njenih ponovljenih uzoraka. Rezultati dobijeni iz ponovljenih kultura pri određenoj koncentraciji trebali bi se navoditi odvojeno, ali mogu se objediniti radi analize podataka. Za ispitivane hemikalije koje pokazuju malu ili nikakvu citotoksičnost uglavnom će biti prikladne približno dvostruke ili trostruke koncentracije. Ako se pojavi citotoksičnost, treba odabrati koncentracije koje obuhvataju raspon citotoksičnosti od koncentracije koja uzrokuje citotoksičnost kako je opisano te uključujući koncentracije pri kojima se javlja umjerena citotoksičnost i one pri kojima je citotoksičnost mala ili je nema. Mnoge ispitivane hemikalije imaju oštre krive odgovora na koncentraciju te će za obuhvatanje cijelog raspona citotoksičnosti ili detaljno istraživanje odgovora na koncentracije možda biti potrebno upotrijebiti sličnije koncentracije i više od četiri koncentracije, posebno u situacijama u kojima je potrebno ponavljanje eksperimenta. Upotreba više od četiri koncentracije može biti naročito važna kada se upotrebljava jedna kultura.

Ako se maksimalna koncentracija zasniva na citotoksičnosti, najvećom koncentracijom trebao bi se nastojati ostvariti relativni ukupni rast od 20 do 10 % za MLA i relativna stopa preživljavanja od 20 do 10 % za TK6.

Za slabo rastvorive ispitivane hemikalije koje nisu citotoksične pri koncentracijama nižima od najniže koncentracije pri kojoj hemikalija nije rastvorljiva najviša bi analizirana koncentracija

trebala dovesti do zamućenosti ili taloga vidljivog golim okom ili inverznim mikroskopom na kraju tretiranja ispitivanom hemikalijom. Čak i ako se citotoksičnost pojavi iznad najniže nerastvorive koncentracije, preporučuje se ispitivanje pri samo jednoj koncentraciji koja dovodi do zamućenja ili s vidljivim talogom jer lažni efekti mogu biti posljedica taloga. Budući da se u testovima MLA i TK6 upotrebljavaju kulture u suspenziji, posebnu pažnju treba posvetiti tome da se osigura da talog ne utiče na izvođenje ispitivanja. Može biti korisno i odrediti rastvorljivost u medijumu za uzgoj kulture prije izvođenja eksperimenta.

Ako nisu uočeni talog ili ograničavajuća citotoksičnost, najviša ispitna koncentracija trebala bi odgovarati najnižoj od sljedećih vrijednosti: 10 mM, 2 mg/ml ili 2 µl/ml. Ako sastav ispitivane hemikalije nije definisan, npr. ako je riječ o supstancama nepoznatog ili promjenjivog sastava, složenim reakcijskim proizvodima ili biološkim materijalima (tj. hemijske supstance nepoznatog ili promjenjivog sastava ili UVCB supstance), proizvodima ekstrahovanim iz životne sredine itd., najvišu koncentraciju može biti potrebno povećati (npr. 5 mg/ml) u odsustvu dovoljne citotoksičnosti, a kako bi se povećala koncentracija svakog sastojka. Međutim, trebalo bi napomenuti da ti zahtjevi mogu biti drukčiji za farmaceutske proizvode namijenjene ljudima.

Kontrole

Kod svakog uslova eksperimenta potrebno je uključiti i istovremene negativne kontrole koje se sastoje samo od rastvarača u medijumu za tretiranje i koje su tretirane na isti način kao i kulture za tretiranje.
Istovremene pozitivne kontrole potrebne su za dokazivanje sposobnosti laboratorija za određivanje mutagena u uslovima upotrijebljenog protokola ispitivanja, efektivnosti egzogenog sistema metaboličke aktivacije (ako je primjenjivo) i za dokazivanje primjerenog otkrivanja i malih *TK* mutanata/mutanata koji se javljaju kasno i velikih *TK* mutanata/mutanata koji se javljaju rano. Primjeri pozitivnih kontrola navedeni su u tabeli 1. u nastavku. Ako je to opravdano, mogu se koristiti alternativne supstance za pozitivnu kontrolu. S obzirom na to da je *in vitro* ispitivanje genotoksičnosti na ćelijama sisara u dostatnoj mjeri standardizirano za kratkotrajna tretiranja (od tri do četiri sata) koja se istovremeno provode s metaboličkom aktivacijom i bez nje uz isto trajanje tretiranja, upotreba pozitivnih kontrola može se ograničiti na mutagene supstance koje zahtijevaju metaboličku aktivaciju. U tom će slučaju taj jedan odgovor pozitivne kontrole dokazati djelovanje sistema metaboličke aktivacije i osjetljivost ispitnog sistema. Ako se upotrebljava, dugotrajno tretiranje (tj. 24 sata bez S9) trebalo bi imati svoju pozitivnu kontrolu jer će se trajanje tretiranja razlikovati od ispitivanja u kojem se primjenjuje metabolička aktivacija. Svaku pozitivnu kontrolu trebalo bi primijeniti pri jednoj ili više koncentracija za koje se očekuje da će dovesti do ponovljivih i vidljivih povećanja u odnosu na pozadinu kako bi se dokazala osjetljivost ispitnog sistema, a odgovor ne bi trebala dovesti u pitanje citotoksičnost koja prelazi granične vrijednosti utvrđene u ovoj ispitnoj metodi.

Tabela 1. **Referentne supstance preporučene za ocjenu osposobljenosti laboratorija i za izbor pozitivnih kontrola**

Kategorija	Supstance	CAS br.
1. Mutageni aktivni bez metaboličke aktivacije		
Metil metansulfonat		66-27-

	3
Mitomicin C	50-07-7
4-nitrokinolin-N-oksid	56-57-5
2. Mutageni koji zahtijevaju metaboličku aktivaciju	
Benzo(a)piren	50-32-8
Ciklofosfamid (monohidrat)	50-18-0 (6055-19-2)
7,12-dimetilbenzantracen	57-97-6
3-metilkolantren	56-49-5

POSTUPAK

Tretiranje ispitivanom hemikalijom

Ćelije koje se razmnožavaju tretiraju se ispitivanom hemikalijom uz prisustvo i odsustvo sistema metaboličke aktivacije. Izlaganje treba trajati odgovarajuće vrijeme (obično je primjereno od tri do četiri sata). Međutim, trebalo bi napomenuti da ti zahtjevi mogu biti drukčiji za farmaceutske proizvode namijenjene ljudima (59.). Kod testa MLA u slučajevima kada se kratkotrajnim tretiranjem dobiju negativni rezultati, a postoje informacije koje ukazuje na potrebu za dužim tretiranjem (npr. nukleozidni analozi, slabo rastvorive hemikalije (5. i 59.)), treba razmotriti sprovođenje testa s dužim tretiranjem, tj. 24 sata bez S9.

Minimalni broj ćelija koje se koriste za svaku ispitnu kulturu (kontrolnu i tretiranu) u svakoj fazi ispitivanja trebao bi se bazirati na učestalosti pojave spontanih mutanata. Opšta je smjernica tretirati i pasažirati dovoljno ćelija u svakoj eksperimentnoj kulturi kako bi se održalo najmanje deset, ali po mogućnosti 100 spontanih mutanata u svim fazama testa (tretiranje, fenotipska ekspresija i selekcija mutanata) (56.).

Za test MLA preporučuje se prihvatljiva učestalost spontanih mutanata od 35–140 × 10-6 (verzija s agarom) i 50–170 × 10-6 (verzija s mikroporculanskim tanjirima sa udubljenjima) (vidjeti tabelu 2.). Da bi se dobilo najmanje deset, a po mogućnosti 100 spontanih mutanata koje će preživjeti tretiranje, za svaku ispitnu kulturu treba tretirati najmanje 6 × 106 ćelija.

Tretiranjem tog broja ćelija i održavanjem dovoljnog broja ćelija tokom ekspresije i kloniranja za selekciju mutanata dobija se dovoljan broj spontanih mutanata (deset ili više) tokom svih faza eksperimenta, čak i za kulture tretirane pri koncentracijama koje uzrokuju 90-postotnu citotoksičnost (kako je izmjereno relativnim ukupnim rastom od 10 %) (19., 38. i 39.).

Za test TK6 učestalost spontanih mutanata Generalno iznosi od 2 do 10 × 10-6. Da bi se dobilo najmanje deset spontanih mutanata koje će preživjeti tretiranje, za svaku kulturu treba tretirati najmanje 20 × 106 ćelija. Tretiranjem tog broja ćelija dobija se dovoljan broj spontanih mutanata (deset ili više), čak i za kulture tretirane pri koncentracijama koje uzrokuju 90-postotnu citotoksičnost tokom tretiranja (relativna stopa preživljavanja od 10 %). Osim toga, mora se kultivirati dovoljan broj ćelija tokom perioda ekspresije i nasaditi radi selekcije mutanata (60.).

Vrijeme fenotipske ekspresije i mjerenje citotoksičnosti i učestalosti pojave mutanata

Opis kolonije mutanata

Na kraju perioda tretiranja ćelije se kultiviraju u zadanom vremenskom razdoblju kako bi se omogućila gotovo optimalna fenotipska ekspresija novoindukovanih mutacija; specifično za svaku ćelijsku liniju. Za test MLA period fenotipske ekspresije iznosi dva dana. Za test TK6 period fenotipske ekspresije iznosi od tri do četiri dana. Ako se upotrebljava tretiranje u trajanju od 24 sata, period ekspresije počinje nakon kraja tretiranja.

Tokom perioda fenotipske ekspresije ćelije se prebrojavaju svakog dana. Kod testa MLA svakodnevno brojanje ćelija upotrebljava se za izračun svakodnevnog rasta u suspenziji (SG). Nakon dvodnevnog perioda ekspresije ćelije se suspendujeju u medijumu sa selektivnim agensom ili bez njega radi utvrđivanja broja mutacija (ploče za izbor) i efektivnosti kloniranja (ploče za vijabilnost). Za test MLA postoje dvije jednako prihvatljive metode za kloniranje selekcije mutanata; u jednoj se upotrebljava meki agar, a u drugom tekući medij u pločama s 96 udubljenja (19., 38. i 39.). Kloniranje u testu TK6 sprovodi se upotrebom tekućih medija i ploča s 96 udubljenja (16.).

Za TK mutante kao selektivni agens preporučuje se samo trifluorotimidin (TFT) (61).

Kod testa MLA agarne ploče i ploče s mikroporculanskim tanjirima sa udubljenjima prebrojavaju se nakon 10–12 dana inkubacije. Kod testa TK6 kolonije u pločama s mikroporculanskim tanjirima sa udubljenjima ocjenjuju se nakon 10–14 dana kako bi se uočili mutanti koji se javljaju rano. Kako bi se obnovili TK6 mutanti koji rastu sporo (koji se javljaju kasno), ćelijama treba ponovno dodati medij za uzgoj i TFT nakon što se prebroje mutanti koji se javljaju rano i zatim inkubirati ploče dodatnih 7–10 dana (62.).

Odgovarajući izračuni za dva testa, uključujući i dvije metode (agar i mikroposude sa udubljenjima) za test MLA, nalaze se u Dodatku 2. Kod metode testa MLA u kojoj se upotrebljava agar, za izračun učestalosti pojave mutanata kolonije se prebrojavaju i broj kolonija mutanata prilagođava se s obzirom na efektivnost kloniranja. Kod verzije testova MLA i TK6 s mikroporculanskim tanjirima sa udubljenjima, efektivnost kloniranja i za ploče za selekciju i za ploče za efektivnost kloniranja (63.) utvrđuje se u skladu s Poissonovom distribucijom. Učestalost pojave mutanata računa se iz tih dviju efektivnosti kloniranja.

Kod testa MLA, ako je ispitivana hemikalija pozitivna, opisivanje kolonije klasifikovanjem po veličini kolonije ili po njenom rastu treba sprovesti na najmanje jednoj od ispitnih kultura (obično

najviša prihvatljiva pozitivna koncentracija) te na negativnim i pozitivnim kontrolama. Ako je ispitivana hemikalija negativna, opisivanje kolonije mutanata treba sprovesti na negativnim i pozitivnim kontrolama. Kod metode testa MLA s mikroporculanskim tanjirima sa udubljenjima mutanti koji tvore male kolonije definišeju se kao mutanti koji prekrivaju manje od 25 % prodnosa posude sa udubljenjima, a mutanti koji tvore velike kolonije kao oni koji prekrivaju više od 25 % prodnosa posude sa udubljenjima. Kod metode s agarom za prebrojavanje kolonija mutanata i klasifikovanje kolonija po veličini upotrebljava se automatski brojač kolonija. Pristupi klasifikovanju kolonija po veličini detaljno su opisani u literaturi. Opis kolonija na negativnoj i pozitivnoj kontroli potreban je kako bi se dokazalo da su studije provedene na primjeren način.

Ne može se utvrditi da je ispitivana hemikalija negativna ako se u pozitivnoj kontroli pravilno ne otkriju i mutanti koji tvore velike kolonije i oni koji tvore male kolonije. Opis kolonije može se upotrijebiti za davanje opštih informacija o sposobnosti ispitivane hemikalije da uzrokuje tačkaste mutacije i/ili hromosomske pojave.

TK6: mutanti koji rastu normalno i oni koji rastu sporo razlikuju se prema različitim vremenima inkubacije. Kod testa TK6 mutanti koji se javljaju rano i oni koji se javljaju kasno obično se ocjenjuju za sve kulture, uključujući negativne i pozitivne kontrole. Opis kolonija negativne i pozitivne kontrole potreban je kako bi se dokazalo da su studije provedene na primjeren način. Ne može se utvrditi da je ispitivana hemikalija negativna ako se u pozitivnoj kontroli pravilno ne otkriju i mutanti koji se javljaju rano i mutanti koji se javljaju kasno. Opis kolonije može se upotrijebiti za davanje opštih informacija o sposobnosti ispitivane hemikalije da uzrokuje tačkaste mutacije i/ili hromosomske pojave.

Osposobljenost laboratorija

Kako bi dokazao da ima dovoljno iskustva u izvođenju testa prije njegove rutinske primjene, laboratorij treba izvesti niz eksperimenta s referentnim pozitivnim supstancama koje djeluju putem različitih mehanizama (najmanje jedna aktivna s metaboličkom aktivacijom i jedna aktivna bez metaboličke aktivacije, odabrana s lista supstanci iz tabele 1.) te s različitim negativnim kontrolama (uključujući netretirane kulture i različita rastvarača/nosače). Odgovori pozitivnih i negativnih kontrola trebali bi biti u skladu s literaturom. Taj se zahtjev ne odnosi na laboratorije s iskustvom, odnosno laboratorije s bazom prošlih podataka koja je stavljena na rapolaganje. Kod testa MLA vrijednosti koje se dobiju i za pozitivne i za negativne kontrole trebaju biti u skladu s preporukama IWGT-a (vidjeti tabelu 2.).
Izbor supstance za pozitivnu kontrolu (vidjeti tabelu 1.) trebao bi se ispitati s kratkim i dugim tretiranjima (ako se upotrebljavaju duga tretiranja) u odsustvu metaboličke aktivacije i kratkim tretiranjima u prisustvu metaboličke aktivacije kako bi se dokazala osposobljenost za otkrivanje mutagenih hemikalija, za utvrđivanje djelotvornosti sistema metaboličke aktivacije i za dokazivanje primjerenosti uslova za rast ćelija tokom tretiranja, fenotipske ekspresije i selekcije mutanata te postupaka ocjenjivanja. Potrebno je izabrati raspon koncentracija odabranih supstanci pri kojima će doći do ponovljivih povećanja u odnosu na pozadinu, koja su povezana s koncentracijom, kako bi se dokazala osjetljivost i dinamički raspon ispitnog sistema.

Podaci o prošlim kontrolama

Laboratorij bi trebao utvrditi:

— raspon i distribuciju prošlih pozitivnih kontrola,

—raspon i distribuciju prošlih negativnih kontrola (netretirane kulture, kontrole s rastvaračem).
Pri prvom bi dobijanju podataka za distribuciju podataka o prošlim negativnim kontrolama istovremene negativne kontrole trebale biti u skladu s objavljenim podacima o negativnim

kontrolama. Kako se budu dodavali novi eksperimentalni podaci o distribuciji kontrola, istovremene negativne kontvartrole trebale bi u idealnom slučaju biti unutar kontrolnih granica od 95 % te distribucije (64. i 65.).
Baza podataka o prošlim negativnim kontrolama laboratorija trebala bi u početku obuhvatati najmanje deset eksperimenta, međutim bilo bi poželjno da se sastoji od najmanje 20 eksperimenta provedenih u uporedivim eksperimentnim uslovima. Laboratoriji bi trebali primjenjivati metode za kontrolu kvalitete, kao što su kontrolni dijagrami (npr. C-dijagrami ili X-stupčasti dijagrami; 65.), kako bi utvrdili koliko su promjenjivi njihovi podaci o pozitivnim i negativnim kontrolama i dokazali da je u njihovu laboratoriju metodologija „pod kontrolom" (66.). Dalje pojedinosti i preporuke o tome kako izraditi i upotrebljavati prošle podatke mogu se pronaći u literaturi (64.).
Istovremene negativne kontrole u idealnom bi slučaju trebale biti unutar kontrolnih granica od 95 % distribucije prošlih negativnih kontrola koje se nalaze u bazi podataka laboratorija. Ako se podaci o negativnim kontrolama nalaze izvan kontrolnih granica od 95 %, mogu biti prihvatljivi za uključenje u distribuciju prošlih kontrola pod uslovom da ti podaci nisu ekstremne netipične vrijednosti te da postoje dokazi o tome da je ispitni sistem „pod kontrolom".
Svaku izmjenu eksperimentnog protokola trebalo bi razmotriti s obzirom na to jesu li podaci u skladu s postojećim bazama podataka laboratorija o prošlim kontrolama. Svaka veća nesukladnost trebala bi dovesti do uspostave nove baze podataka o prošlim kontrolama.

PODACI I IZVJEŠTAVANJE

Predstavljanje rezultata

Predstavljanje podataka i za test MLA i za test TK6 treba uključivati, i za tretirane i kontrolne kulture, podatke potrebne za izračun citotoksičnosti (relativni ukupni rast ili relativna stopa preživljavanja) i učestalosti pojave mutanata, kako je opisano u nastavku.
Kod testa MLA treba navesti podatke o pojedinačnim kulturama za relativni rast u suspenziji, relativni ukupni rast, efektivnost kloniranja u trenutku selekcije mutanata i broj kolonija mutanata (za verziju s agarom) ili broj praznih udubljenja (za verziju s mikroporculanskim tanjirima sa udubljenjima). Učestalost pojave mutanata treba izraziti kao broj mutiranih ćelija na milijun preživjelih ćelija. Ako je odgovor pozitivan, učestalost pojave mutanata u malim i velikim kolonijama (i/ili postotak ukupne učestalosti pojave mutanata) treba navesti za barem jednu koncentraciju ispitivane hemikalije (obično najviša pozitivna koncentracija) te negativne i pozitivne kontrole. U slučaju negativnog odgovora učestalost pojave mutanata u malim i velikim kolonijama treba navesti za negativnu i pozitivnu kontrolu.
Kod testa TK6 podatke o pojedinačnim kulturama treba navesti za relativnu stopu preživljavanja, efektivnost kloniranja u trenutku selekcije mutanata i broj praznih udubljenja za mutante koji se javljaju rano i one koji se javljaju kasno. Učestalost pojave mutanata treba izraziti kao broj mutiranih ćelija na broj preživjelih ćelija, a treba uključivati ukupnu učestalost pojave mutanata te učestalost pojave mutanata (i/ili postotak ukupne učestalosti pojave mutanata) koji se javljaju rano i onih koji se javljaju kasno.

Kriterijumi prihvatljivosti

I za test MLA i za test TK6 treba ispuniti sljedeće kriterijume prije nego što se utvrde ukupni rezultati za određenu ispitivanu hemikaliju:

—provedena su dva eksperimentna uslova (kratko tretiranje s metaboličkom aktivacijom i bez nje), osim ako je jedan doveo do pozitivnih rezultata,

— odgovarajući broj ćelija i koncentracija prikladan je za analizu,

— kriterijumi za izbor najveće koncentracije.

Kriterijumi prihvatljivosti za negativne i pozitivne kontrole

Analiza velike količine podataka iz testova MLA koju je provela IWGT-ova Stručna grupa za MLA dovela je do međunarodnog konsenzusa u pogledu specifičnih kriterijuma prihvatljivosti za test MLA (1., 2., 3., 4. i 5.). Stoga se u toj ispitnoj metodi navode specifične preporuke za utvrđivanje prihvatljivosti negativnih i pozitivnih kontrola te za procjenu rezultata pojedinačnih supstanci u testu MLA. Baza podataka za test TK6 mnogo je manja te ga stručna grupa nije procjenjivala.

Kod testa MLA svaki eksperiment treba procijeniti s obzirom na to ispunjava li netretirana kontrola/kontrola s rastvaračem kriterijume prihvatljivosti IWGT-ove Stručne grupe za MLA (4. i tabela 2. u nastavku) za: 1. učestalost pojave mutanata (treba napomenuti da se IWGT-ove prihvatljive učestalosti pojave mutanata razlikuju za verzije testa MLA s agarom i mikroporculanskim tanjirima sa udubljenjima); 2. efektivnost kloniranja (CE) u trenutku selekcije mutanata i 3. rast u suspenziji (SG) za kontrolu s rastvaračem (formule potražiti u Dodatku 2.).

Tabela 2. **Kriterijumi prihvatljivosti za MLA**

Parametar	**Metoda s mekim agarom**	**Metoda s mikroporculanskim tanjirima sa udubljenjima**
Učestalost pojave mutanata	35 – 140 × 10^{-6}	50 – 170 × 10^{-6}
Efektivnost kloniranja	65–120 %	65–120 %
Rast u suspenziji	8–32 puta (tretiranje od tri do četiri sata) 32–180 puta (tretiranje od 24 sata, ako se sprovodi)	8–32 puta (tretiranje od tri do četiri sata) 32–180 puta (tretiranje od 24 sata, ako se sprovodi)

Kad je riječ o testu MLA, svaki test treba procijeniti i u pogledu toga ispunjavaju li pozitivne kontrole barem jedan od sljedeća dva kriterijuma prihvatljivosti koje je razvila stručna grupa IWGT-a:

—pozitivna kontrola trebala bi pokazati apsolutno povećanje ukupne učestalosti pojave mutanata, tj. povećanje veće od pozadinske učestalosti pojave spontanih mutanata (indukujena učestalost pojave mutanata (IMF)) od najmanje 300 × 10^{-6}. Najmanje 40 % IMF-a trebalo bi se odraziti u učestalosti pojave mutanata u maloj koloniji,

—pozitivna kontrola pokazuje povećanje učestalosti pojave mutanata u maloj koloniji koje je za najmanje 150×10^{-6} veće od učestalosti u istovremenoj netretiranoj kontroli/kontroli s rastvaračem (IMF u malim kolonijama od 150×10^{-6}).

Kad je riječ o testu TK6, test će biti prihvatljiv ako se istodobna negativna kontrola smatra prihvatljivom za dodavanje u bazu podataka laboratorija o prošlim negativnim kontrolama. Osim toga, istovremene pozitivne kontrole trebale bi indukovati odgovore koji su u skladu s onima generiranima u bazi podataka o prošlim pozitivnim kontrolama te dovesti do statistički značajnog povećanja u odnosu na istovremenu negativnu kontrolu.

Kod oba bi testa gornja granica citotoksičnosti uočene kod pozitivne kontrolne kulture trebala biti ista kao i kod eksperimentnih kultura. Drugim riječima, relativni ukupni rast ili relativna stopa preživljavanja ne bi trebali biti manji od 10 %. Dovoljno je upotrijebiti jednu koncentraciju (ili jednu od koncentracija pozitivnih kontrolnih kultura ako se upotrebljava više koncentracija) kako bi se dokazalo da su ispunjeni kriterijumi prihvatljivosti za pozitivnu kontrolu. Nadalje, učestalost pojave mutanata pozitivne kontrole mora biti unutar prihvatljivog raspona utvrđenog za laboratorij.

Ocjenjivanje i tumačenje rezultata

Za test MLA znatan posao u vezi s biološkom relevantnosti i kriterijumima za pozitivni odgovor obavila je IWGT-ova stručna grupa za limfome miša. Stoga se u ovoj ispitnoj metodi pružaju specifične preporuke za tumačenje rezultata ispitivanih hemikalija iz testa MLA. Baza podataka za test TK6 mnogo je manja te ga stručna grupa nije procjenjivala. Stoga su preporuke za tumačenja podataka za test TK6 opštenitiji. Dodatne preporuke primjenjuju se na oba testa.

MLA

Preporučuje se pristup za utvrđivanje pozitivnih i negativnih odgovora kako bi se osiguralo da je povećana učestalost pojave mutanata biološki relevantna. Umjesto statističke analize koja se obično upotrebljava za ostale testove, ovaj se pristup oslanja na upotrebu unaprijed utvrđene indukujene učestalosti pojave mutanata (tj. povećanje učestalosti pojave mutanata veće nego u istovremenoj kontroli), određene kao globalni evaluacijski faktor (GEF), koji se zasniva na analizi distribucije podataka o učestalosti pojave mutanata u negativnoj kontroli iz uključenih laboratorija (4.). Kod verzije testa s agarom GEF iznosi 90×10^{-6}, a za verziju testa MLA s mikroporculanskim tanjirima sa udubljenjima GEF iznosi 126×10^{-6}.

Pod uslovom da su ispunjeni svi kriterijumi prihvatljivosti, ispitivana hemikalija smatra se jasno pozitivnom ako je u bilo kojem ispitanom eksperimentnom uslovu povećanje učestalosti pojave mutanata u odnosu na istovremeno sprovedeno pozadinsko mjerenje veće od GEF-a te je povezano s koncentracijom (npr. upotrebom testa trenda). Tada se smatra da ispitivana hemikalija može indukovati mutacije u tom ispitnom sistemu.

Pod uslovom da su ispunjeni svi kriterijumi prihvatljivosti, ispitivana hemikalija smatra se jasno negativnom ako u svim ispitnim eksperimentnim uslovima nema odgovora povezanog s koncentracijom ili, ako postoji povećanje učestalosti pojave mutanata, ono nije veće od GEF-a. Tada se smatra da ispitivana hemikalija ne može indukovati mutacije u tom ispitnom sistemu.

TK6

Pod uslovom da su ispunjeni svi kriterijumi prihvatljivosti, ispitivana hemikalija smatra se jasno pozitivnom ako je u bilo kojem od ispitanih eksperimentnih uslova:

—najmanje pri jednoj ispitnoj koncentraciji uočeno je statistički značajno povećanje u odnosu na istovremenu negativnu kontrolu,

— odgovarajući test trenda pokazuje da je povećanje povezano s koncentracijom,

—bilo koji od rezultata je izvan distribucije podataka o prošlim negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji;

Kada su ispunjeni svi ti uslovi, smatra se da ispitivana hemikalija može indukovati mutacije u tom sistemu ispitivanja. Preporuke za najprikladnije statističke metode nalaze se u literaturi.
Pod uslovom da su ispunjeni svi kriterijumi prihvatljivosti, ispitivana hemikalija smatra se jasno negativnom ako u svim ispitanim eksperimentnim uslovima:

—ni pri jednoj ispitnoj koncentraciji nije uočeno statistički značajno povećanje u odnosu na istovremenu negativnu kontrolu,

—odgovarajući test trenda pokazuje da nema povećanja povezanog s koncentracijom,

—svi su rezultati u okviru distribucije podataka o prošlim negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji;.

Tada se smatra da ispitivana hemikalija ne može indukovati mutacije u tom ispitnom sistemu.

I za test MLA i za test TK6:

Ako se najveća koncentracija zasniva na citotoksičnosti, najvećom koncentracijom trebao bi se nastojati ostvariti RTG/RS od 20 do 10 %. Konsenzus je da treba oprezno tumačiti pozitivne rezultate koji se nalaze samo u rasponu RTG-a/RS-a od 20 do 10 % te da se rezultat neće smatrati pozitivnim ako je do povećanja učestalosti pojave mutanata došlo samo kod RTG-a/RS-a od 10 % ili manjeg (ako se procjenjuje).
Postoje određene okolnosti u kojima dodatne informacije mogu pomoći u utvrđivanju da ispitivana hemikalija nije mutagena ako nema kulture koja pokazuje vrijednost RTG-a od 10 do 20 % RTG-a/RS-a. Te su situacije sažete u nastavku teksta. 1. Ne postoje dokazi o mutagenom efektu (npr. nema odgovora na dozu, nema učestalosti pojave mutanata veće od one koja se uočava kod istovremene negativne kontrole ili u odnosu na prošle pozadinske raspone itd.) u nizu podatkovnih tačaka od 100 % do 20 % RTG-a/RS-a te postoji barem jedna podatkovna tačka u rasponu od 20 do 25 % RTG-a/RS-a. 2. Ne postoje dokazi o mutagenom efektu (npr. nema odgovora na dozu, nema učestalosti pojave mutanata veće od one koja se uočava kod istovremene negativne kontrole ili u odnosu na prošle pozadinske raspone itd.) u nizu podatkovnih tačaka od 100 % do 25 % RTG-a/RS-a te postoji i negativna podatkovna tačka koja je malo niža od 10 % RTG-a/RS-a. U te dvije situacije može se zaključiti da je ispitivana hemikalija negativna.
Jasno pozitivan ili negativan odgovor nije potrebno provjeravati.
Ako odgovor nije ni jasno pozitivan ni jasno negativan kako je prethodno opisano i/ili kako bi se pridonijelo utvrđivanju biološke relevantnosti rezultata, podatke bi trebalo ocjenjivati na osnovu stručne prosudbe i/ili daljih istraživanja. Moglo bi biti korisno ponoviti eksperiment, eventualno u izmijenjenim eksperimentnim uslovima (npr. razmak između koncentracija kako bi se povećala vjerovatnost dobijanja podatkovnih tačaka u rasponu od 10 do 20 % RTG-a/RS-a, upotreba drugih uslova metaboličke aktivacije (tj. koncentracija S9 ili porijeklo S9) i trajanje tretiranja).
U rijetkim slučajevima, čak i nakon dodatnih istraživanja, skup podataka neće omogućiti donošenje zaključka o tome je li rezultat pozitivan ili negativan. Stoga bi se trebalo zaključiti da je odgovor na ispitivanu hemikaliju dvosmislen (tumači se da je jednako vjerovatno da je pozitivan ili negativan).

IZVJEŠTAJ O ISPITIVANJU

Izvještaj o ispitivanju trebalo bi da sadrži sljedeće informacije:

Ispitivana hemikalija:

— izvor, broj serije, rok upotrebe, ako su dostupni,

— stabilnost ispitivane hemikalije, ako je poznata,

— rastvorljivost i stabilnost ispitivane hemikalije u rastvraču, ako su poznate,

—izmjerene vrijednosti za pH, osmolalnost i taloženje u medijumu za uzgoj kulture u koju je dodata ispitivana hemikalija, prema potrebi.

Supstance s jednim sastojkom:

— fizički izgled, rastvorljivost u vodi i druga relevantna fizičko-hemijska svojstva,

—hemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.

Supstance s više sastojaka, UVCB supstance i smješe:

—opis (koliko je to moguće) hemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizičko-hemijskih svojstava sastojaka.

Rastvarač:

— obrazloženje izbora rastvarača,

— postotak rastvarača u konačnom medijumu za uzgoj kulture.

Ćelije:

za laboratorijske glavne kulture:

— vrsta i izvor ćelija te prethodna upotreba u ispitnom laboratoriju,

— kariotipna svojstva i/ili modalni broj hromosoma,

— metode održavanja ćelijskih kultura,

— odsustvo mikoplazme,

— vremena udvostručivanja ćelija.

Ispitni uslovi:

—obrazloženje izbora koncentracija i broja ćelijskih kultura, uključujući, npr. podatke o citotoksičnosti i ograničenja rastvorljivosti,

— sastav medija, koncentracija CO_2, nivoa vlažnosti,

—koncentracija ispitivane hemikalije izražena kao konačna koncentracija u medijumu za uzgoj kulture (npr. µg ili mg/ml ili mM medija za uzgoj kulture),

—koncentracija (i/ili volumen) rastvarača i ispitivane hemikalije koji su dodani medijumu za uzgoj kulture,

— temperatura inkubacije,

— vrijeme inkubacije,

— trajanje tretiranja,

— gustina ćelija za vrijeme tretiranja,

—vrsta i sastav sistema metaboličke aktivacije (izvor S9, metoda pripreme mješavine S9, koncentracija ili volumen mješavine S9 i S9 u konačnom medijumu za uzgoj kulture, kontrole

kvalitete S9),

—Supstance za pozitivnu i negativnu kontrolu, konačne koncentracije za svaki uslov tretiranja,

—dužina perioda ekspresije (uključujući broj nasađenih ćelija te režim uzgoja supkultura i dodavanja hranjivih supstanci, ako je primjereno),

— identitet selektivnog agensa i njegova koncentracija,

—kod testa MLA treba navesti primijenjenu metodu (agar ili mikroposude sa udubljenjima),

— kriterijumi prihvatljivosti testova,

— metode korištene za prebrojavanje vijabilnih i mutiranih ćelija,

— metode mjerenja citotoksičnosti,

—sve dodatne informacije koje se odnose na citotoksičnost i upotrijebljenu metodu,

— trajanje inkubacije nakon nasađivanja,

—definicija kolonija kod kojih se razmatra veličina i vrsta (uključujući kriterijume za „male” i „velike” kolonije, ako je primjereno),

—kriterijumi prema kojima se studija smatra pozitivnom, negativnom ili dvosmislenom,

—metode upotrijebljene za određivanje pH-vrijednosti i osmolalnosti, ako se provode, te za određivanje taloženja, ako je relevantno.

Rezultati:

— broj tretiranih ćelija i broj supkultiviranih ćelija za svaku kulturu,

— parametri toksičnosti (RTG za MLA i RS za TK6),

— znaci taloženja i vrijeme utvrđivanja,

— broj ćelija nasađenih u selektivni i neselektivni medij,

—broj kolonija u neselektivnom medijumu i broj otpornih kolonija u selektivnom medijumu te povezana učestalost pojave mutanata,

—klasifikovanje kolonija po veličini za negativne i pozitivne kontrole, a ako je ispitivana hemikalija pozitivna, najmanje jedna koncentracija i povezane učestalosti pojave mutanata,

— odnos koncentracije i odgovora, ako je moguće,

—podaci o istodobnim negativnim kontrolama (rastvarač) i pozitivnim kontrolama (koncentracije i rastvarača),

—podaci o prošlim negativnim (rastvarač) i pozitivnim kontrolama (koncentracije i rastvarača) s rasponima, srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama, broj ispitivanja na kojima se baziraju kontrole iz prošlih ispitivanja,

—statističke analize (za pojedinačne kulture i objedinjena ponavljanja ako je primjereno) i p-vrijednosti, ako postoje, te procjena GEF-a za test MLA.

Rasprava o rezultatima

Zaključak

Dodatak 2.

FORMULE

Citotoksičnost

Za obje verzije testa MLA (s agarom i mikroporculanskim tanjirima sa udubljenjima)

Citotoksičnost se definiše kao relativni ukupni rast (RTG), što uključuje relativni rast u suspenziji (RSG) tokom dvodnevnog perioda ekspresije i relativnu efektivnost kloniranja (RCE) dobijenu u trenutku selekcije mutanata. RTG, RSG i RCE izražavaju se kao postotak.

Izračun RSG-a: rast u suspenziji jedan (SG_1) stopa je rasta od nultog do prvog dana (koncentracija ćelija prvog dana/koncentracija ćelija nultog dana), a rast u suspenziji dva (SG_2) stopa je rasta od prvog do drugog dana (koncentracija ćelija drugog dana/koncentracija ćelija prvog dana). RSG je ukupni SG (SG_1 x SG_2) za tretiranu kulturu u u poređenju s netretiranom kontrolom/kontrolom s rastvaračem. To jest: RSG = [$SG_{1\ (test)}$ x $SG_{2\ (test)}$] /[$SG_{1\ (kontrola)}$ x $SG_{2\ (kontrola)}$]. SG_1 treba izračunati iz početne koncentracije ćelija koja je upotrijebljena na početku tretiranja ćelija. Time se uzima u obzir bilo kakva diferencijalna citotoksičnost do koje dolazi u ispitivanim kulturama tokom tretiranja ćelija.

RCE je relativna efektivnost kloniranja ispitivane kulture u u poređenju s relativnom efektivnošću kloniranja netretirane kontrole/kontrole s rastvaračem dobijena u trenutku selekcije mutanata.

Relativni ukupni rast (RTG): RTG = RSG x RCE

TK6

Relativna stopa preživljavanja (RS):

Citotoksičnost se procjenjuje relativnom stopom preživljavanja, tj. efektivnošću kloniranja ćelija koje se nasade odmah nakon tretiranja, prilagođeno za mogući gubitak ćelija tokom tretiranja u odnosu na efektivnost kloniranja u negativnim kontrolama (kojima se dodjeljuje stopa preživljavanja od 100 %). Prilagođavanje za gubitak ćelija tokom tretiranja može se izračunati na sljedeći način:

$$prilagođeni\ CE = \mathrm{CE}\ \mathrm{x} \frac{broj\ ćelija\ na\ kraju\ tretiranja}{broj\ ćelija\ na\ početku\ tretiranja}$$

Relativna stopa preživljavanja za kulturu tretiranu ispitivanom hemikalijom računa se na sljedeći način:

$$RS = \frac{prilagođeni\ CE\ u\ tretiranoj\ kulturi}{prilagođeni\ CE\ u\ kontroli\ sa\ rastvaračem} x100$$

Učestalost pojave mutanata za testove MLA i TK6

Učestalost pojave mutanata (MF) efektivnost je kloniranja kolonija mutanata u selektivnom medijumu (CE_M), prilagođeno s obzirom na efektivnost kloniranja u neselektivnom medijumu u trenutku selekcije mutanata (CE_V). Drugim riječima, MF = CE_M/CE_V. Izračun tih dviju efektivnosti kloniranja za metode kloniranja s agarom i mikroporculanskim tanjirima sa udubljenjima opisan je u nastavku.

***Verzija testa MLA s agarom*:** u verziji testa MLA s mekim agarom broj kolonija na ploči za selekciju mutanata (C_M) i broj kolonija na neprobranoj ploči ili ploči za efektivnost kloniranja (broj vijabilnih ćelija) (C_V) dobija se izravnim brojanjem klonova. Ako se 600 ćelija nasadi na ploče za selekciju mutanata (CE_M) za efektivnost kloniranja (CE) te na neprobrane ploče ili ploče za efektivnost kloniranja (broj vijabilnih ćelija) (CE_V) te se za selekciju mutanata upotrijebi 3 × 10^6 ćelija,

$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$

$CE_V = C_V / 600$

Verzija testova MLA i TK6 s mikroporculanskim tanjirima sa udubljenjima: u verziji testa MLA C_M i C_V utvrđuju se kao umnožak ukupnog broja mikroudubljenja (TW) i vjerovatnog broja kolonija po jažici (P) na pločama s mikroporculanskim tanjirima sa udubljenjima.

$C_M = P_M \times TW_M$

$C_V = P_V \times TW_V$

Od nulte tačke Poissonove distribucije (Furth et al., 1981.) P se određuje kao

$P = -\ln (EW / TW)$

Pri tom EW označava prazne posude sa udubljenjima, a TW ukupne posude sa udubljenjima. Zato je

$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$

$CE_V = CV / TV = (P_V \times TW_V) / T_V$

Kod verzije testa MLA s mikroporculanskim tanjirima sa udubljenjima učestalost pojave mutanata u malim i velikim kolonijama računat će se na isti način, upotrebom odgovarajućeg broja praznih udubljenja za male i velike kolonije.

Kod testa TK6 učestalost pojave mutanata u malim i velikim kolonijama zasniva se na mutantima koji se javljaju rano i onima koji se javljaju kasno.

B.68. IN VITRO ISPITNA METODA S KRATKIM VREMENOM IZLAGANJA ZA UTVRĐIVANJE: i. HEMIKALIJA KOJE INDUKUJEJU TEŠKU POVREDU OKA I ii. HEMIKALIJA KOJE NIJE POTREBNO KLASIFIKOVATI S OBZIROM NA NADRAŽIVANJE OKA ILI TEŠKU POVREDU OKA

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 491 (2017.). *In vitro* ispitna metoda s kratkim vremenom izlaganja (STE) jest *in vitro* metoda koja se može upotrebljavati u određenim okolnostima i uz specifična ograničenja za klasifikovanje i označivanje hemikalija (supstance i smješe) koje indukujeju tešku povredu oka s obzirom na opasnosti te onih za koje nije potrebno klasifikovanje s obzirom na tešku povredu oka ili nadraživanje oka.

Duži niz godina potencijal opasnosti hemikalija za oko ocjenjivao se prvenstveno upotrebom *in vivo* ispitivanja na oku kunića (ispitna metoda B.5. (8.), ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 405). Opšte je prihvaćena činjenica da se u doglednoj budućnosti *in vivo* ispitivanje na oku kunića neće moći potpuno zamijeniti nijednim alternativnim pojedinačnim *in vitro* ispitivanjem za predviđanje različitih hemijskih klasaa u punom rasponu teških ozljeda oka/nadraživanja oka. Međutim, kao potpuna zamjena za ispitivanje na oku kunića mogle bi se primjenjivati strateške kombinacije alternativnih ispitnih metoda u okviru strategije (višerazinskog) ispitivanja. Pristup odozgo prema dolje osmišljen je za ispitivanje hemikalija za koje se na osnovu postojećih informacija može očekivati da imaju veliki potencijal za nadražujuće djelovanje ili da indukujeju teške ozljede oka. Nasuprot tome, pristup odozdo prema gore osmišljen je za ispitivanje hemikalija za koje se na osnovu postojećih informacija može očekivati da ne izazivaju dovoljno nadraživanje oka da bi ih se moralo klasifikovati. Iako se ispitna metoda STE ne smatra potpunom zamjenom za *in vivo* ispitivanje na oku kunića,

primjerena je za upotrebu kao dio strategije višerazinskog ispitivanja za regulatorno klasifikovanje i označivanje, kao što je pristup odozgo prema dolje/odozdo prema gore, kako bi se bez daljeg ispitivanja utvrdile: i. hemikalije koje indukujeju tešku povredu oka (kategorija 1. sistema UN GHS/CLP-a) i ii. hemikalije (pri čemu se isključuju vrlo isparljivo tvari i sve hemikalije u čvrstom stanju osim površinski aktivnih supstanci) koje nije potrebno klasifikovati u pogledu nadraživanja ili teške ozljede oka (bez kategorije prema sistemu UN GHS/CLP-u) (1. i 2.). Međutim, hemikalija za koju se ispitnom metodom STE ne predvidi ni da indukuje tešku povredu oka (kategorija 1. sistema UN GHS/CLP-a) ni da je bez kategorije prema sistemu UN GHS/CLP-u (ne indukuje ni teške ozljede oka ni nadraživanje oka) morala bi se dodatno ispitati kako bi se utvrdilo konačno klasifikovanje. Nadalje, prije primjene ispitne metode STE u okviru pristupa odozdo prema gore u skladu s drugim shemama klasifikovanja osim sistema UN GHS/CLP-a trebalo bi se savjetovati s odgovarajućim regulatornim tijelima. Izbor najprimjerenije ispitne metode i upotrebu te ispitne metode treba razmotriti u kontekstu Smjernica OECD-a o integrisanim pristupima ispitivanju i procjeni za teške ozljede oka i nadraživanje oka.

Svrha je ove ispitne metode opisati postupke koji se primjenjuju za ocjenjivanje potencijala opasnosti ispitivane hemikalije za oko na osnovu njene sposobnosti indukovanja citotoksičnosti u ispitnoj metodi s kratkim vremenom izlaganja. Citotoksični efekat hemikalija na epitelne ćelije rožnjače važan je način djelovanja (MOA) koji dovodi do oštećenja epitela rožnjače i nadraživanja oka. Vijabilnost ćelija u ispitnoj metodi STE procjenjuje se kvantitativnim mjerenjem nakon što se iz ćelija ekstrahira sol plavog formazana koju proizvode žive ćelije enzimskom konverzijom vitalne boje MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid), poznate i kao tiazolil plavo tetrazolijev bromid (3.). Dobijena vijabilnost ćelija uspoređuje se s kontrolom s rastvaračem (relativna vijabilnost) i upotrebljava za procjenu potencijala opasnosti ispitivane hemikalije za oko. Ispitivana hemikalija klasifikuje se u kategoriju 1. sistema UN GHS-a/CLP-a ako i koncentracija od 5 % i 0,05 % rezultiraju vijabilnošću ćelija od 70 % ili manjom (≤). Nasuprot tome, predviđa se da je hemikalija bez kategorije prema sistemu UN GHS/CLP-u ako i koncentracija od 5 % i 0,05 % rezultiraju vijabilnošću ćelija većom od (>) 70 %.

U ovoj se ispitnoj metodi izraz „ispitivana hemikalija" upotrebljava za označivanje onoga što se ispituje te se ne odnosi na primjenjivost ispitne metode STE za ispitivanje supstanci i/ili smjesa.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

Ova se ispitna metoda zasniva na protokolu koji je razvilo društvo Kao Corporation (4.) i koji je bio predmet dviju različitih validacijskih studija: jednu je sproveo Validacijski odbor JSAAE-a (Japansko društvo za alternative eksperimentima na životinjama) (5.), a drugu JaCVAM (Japanski centar za validaciju alternativnih metoda) (6.). Stručnu reviziju sproveo je NICEATM/ICCVAM na osnovu izvještaja validacijskih studija i osnovnih dokumenata za preispitivanje o ispitnoj metodi (7).

Kada su se upotrijebili za utvrđivanje hemikalija (supstanci i smješa) koje indukujeju teške ozljede oka (kategorija 1. prema sistemu UN GHS/CLP-u (1.), podaci dobijeni upotrebom ispitne metode STE na 125 hemikalija (koje uključuju i supstance i smješe) pokazali su ukupnu tačnost od 83 % (104/125), udio lažno pozitivnih rezultata od 1 % (1/86) i udio lažno negativnih rezultata od 51 % (20/39) u u poređenju s *in vivo* ispitivanjem na oku kunića (7.). Dobijeni udio lažno negativnih rezultata nije presudan u ovom kontekstu jer bi se sve ispitivane hemikalije koje indukujeju vijabilnost ćelija ≤ 70 % pri koncentraciji od 5 % i > 70 % pri koncentraciji od 0,05 % kasnije ispitale drugim primjereno validiranim *in vitro* ispitnim metodama ili, kao posljednja opcija, *in vivo* ispitivanjem na oku kunića, u zavisnosti o regulatornim zahtjevima i u skladu sa strategijom sekvencijskog ispitivanja i pristupima snage dokaza koji se sada preporučuju (1. i 8.). Uglavnom su ispitane supstance s jednim sastojkom, iako postoji ograničena količina podataka i o ispitivanju smjesa. Uprkos tome ova je ispitna metoda tehnički primjenjiva i za

ispitivanje supstance s više sastojaka i smjesa. Međutim, prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smješi radi dobijanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smješe. Kod ispitne metode STE nisu uočeni nikakvi drugi specifični nedostaci kada se upotrebljava za utvrđivanje ispitivanih hemikalija kao hemikalija iz kategorije 1. sistema UN GHS/CLP-a. Istraživači bi mogli razmotriti primjenu ove ispitne metode na ispitivanim hemikalijama, pri čemu bi vijabilnost ćelija ≤ 70 % pri koncentracijama od 5 % i 0,05 % trebalo prihvatiti kao pokazatelj odgovora da hemikalija indukuje tešku povredu oka i da bi je bez daljeg ispitivanja trebalo klasifikovati u kategoriju 1. sistema UN GHS/CLP-a.

Kada su se upotrijebili za utvrđivanje hemikalija (supstanci i smješa) koje nije potrebno klasifikovati u pogledu nadraživanja i teške ozljede oka (tj. bez kategorije prema sistemu UN GHS/CLP-u), podaci dobijeni upotrebom ispitne metode STE na 130 hemikalija (koje uključuju i supstance i smješe) pokazali su ukupnu tačnost od 85 % (110/130), udio lažno pozitivnih rezultata od 12 % (9/73) i udio lažno negativnih rezultata od 19 % (11/57) u u poređenju s *in vivo* ispitivanjem na oku kunića (7.). Ako se iz skupa podataka isključe vrlo isparljive supstance i čvrste supstance osim površinski aktivnih supstanci, ukupna tačnost poboljšava se na 90 % (92/102), udio lažno negativnih rezultata na 2 % (1/54), a udio lažno pozitivnih rezultata na 19 % (9/48) (7.). Kao posljedica, potencijalni nedostaci ispitne metode STE, kada se upotrebljava za utvrđivanje ispitivanih hemikalija za koje nije potrebno klasifikovanje u pogledu nadraživanja i teških ozljeda oka (bez kategorije prema sistemu UN GHS/CLP-u), uključuju visok udio lažno negativnih rezultata za: i. vrlo isparljivo supstance s naponom pare većim od 6 kPa i ii. hemikalije u čvrstom stanju (supstance i smješe) osim površinski aktivnih supstanci i smjesa koje se sastoje samo od površinski aktivnih supstanci. Te hemikalije isključene su iz područja primjene ispitne metode STE (7.).

Uz hemikalije, skup podataka dobijen ispitnom metodom STE sadrži i interne podatke o 40 smjesa, koji su nakon što ih se usporedilo s *in vivo* Draizeovim ispitivanjem na oku pokazali tačnost od 88 % (35/40), udio lažno pozitivnih rezultata od 50 % (5/10) i udio lažno negativnih rezultata od 0 % (0/30) u pogledu smjesa za koje nije potrebno klasifikovanje na osnovu sistema klasifikovanja UN GHS/CLP-a (9.). Ispitna metoda STE stoga se može primjenjivati za utvrđivanje smjesa bez kategorije prema sistemu UN GHS/CLP-u u pristupu odozdo prema gore, uz izuzeće smjesa u čvrstom stanju osim onih koje se sastoje samo od površinski aktivnih supstanci, kao proširenje njena ograničenja na supstance u čvrstom stanju. Nadalje, smješe koje sadržiju supstance s naponom pare većim od 6 kPa treba oprezno ocijeniti kako bi se izbjegla moguća preblaga predviđanja i treba ih ocijeniti na pojedinačnoj osnovi.

Ispitna metoda STE ne može se upotrebljavati za utvrđivanje ispitivanih hemikalija kao hemikalija iz kategorije 2. prema sistemu UN GHS/CLP-u ili kategorije 2.A (nadraživanje oka) ili 2.B (blago nadraživanje oka) prema sistemu UN GHS zbog znatnog broja hemikalija iz kategorije 1. prema GHS-u UN-a koje se preblago predviđaju kao hemikalije iz kategorije 2., 2.A ili 2.B te hemikalija bez kategorije prema sistemu UN GHS/CLP-u koje se prestrogo predviđaju kao hemikalije iz kategorije 2., 2.A ili 2.B (7.). U tu svrhu može biti potrebno dalje ispitivanje drugom prikladnom metodom.

Ispitna metoda STE primjerena je za ispitivane hemikalije koje se rastvaraju ili ravnodnosno suspendujeju najmanje pet minuta u fiziološkoj rastvorini, 5-postotnom dimetilsulfoksidu (DMSO) u fiziološkoj rastvorini ili u mineralnom ulju. Ispitna metoda STE nije primjerena za ispitivane hemikalije koje nisu rastvorive ili se ne mogu ravnodnosno suspendovati najmanje pet minuta u fiziološkoj rastvorini, 5-postotnom dimetilsulfoksidu (DMSO) u fiziološkoj rastvorini ili u mineralnom ulju. Upotreba mineralnog ulja u ispitnoj metodi STE moguća je zbog kratkotrajnog izlaganja. Stoga je ispitna metoda STE primjerena za predviđanje potencijala opasnosti ispitivanih hemikalija netopivih u vodi za oko (npr. dugolančani masni alkoholi ili ketoni) pod uslovom da se mogu miješati u najmanje jednom od tri prethodno predložena rastvarača.

U ovoj se ispitnoj metodi izraz „ispitivana hemikalija” upotrebljava za označivanje onoga što se ispituje te se ne odnosi na primjenjivost ispitne metode STE za ispitivanje supstanci i/ili smjesa.

NAČELO ISPITIVANJA

Ispitna metoda STE *in vitro* je test koji se zasniva na citotoksičnosti, a sprovodi se na konfluentnom monosloju ćelija rožnjače kunića Statens Serum Instituta (SIRC), koje se uzgajaju na polikarbonatnoj mikroploči s 96 udubljenja (4.). Nakon petominutnog izlaganja ispitivanoj hemikaliji citotoksičnost se kvantitativno mjeri kao relativna vijabilnost ćelija SIRC upotrebom MTT testa (4.). Smanjena vijabilnost ćelija upotrebljava se za predviđanje potencijalnih štetnih efekata koji dovode do oštećenja oka.
Navedeno je da se 80 % rastvora koja se nakapa u oko kunića izluči preko konjunktivalne vrećice u roku od tri do četiri minute, dok se više od 80 % rastvora koja se nakapa u ljudsko oko izluči u roku od jedne do dvije minute (10.). Ispitnom metodom STE pokušavaju se uskladiti ta vremena izlaganja te se citotoksičnost upotrebljava kao krajnja tačka za procjenu odnosa oštećenja ćelija SIRC nakon petominutnog izlaganja ispitivanoj hemikaliji.

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

Prije rutinske upotrebe ispitne metode STE opisane u ovoj ispitnoj metodi laboratoriji bi trebali dokazati tehničku osposobljenost tačnim utvrđivanjem kategorije jedanaest supstance koje su preporučene u tabeli 1. Te su supstance odabrane kako bi predstavljale cijeli raspon odgovora za ozbiljnu povredu oka ili nadraživanje oka na osnovu rezultata *in vivo* ispitivanja na oku kunića (Smjernica za ispitivanje 405) i sistema klasifikovanja UN GHS/CLP-a (1.). Među ostalim su kriterijumima za izbor: supstance bi trebale biti komercijalno dostupne, trebali bi biti dostupni visokokvalitetni *in vivo* referentni podaci i trebali bi biti dostupni visokokvalitetni *in vitro* podaci iz ispitne metode STE (3.). U slučajevima u kojima nije dostupna navedena supstancaili ako je to opravdano može se upotrijebiti druga supstanca za koju su dostupni primjereni referentni *in vivo* i *in vitro* podaci pod uslovom da se primjenjuju isti kriterijumi kao ovdje opisani kriterijumi.

Tabela 1. **Lista supstanci koje služe za dokazivanje osposobljenosti**

Supstanca	**CAS br.**	**Hemijski klasa**	**Agregatno stanje**	***In vivo* kat. sistema UN GHS ili CLP-a**	**Rastvarač u testu STE**	**STE kat. sistema UN GHS ili CLP-a**
Benzalkonijum hlorid (10 %, vodena RASTVORA)	8001-54-5	Onijev jedinjenje	Tečne	Kategorija 1.	Fiziološki rastvor	Kategorija 1.
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Eter	Tečne	Kategorija 1.	Fiziološki rastvor	Kategorija 1.
Kiselo crvena 92	18472-87-2	Heterociklično jedinjenje; jedinjenje	Kruto	Kategorija 1.	Fiziološki rastvor	Kategorija 1.

		broma; jedinjenje hlora				
Natrijum hidroksid	1310-73-2	Baza; neorganska hemikalija	Kruto	Kategorija 1.	Fiziološki rastvor	Kategorija 1.
Butirolakton	96-48-0	Lakton; heterociklično jedinjenje	Tečne	Kategorija 2.A (kategorija 2. prema CLP-u)	Fiziološki rastvor	Predviđanje nije moguće
1-oktanol	111-87-5	Alkohol	Tečne	Kategorija 2.A/B (kategorija 2. prema CLP-u)	Mineralno ulje	Predviđanje nije moguće
Ciklopentanol	96-41-3	Alkohol; ugljovodonik, ciklički	Tečne	Kategorija 2.A/B (kategorija 2. prema CLP-u)	Fiziološki rastvor	Predviđanje nije moguće
2-etoksietilacetat	111-15-9	Alkohol; eter	Tečne	Bez kategorije	Fiziološki rastvor	Bez kategorije
Dodekan	112-40-3	Ugljovodonik, aciklični	Tečne	Bez kategorije	Mineralno ulje	Bez kategorije
Metil-izobutil-keton	108-10-1	Keton	Tečne	Bez kategorije	Mineralno ulje	Bez kategorije
1,1-dimetilgvanidin sulfat	598-65-2	Amidin; jedinjenje sumpora	Kruto	Bez kategorije	Fiziološki rastvor	Bez kategorije
Skraćenice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o hemijskim supstancama						

POSTUPAK

Priprema staničnog monosloja

Za sprovođenje ispitne metode STE treba upotrebljavati SIRC, ćelijsku liniju rožnjače kunića. Preporučuje se da se ćelije SIRC nabave iz kompetentne banke ćelija kao što je American Type Culture Collection CCL60.

Ćelije SIRC uzgajaju se na 37 °C s 5 % CO_2 i u vlažnim atmosferskim uslovima u tikvici s

kulturom koja sadrži medij za uzgoj kulture koji se sastoji od Eagleova minimalnog esencijalnog medija (MEM) obogaćenog s 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS), 2 mM L-glutamina, 50–100 jedinica/ml penicilina i 50–100 µg/ml streptomicina. Ćelije koje su postale konfluentne u tikvici s kulturom treba izdvojiti upotrebom rastvora tripsin etilendiamintetraoctene kiseline, uz upotrebu pribora za struganje ćelija ili bez njega. Ćelije se razmnožavaju (npr. od dvije do tri pasaže) u tikvici s kulturom prije nego što se upotrijebe za rutinsko ispitivanje te se od odmrzavanja trebaju pasažirati najviše 25 puta.
Ćelije koje su spremne za upotrebu u testu STE zatim se pripremaju u odgovarajućoj gustine te se nasađuju u ploče s 96 udubljenja. Preporučuje se gustina nasađivanja ćelija od $6,0 \times 10^3$ ćelija po jažici ako se ćelije upotrebljavaju četiri dana nakon nasađivanja ili $3,0 \times 10^3$ ćelija po jažici ako se ćelije upotrebljavaju pet dana nakon nasađivanja, pri volumenu kulture od 200 µl. Ćelije koje se upotrebljavaju za test STE i koje se nasade u medij za uzgoj kulture pri odgovarajućoj gustine dosegnut će konfluenciju od više od 80 % u vrijeme ispitivanja, tj. četiri ili pet dana nakon nasađivanja.

Primjena ispitivanih hemikalija i kontrolnih supstanci

Fiziološki rastvor prvi je izbor za rastvarač za rastvaranje ili suspendujenje ispitivanih hemikalija. Ako ispitivana hemikalija pokazuje slabu rastvorljivost ili se u najmanje pet minuta ne može ravnodnosno rastvoriti ili suspendovati u fiziološkoj rastvorini, kao drugi izbor za rastvarač upotrebljava se 5-postotni DMSO (CAS br. 67-68-5) u fiziološkoj rastvorini. Kod ispitivanih hemikalija koje se u najmanje pet minuta ne mogu ravnodnosno rastvoriti ili suspendovati u fiziološkoj rastvorini ili 5-postotnom DMSO-u u fiziološkoj rastvorini, kao treći izbor za rastvarač upotrebljava se mineralno ulje (CAS br. 8042-47-5) u fiziološkoj rastvorini.
Ispitivane hemikalije ravnodnosno se rastvaraju ili suspendujeju u odabranom rastvraču pri koncentraciji od 5 % (w/w) i dodatno razrjeđuju serijskim deseterostrukim razrjeđivanjem do koncentracije od 0,5 % i 0,05 %. Svaka se hemikalija mora ispitati i pri koncentraciji od 5 % i 0,05 %. Ćelije koje se uzgajaju na ploči s 96 udubljenja izlažu se dozi od 200 µl/udubljenja rastvora (ili suspenzije) ispitivane hemikalije u koncentraciji od 5 % ili 0,05 % na pet minuta na sobnoj temperaturi. Ispitivane hemikalije (supstance s jednim sastojkom ili supstance s više sastojaka ili smješe) smatraju se čistim supstancama i razrjeđuju se ili suspendujeju u skladu s metodom, neu zavisnosti o njihovoj čistoći.
Medij za uzgoj kulture upotrebljava se kao kontrola s medijem na svakoj ploči svakog ponavljanja. Nadalje, ćelije se izlažu i uzorcima kontrole s rastvaračem na svakoj ploči svakog ponavljanja. Za rastvarač potvrđeno je da ne utiču štetno na vijabilnost ćelija SIRC.
Kod ispitne metode STE kao pozitivna kontrola na svakoj ploči svakog ponavljanja upotrebljava se 0,01-postotni natrijum lauril sulfat (SLS) u fiziološkoj rastvorini. Kako bi se izračunala vijabilnost ćelija pozitivne kontrole, svaka ploča svakog ponavljanja mora uključivati i fiziološku rastvor kao kontrolu s rastvaračem.
Slijepa proba potrebna je kako bi se utvrdila kompenzacija za optičku gustinu i treba je sprovesti u porculanskim tanjirima sa udubljenjima koje sadržiju samo fiziološku rastvor puferiranu fosfatnim puferom, ali ne kalcij i magnezij (PBS-) ni ćelije.
Svaki uzorak (ispitivana hemikalija pri koncentraciji od 5 % i 0,05 %, kontrola s medijem, kontrola s rastvaračem i pozitivna kontrola) treba ispitati triput za svako ponavljanje izlaganjem ćelija dozi od 200 µl odgovarajuće ispitivane ili kontrolne hemikalije na pet minuta na sobnoj temperaturi.
Referentne supstance korisne su za ocjenjivanje potencijala za nadražujuće djelovanje na oči nepoznatih hemikalija iz specifičnog hemijskog klasaa ili klasaa proizvoda ili za ocjenjivanje relativnog potencijala za nadražujuće djelovanje supstancu koja nadražuje oči unutar specifičnog raspona odgovora na nadražujuću supstance.

Mjerenje vijabilnosti ćelija

Ćelije se nakon izlaganja ispiru s 200 µl PBS-a i dodaje im se 200 µl rastvora MTT-a (0,5 mg MTT/ml medija za uzgoj kulture). Nakon dvosatnog vremena reakcije u inkubatoru (37 °C, 5 % CO_2), RASTVORA MTT-a pretače se, MTT formazan ekstrahira se tako da se doda 200 µl 0,04 N hlorovodične kiseline i izopropanola tokom 60 minuta u mraku na sobnoj temperaturi te se apsorbancija rastvora MTT formazana mjeri pri 570 nm upotrebom čitača ploča. Ispitivane hemikalije utiču na MTT test (bojilima ili supstancama koje neposredno redukuju MTT) samo ako se u ispitnom sistemu zadržava znatna količina ispitivane hemikalije nakon ispiranja koje se obavlja nakon izlaganja, a to je slučaj kod 3D tkiva rekonstruirane ljudske rožnjače ili rekonstruirane ljudske epiderme, ali nije relevantno za 2D ćelijske kulture koje se upotrebljavaju za ispitnu metodu STE.

Tumačenje rezultata i model predviđanja

Vrijednosti optičke gustine (OD) za svaku ispitivanu hemikaliju zatim se upotrebljavaju za izračun vijabilnosti ćelija u odnosu na kontrolu s rastvaračem, koja je određena kao 100 %. Relativna vijabilnost ćelija izražava se kao postotak i dobija se tako da se optička gustina ispitivane hemikalije podijeli optičkom gustinom kontrole s rastvaračem nakon što se od obiju vrijednosti oduzme optička gustina slijepe probe.

$$varijab.ćelija\ (\%) = \frac{OD570\ ispit.hemikalije\ -\ OD570\ slijepe\ probe}{OD570\ kontr\ s\ rastvaračem\ -\ OD570\ slijepe\ probe}$$

Slično tome, relativna vijabilnost ćelija kod svake kontrole s rastvaračem izražava se kao postotak i dobija se tako da se optička gustina svake kontrole s rastvaračem podijeli optičkom gustinom kontrole s medijem nakon što se od obiju vrijednosti oduzme optička gustina slijepe probe.

Treba sprovesti tri nezavisna ponavljanja s po tri posude sa udubljenjima s ponavljanjem (tj. n = 9). Aritmetička sredina triju udubljenja za svaku ispitivanu hemikaliju i kontrolu s rastvaračem u svakom neu zavisnostim ponavljanju upotrebljava se za izračun aritmetičke sredine relativne vijabilnosti ćelija. Konačna aritmetička sredina vijabilnosti ćelija računa se iz tri nezavisna ponavljanja.

Granične vrijednosti vijabilnosti ćelija za utvrđivanje ispitivanih hemikalija koje indukujeju tešku povredu oka (kategorija 1. sistema UN GHS/CLP-a) i ispitivanih hemikalija koje nije potrebno klasifikovati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku povredu oka (bez kategorije prema sistemu UN GHS/CLP-u) navedene su u nastavku.

Tabela 2. **Model predviđanja ispitne metode STE**

Vijabilnost ćelija		**Klasifikovanje prema sistemu GHS UN-a ili CLP-u**	**Primjenjivost**
Pri 5 %	**Pri 0,05 %**		
> 70 %	> 70 %	Bez kategorije	Supstance i smješe uz izuzeće: i. vrlo isparljivih supstance s naponom pare većim od 6 kPa ([74]); i ii. hemikalija u čvrstom stanju (supstance i smješe) osim površinski aktivnih supstanci i smjesa koje se sastoje samo od

			površinski aktivnih supstanci
≤ 70 %	> 70 %	Predviđanje nije moguće	Nije primjenjivo
≤ 70 %	≤ 70 %	Kategorija 1.	Supstance i smješe ([75])

Kriterijumi prihvatljivosti

Rezultati ispitivanja ocjenjuju se kao prihvatljivi ako su ispunjeni svi sljedeći kriterijumi:

a)optička gustina kontrole s medijem (izložene medijumu za uzgoj kulture) treba biti 0,3 ili veća nakon što se oduzme optička gustina slijepe probe;

b)vijabilnost kontrole s rastvaračem treba biti 80 % ili veća u odnosu na kontrolu s medijem. Ako se u svakom ponavljanju upotrebljava više kontrola s rastvaračem, svaka kontrola treba pokazivati vijabilnost ćelija veću od 80 % kako bi se razvrstale ispitivane hemikalije koje se ispituju tim rastvaračima;

c)vijabilnost ćelija koja se dobije s pozitivnom kontrolom (0,01 % SLS) treba biti u okviru dvije standardne devijacije prošle srednje vrijednosti. Gornju i donju granicu prihvatljivosti za pozitivnu kontrolu treba često ažurirati, tj. svaka tri mjeseca ili svaki put kada se sprovodi prihvatljivi test u laboratorijima u kojima se testovi ne provode često (tj. rjeđe od jednom mjesečno). Ako laboratorij ne provede dovoljan broj eksperimenta kako bi se utvrdila statistički pouzdana distribucija pozitivnih kontrola, prihvatljiva je upotreba gornje i donje granice prihvatljivosti koju je utvrdio subjekt koji je razvio metodu, tj. od 21,1 % do 62,3 % prema prošlim podacima laboratorija, dok se interna distribucija izrađuje tokom prvih rutinskih testova;

d)standardna devijacija konačne vijabilnosti ćelija koja se dobije iz tri nezavisna ponavljanja treba biti manja od 15 % i kod koncentracije od 5 % i od 0,05 % ispitivane hemikalije.

Ako nije ispunjen jedan ili više od tih kriterijuma, rezultate treba odbaciti i treba sprovesti još tri nezavisna ponavljanja.

PODACI I IZVJEŠTAVANJE

Podaci

Treba navesti podatke za svaku pojedinačnu kadicu (npr. vrijednosti vijabilnosti ćelija) svakog ponavljanja te ukupnu srednju vrijednost, standardnu devijaciju i klasifikovanje.

Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju trebalo bi da sadrži sljedeće informacije:

Ispitivana hemikalija i kontrolne supstance

—supstanca s jednim sastojkom: hemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS registracijski broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

—supstanca s više sastojaka, UVCB supstanca i smješa: opisane koliko god je to moguće npr. hemijskim identitetom (vidjeti gore), čistoćom, količinskom zastupljenošću i relevantnim

fizičko-hemijskim svojstvima sastojaka (vidjeti gore), u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

—agregatno stanje, isparljivost, pH-vrijednost, LogP, molekularna masa, hemijski klasa i dodatna relevantna fizičko-hemijska svojstva relevantna za primjenu studije, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.,

— obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

— uslovi skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni.

Uslovi i postupci ispitne metode

— naziv i adresa naručitelja, ustanove koja sprovodi ispitivanje i voditelja istraživanja,

— opis upotrijebljene ispitne metode,

—upotrijebljena ćelijska linija, njen izvor, broj pasaže i konfluencija ćelija koje se koriste za ispitivanje,

— pojedinosti o primijenjenom ispitnom postupku,

— broj primijenjenih ponavljanja i ponovljenih uzoraka,

— koncentracije ispitivane hemikalije (ako je drukčije od preporučenog),

— obrazloženje za izbor rastvarača za svaku ispitivanu hemikaliju,

— trajanje izlaganja ispitivanoj hemikaliji (ako je drukčije od preporučenog),

— opis svih izmjena ispitnog postupka,

— opis primijenjenih kriterijuma ocjenjivanja i odlučivanja,

—upućivanje na prijašnju srednju vrijednost pozitivne kontrole i standardno odstepene,

—dokazivanje osposobljenosti laboratorija za izvođenje ispitne metode (npr. ispitivanjem supstance koje služe za dokazivanje osposobljenosti) ili dokazivanje obnovljive primjene ispitne metode tokom vremena.

Rezultati

—za svaku ispitivanu hemikaliju i kontrolnu supstancu te svaku ispitanu koncentraciju treba navesti tablični prikaz za pojedinačne vrijednosti optičke gustine po jažici ponovljenog uzorka, aritmetičke srednje vrijednosti optičke gustine za svako neu zavisnosti ponavljanje, postotak vijabilnosti ćelija za svako neu zavisnosti ponavljanje i konačnu aritmetičku sredinu postotka vijabilnosti ćelija i standardnu devijaciju u tri ponavljanja,

—rezultati za kontrolu s medijem, kontrolu s rastvaračem i pozitivnu kontrolu kojima se dokazuju odgovarajući kriterijumi prihvatljivosti istraživanja,

— opis drugih uočenih efekata,

—ukupno utvrđeno klasifikovanje, s upućivanjem na primijenjeni model predviđanja/kriterijume odlučivanja.

Rasprava o rezultatima

Zaključci

B.69. ISPITNA METODA REKONSTRUIRANOG EPITELA KOJI NALIKUJE LJUDSKOJ ROŽNICI (RhCE) ZA UTVRĐIVANJE HEMIKALIJA KOJE NIJE POTREBNO KLASIFIKOVATI I OZNAČITI S OBZIROM NA NADRAŽIVANJE OKA ILI TEŠKU POVREDU OKA

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 492 (2017.). *Teška ozljeda oka* odnosi se na izazivanje oštećenja tkiva oka ili ozbiljno fizičko pogoršanje vida nakon primjene ispitivane hemikalije na prednju površinu oka, a koje nije potpunosti reverzibilno unutar 21 dana od primjene, kako je utvrđeno Globalno usklađenim sistemom klasifikovanja i označivanja hemikalija Ujedinjenih naroda (UN GHS) (1.) i Uredbom (EZ) br. 1272/2008 o klasifikovanju, označavanju i pakovanju supstanci i smješa. Prema sistemu UN GHS i CLP-u *nadraživanje oka* odnosi se na izazivanje promjena u oku nakon primjene ispitivane hemikalije na prednju površinu oka, koje su u potpunosti reverzibilne unutar 21 dana nakon primjene. Ispitivane hemikalije koje indukujeju tešku povredu oka klasifikovane su u kategoriju 1. sistema UN GHS i CLP-a, dok su hemikalije koje indukujeju nadraživanje oka klasifikovane u kategoriju 2. sistema UN GHS i CLP-a. Ispitivane hemikalije koje su neklasifikovane s obzirom na nadraživanje oka ili tešku povredu oka definisane su kao one koje ne ispunjavaju zahtjeve za klasifikovanje u kategoriju 1. ili 2. (2.A ili 2.B) sistema UN GHS i CLP-a, odnosno one se navode kao hemikalije bez kategorije prema sistemu UN GHS i CLP-u.

Procjena teške ozljede oka/nadraživanja oka obično je uključivala upotrebu laboratorijskih životinja (ispitna metoda B.5. (2.)). Izbor najprimjerenije ispitne metode i upotrebu te ispitne metode treba razmotriti u kontekstu Smjernica OECD-a o integrisanim pristupima ispitivanju i procjeni za teške ozljede oka i nadraživanje oka.

U ovoj ispitnoj metodi opisuje se *in vitro* postupak koji omogućuje utvrđivanje hemikalija (supstanci i smješa) koje nije potrebno klasifikovati i označiti s obzirom na nadraživanje oka ili tešku povredu oka u skladu sa sistemom UN GHS i CLP-om. U njoj se upotrebljava rekonstruirani epitel koji nalikuje ljudskoj rožnici (RhCE) i koji vjerno oponaša histološka, morfološka, biohemijska i fiziološka svojstva epitela ljudske rožnjače. Validirane su još četiri *in vitro* ispitne metode koje se smatraju naučno valjanima te su donesene kao ispitne metode B.47. (3.), B.48. (4.), B.61. (5.) i B.68. (6.), a bave se krajnjom tačkom teške ozljede oka/nadraživanja oka na zdravlje ljudi.

Ova ispitna metoda obuhvata dva validirana testa u kojima se upotrebljavaju komercijalno dostupni modeli RhCE-a. Validacione studije za procjenu nadraživanja oka/teške ozljede oka provedene su upotrebom testa nadraživanja oka (EIT) EpiOcular™ (EIT) i testa nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnjače (HCE) SkinEthic™. U svakom od tih testova kao ispitni sistem upotrebljavaju se komercijalno dostupni modeli tkiva RhCE, koje se dalje u tekstu navode kao validirane referentne metode VRM1 i VRM2. Iz tih validacijskih studija i njihovih nezavisnih stručnih pregleda donesen je zaključak da se testom nadraživanja oka EpiOcular™ i testom nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnjače SkinEthic™ mogu tačno utvrditi hemikalije (i supstance i smješe) koje nije potrebno klasifikovati i označiti s obzirom na nadraživanje oka ili tešku povredu oka u skladu sa sistemom UN GHS te su testovi preporučeni kao naučno valjani za tu svrhu (13.).

Trenutno je opšte prihvaćena činjenica da se u doglednoj budućnosti *in vivo* Draizeovo ispitivanje na oku kunića neće moći potpuno zamijeniti nijednom pojedinačnom *in vitro* ispitnom metodom za predviđanje različitih hemijskih klasaa u punom rasponu teških ozljeda oka/nadraživanja oka. Međutim, kao potpuna zamjena za Draizeovo ispitivanje na oku mogu se

primjenjivati strateške kombinacije nekoliko alternativnih ispitnih metoda u okviru strategija (višerazinskog) ispitivanja, kao što je pristup odozdo prema gore/odozgo prema dolje. Pristup odozdo prema gore trebalo bi primijeniti kada se na osnovu postojećih informacija očekuje da hemikalija neće izazvati znatno nadraživanje oka koje bi zahtijevalo klasifikovanje, dok bi pristup odozgo prema dolje trebalo primijeniti kada se na osnovu postojećih informacija očekuje da će hemikalija izazvati tešku povredu oka. Test nadraživanja oka EpiOcular™ i test nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnjače SkinEthic™ preporučuju se za utvrđivanje hemikalija za koje nije potrebno klasifikovanje u pogledu nadraživanja ili teške ozljede oka u skladu sa sistemom UN GHS/CLP-om (bez kategorije) bez daljeg ispitivanja, u okviru strategije ispitivanja kao što je pristup odozdo prema gore/odozgo prema dolje koju su predložili Scott i dr., npr. kao početni korak u pristupu odozdo prema gore ili kao jedan od posljednjih koraka u pristupu odozgo prema dolje (15.). Međutim, test nadraživanja oka EpiOcular™ i test nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnjače SkinEthic™ nisu namijenjeni za razlikovanje kategorije 1. sistema UN GHS/CLP-a (teška ozljeda oka) od kategorije 2. tog sistema (nadraživanje oka). Ta razlika morat će se utvrditi na drugoj nivou strategije ispitivanja. Ispitivanu hemikaliju za koju se testom nadraživanja oka EpiOcular™ ili testom nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnjače SkinEthic™ utvrdi da ju je potrebno klasifikovati u pogledu nadraživanja oka/teške ozljede oka stoga će trebati dodatno ispitati (*in vitro* i/ili *in vivo*) kako bi se došlo do konačnog zaključka (bez kategorije, kategorija 2. ili kategorija 1. prema sistemu UN GHS/CLP-u), npr. upotrebom ispitne metode B.47., B.48., B.61. ili B.68.

Svrha je ove ispitne metode opisati postupak koji se primjenjuje za ocjenjivanje potencijala opasnosti ispitivane hemikalije za oko na osnovu njene sposobnosti indukovanja citotoksičnosti u modelu tkiva RhCE, kako se izmjeri MTT testom. Vijabilnost tkiva RhCE nakon izlaganja ispitivanoj hemikaliji utvrđuje se u u poređenju s tkivima koja se tretiraju s supstance za negativnu kontrolu (postotak vijabilnosti) i zatim se upotrebljava za predviđanje potencijala opasnosti ispitivane hemikalije za oko.

Za lakšu validaciju novih ili izmijenjenih *in vitro* testova koji se baziraju na RhCE-u i koji su slični testu nadraživanja oka EpiOcular™ i testu nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnjače SkinEthic™ dostupni su zahtjevi izvođenja, u skladu s načelima Smjernice OECD-a br. 34 te oni omogućuju pravovremenu izmjenu Smjernice OECD-a za ispitivanje 492 radi uključivanja tih načela. Uzajamno prihvatanje podataka na osnovu sporazuma OECD-a jamči se samo za testove koji su validirani u skladu sa zahtjevima izvođenja ako je OECD pregledao te testove i uključio ih u odgovarajuću smjernicu OECD-a za ispitivanje.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

Ova ispitna metoda zasniva se na komercijalnim trodimenzionalnim modelima tkiva RhCE koji se proizvode upotrebom primarnih ljudskih epidermalnih keratinocita (tj. EpiOcular™ OCL-200) ili ljudskih imortaliziranih epitelnih ćelija rožnjače (tj. SkinEthic™ HCE/S). Modeli tkiva RhCE EpiOcular™ OCL-200 i SkinEthic™ HCE/S slični su *in vivo* trodimenzionalnoj strukturi epitela rožnjače i proizvode se upotrebom ćelija vrste koja se proučava (19. i 20.). Nadalje, testovima se direktno mjeri citotoksičnost koja je rezultat prolaska hemikalije kroz rožnicu i izazivanja oštećenja ćelija i tkiva; citotoksični odgovor zatim određuje ukupni ishod *in vivo* teške ozljede oka/nadraženosti oka. Do oštećenja ćelija može doći preko nekoliko načina djelovanja, ali citotoksičnost ima važnu, a možda i primarnu, mehanicističku ulogu u određivanju ukupnog odgovora na hemikaliju u obliku teške ozljede oka/nadraživanja oka, koja se *in vivo* uglavnom očituje u pojavi zamućenja rožnjače, iritisa, crvenila konjunktive i/ili kemoze konjunktive, neu zavisnosti o fizičko-hemijskim procesima na kojima se zasniva oštećenje tkiva.

U validacionoj studiji na kojoj se zasniva ova ispitna metoda ispitan je širok raspon hemikalija, koje obuhvataju vrlo različite vrste hemikalija, hemijske klase, molekularne mase, vrijednosti LogP, hemijske strukture itd. Validaciona baza podataka za test nadraživanja oka EpiOcular™

sadržila je ukupno 113 hemikalija, koje su obuhvatale 95 različitih organskih funkcionalnih grupa u skladu s analizom OECD-ova alata QSAR. Većinu tih hemikalija činile su supstance s jednim sastojkom, ali u studiju je uključeno i nekoliko supstance s više sastojaka (uključujući tri homopolimera, pet kopolimera i deset kvazipolimera). Kad je riječ o agregatnom stanju i kategorijama sistema UN GHS/CLP-a, 113 ispitanih hemikalija distribuirano je na sljedeći način: 13 tečnosti iz kategorije 1., 15 hemikalija u čvrstom stanju iz kategorije 1., šest tečnosti iz kategorije 2.A, deset hemikalija u čvrstom stanju iz kategorije 2.A, sedam tečnosti iz kategorije 2.B, sedam hemikalija u čvrstom stanju iz kategorije 2.B, 27 tečnosti bez kategorije i 28 hemikalija u čvrstom stanju bez kategorije. Validaciona baza podataka za test nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnjače SkinEthic™ sadržila je ukupno 200 hemikalija, koje su obuhvatale 165 različitih organskih funkcionalnih grupa (8., 10. i 11.). Većinu tih hemikalija činile su supstance s jednim sastojkom, ali u studiju je uključeno i nekoliko supstance s više sastojaka (uključujući deset polimera). Kad je riječ o agregatnom stanju i kategorijama sistema UN GHS/CLP-a, 200 ispitanih hemikalija distribuirano je na sljedeći način: 27 tečnosti iz kategorije 1., 24 hemikalije u čvrstom stanju iz kategorije 1., 19 tečnosti iz kategorije 2.A, deset hemikalija u čvrstom stanju iz kategorije 2.A, devet tečnosti iz kategorije 2.B, osam hemikalija u čvrstom stanju iz kategorije 2.B, 50 tečnosti bez kategorije i 53 hemikalije u čvrstom stanju bez kategorije (10. i 11.).

Ova je ispitna metoda primjenjiva na supstance i smješe te na hemikalije u čvrstom stanju, tečnosti, polučvrste hemikalije i voskove. Tečnosti mogu biti vodene i bezvodne; čvrste supstance mogu biti rastvorive ili nerastvorive u vodi. Čvrste supstance prije primjene treba samljeti u sitni prah kad god je to moguće; nije potrebna nikakva druga prethodna obrada uzorka. Plinovi i aerosoli nisu ocijenjeni u validacionoj studiji. Iako je moguće da se oni mogu ispitati upotrebom tehnologije RhCE, trenutnom ispitnom metodom nije omogućeno ispitivanje plinova i aerosola.

Ispitivane hemikalije koje apsorbiraju svjetlost u istom rasponu kao i MTT formazan (prirodno ili nakon tretiranja) i ispitivane hemikalije koje mogu direktno redukujeti vitalnu boju MTT (na MTT formazan) mogu uticati na mjerenje vijabilnosti tkiva te se kod njih trebaju upotrebljavati prilagođene kontrole za ispravke. Vrsta prilagođenih kontrola koja može biti potrebna mijenjat će se u zavisnosti o vrsti interferencije koju proizvodi ispitivana hemikalija i postupku koji se upotrebljava za kvantificiranje MTT formazana.

Rezultati dobijeni u predvalidacionoj i cjelokupnoj validacionoj studiji pokazali su da se i test nadraživanja oka EpiOcular™ i test nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnjače SkinEthic™ mogu prenijeti u laboratorije koji još nikada nisu sprovodili te testove te da su obnovljivi unutar jedne laboratorije i između više laboratorija. Na osnovu tih studija nivoa obnovljivosti u smislu usklađenosti predviđanja koja se može očekivati iz testa nadraživanja oka EpiOcular™ na osnovu podataka o 113 hemikalija iznosi približno 95 % unutar laboratorija i 93 % između više laboratorija. Nivoa obnovljivosti u smislu usklađenosti predviđanja koja se može očekivati iz testa nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnjače SkinEthic™ na osnovu podataka o 120 hemikalija iznosi približno 92 % unutar laboratorija i 95 % između više laboratorija.

Test nadraživanja oka EpiOcular™ može se primjenjivati za utvrđivanje hemikalija koje nije potrebno klasifikovati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku povredu oka u skladu sa sistemom klasifikovanja UN GHS i CLP-om. Uzimajući u obzir podatke dobijene u validacionoj studiji (8.), test nadraživanja oka EpiOcular™ ima ukupnu tačnost od 80 % (na osnovu 112 hemikalija), osjetljivost od 96 % (na osnovu 57 hemikalija), udio lažno negativnih rezultata od 4 % (na osnovu 57 hemikalija), specifičnost od 63 % (na osnovu 55 hemikalija) i udio lažno pozitivnih rezultata od 37 % (na osnovu 55 hemikalija), u u poređenju s referentnim podacima *in vivo* ispitivanja na oku kunića (ispitna metoda B.5.) (2. i 14.), klasifikovano u skladu sa sistemom klasifikovanja UN GHS i CLP-om. Studija u kojoj je 97 tekućih agrohemijskih formulacija ispitano testom nadraživanja oka EpiOcular™ pokazala je sličnu uspješnost ispitne metode za tu vrstu smjesa kao što je ona dobijena u validacionoj studiji (23.). Tih je 97

formulacija distribuirano na sljedeći način: 21 hemikalija iz kategorije 1., 19 hemikalija iz kategorije 2.A, 14 hemikalija iz kategorije 2.B i 43 hemikalije bez kategorije, klasifikovano u skladu sa sistemom klasifikovanja UN GHS na osnovu referentnih podataka *in vivo* ispitivanja na oku kunića (ispitna metoda B.5.) (2. i 14.). Dobijena je ukupna tačnost od 82 % (na osnovu 97 formulacija), osjetljivost od 91 % (na osnovu 54 formulacije), udio lažno negativnih rezultata od 9 % (na osnovu 54 formulacije), specifičnost od 72 % (na osnovu 43 formulacije) i udio lažno pozitivnih rezultata od 28 % (na osnovu 43 formulacije) (23.).
Test nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnjače SkinEthic™ može se primjenjivati za utvrđivanje hemikalija koje nije potrebno klasifikovati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku povredu oka u skladu sa sistemom klasifikovanja UN GHS i CLP-om. Uzimajući u obzir podatke dobijene u validacionoj studiji (10. i 11.), test nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnjače SkinEthic™ ima ukupnu tačnost od 84 % (na osnovu 200 hemikalija), osjetljivost od 95 % (na osnovu 97 hemikalija), udio lažno negativnih rezultata od 5 % (na osnovu 97 hemikalija), specifičnost od 72 % (na osnovu 103 hemikalije) i udio lažno pozitivnih rezultata od 28 % (na osnovu 103 hemikalije), u u poređenju s referentnim podacima *in vivo* ispitivanja na oku kunića (ispitna metoda B.5.) (2. i 14.), klasifikovano u skladu sa sistemom klasifikovanja UN GHS i CLP-om.
Udjeli lažno negativnih rezultata dobijeni u oba testa RhCE, s supstancama ili smjesama, ulaze u 12-postotnu ukupnu vjerovatnost da se hemikalije u *in vivo* Draizeovu ispitivanju na oku u ponovljenim testovima utvrde kao hemikalije iz kategorije 2. ili bez kategorije u skladu sa sistemom UN GHS ili CLP-om; uzrok je tomu inherentna varijabilnost unutar testa u toj metodi (24.). Stope lažno negativnih rezultata dobijene u obje ispitne metode RhCE s supstancama ili smjesama nisu presudne u kontekstu ove ispitne metode jer je sve ispitivane hemikalije kod kojih je vijabilnost tkiva jednaka utvrđenim graničnim vrijednostima ili manja od njih potrebno dodatno ispitati drugim *in vitro* ispitnim metodama ili, kao posljednja opcija kod kunića, u zavisnosti o regulatornim zahtjevima, upotrebom strategije sekvencijskog ispitivanja u analizi snage dokaza. Ove se ispitne metode mogu primjenjivati za sve vrste hemikalija, pri čemu negativni rezultat treba biti prihvatljiv za neklasifikovanje hemikalije s obzirom na nadraživanje oka i tešku povredu oka (bez kategorije prema sistemu UN GHS i CLP-u). Prije primjene testa nadraživanja oka EpiOcular™ i testa nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnjače SkinEthic™ u skladu s drugim shemama klasifikovanja osim sistema UN GHS/CLP-a trebalo bi se savjetovati s odgovarajućim regulatornim tijelima.
Ograničenje je ove ispitne metode to što ne omogućuje razlikovanje nadraživanja oka/reverzibilnih efekata na oko (kategorija 2.) od teške ozljede oka/ireverzibilnih efekata na oko (kategorija 1.), kako je utvrđeno sistemom UN GHS i CLP-om, niti razlikovanje hemikalija nadražujućih za oči (neobvezna kategorija 2.A) od hemikalija blago nadražujućih za oči (neobavezna kategorija 2.B), kako je utvrđeno sistemom UN GHS (1.). U te je svrhe potrebno dalje ispitivanje drugim *in vitro* ispitnim metodama.
U ovoj se ispitnoj metodi izraz „ispitivana hemikalija" upotrebljava za označivanje onoga što se ispituje te se ne odnosi na primjenjivost ispitne metode RhCE za ispitivanje supstanci i/ili smjesa.

NAČELO ISPITIVANJA

Ispitivana hemikalija lokalno se nanosi na najmanje dva trodimenzionalna modela tkiva RhCE, a vijabilnost tkiva mjeri se nakon izlaganja i perioda inkubacije nakon tretiranja. Tkiva RhCE rekonstruiraju se iz primarnih ljudskih epidermalnih keratinocita ili ljudskih imortaliziranih epitelnih ćelija rožnjače, koje su uzgajane nekoliko dana kako bi tvorile stratificirani, visoko izdiferencirani ljuskavi epitel koji je morfološki sličan onom koji se nalazi u ljudskoj rožnici. Model tkiva EpiOcular™ RhCE sastoji se od najmanje tri vijabilna sloja ćelija i nekeratinizirane površine, koji imaju strukturu koja nalikuje rožnici i analogna je strukturi *in vivo*. Model tkiva

SkinEthic™ HCE RhCE sastoji se od najmanje četiri vijabilna sloja ćelija, uključujući stupičaste bazalne ćelije, prijelazne krilate ćelije i površinske ljuskave ćelije koje su slične uobičajenom epitelu ljudske rožnjače.
Hemijski indukujena teška ozljeda oka/nadraživanje oka, koji se *in vivo* uglavnom očituju kao zamućenje rožnjače, iritis, crvenilo konjunktive i/ili kemoza konjunktive, rezultat je niza događaja koji započinju prodiranjem hemikalije kroz rožnicu i/ili konjunktivu i oštećenjem ćelija. Do oštećenja ćelija može doći preko nekoliko načina djelovanja, uključujući: liziranje ćelijske membrane (npr. površinski aktivnim supstancama, organskim rastvaračima); koagulaciju makromolekula (naročito proteina) (npr. površinski aktivnim supstancama, organskim rastvaračima, bazama i kiselinama); saponifikaciju lipida (npr. bazama); i alkilaciju ili druge kovalentne interakcije s makromolekulama (npr. izbjeljivačima, peroksidima i alkilatorima) (15., 27. i 28.). Međutim, pokazalo se da citotoksičnost ima važnu, a možda i primarnu, mehanicističku ulogu u određivanju ukupnog odgovora na hemikaliju u obliku teške ozljede oka/nadraživanja oka, neu zavisnosti o fizičko-hemijskim procesima na kojima se zasniva oštećenje tkiva (29. i 30.). Nadalje, potencijal hemikalije da izazove tešku povredu oka/nadraživanje oka prvenstveno je određen odnosom početne ozljede (31.), koji je u korelaciji s odnosom smrti ćelija (29.) i s odnosom naknadnih odgovora i konačnih ishoda (32.). Stoga slabo nadražujuće hemikalije obično utiču samo na površinski epitel rožnjače, blago i umjereno nadražujuće hemikalije uglavnom oštećuju epitel i površinsku stromu, a jako nadražujuće hemikalije oštećuju epitel, dubinsku stromu, a ponekad i endotel rožnjače (30. i 33.). Mjerenje vijabilnosti modela tkiva RhCE nakon lokalnog izlaganja ispitivanoj hemikaliji radi utvrđivanja hemikalija koje nije potrebno klasifikovati s obzirom na tešku povredu oka/nadraživanje oka (bez kategorije prema sistemu UN GHS i CLP-u) zasniva se na pretpostavci da će sve hemikalije koje indukujeju tešku povredu oka ili nadraživanje oka indukovati citotoksičnost u epitelu rožnjače i/ili konjunktivi.
Vijabilnost tkiva u modelima RhCE obično se mjeri enzimskom konverzijom vitalne boje MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol bromid; tiazolil plavo tetrazolijev bromid; CAS broj 298-93-1], koju vrše vijabilne ćelije tkiva, u sol plavog MTT formazana koja se kvantitativno mjeri nakon ekstrakcije iz tkiva (16.). Hemikalije koje ne treba klasifikovati i označiti u skladu sa sistemom UN GHS/CLP-om (bez kategorije) utvrđene su kao hemikalije koje ne smanjuju vijabilnost tkiva ispod utvrđenog praga (tj. vijabilnost tkiva > 60 % u testu EIT EpiOcular™ i testu EITL s HCE-om SkinEthic™ ili > 50 % u testu EITS s HCE-om SkinEthic™).

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

Prije rutinske upotrebe testova RhCE u regulatorne svrhe laboratoriji trebaju dokazati tehničku osposobljenost tako da tačno predvide 15 hemikalija koje služe za dokazivanje osposobljenosti navedenih u tabeli 1. Te su hemikalije odabrane među hemikalijama upotrijebljenima u validacijskim studijama validiranih referentnih metoda (8., 10. i 11.). Izbor uključuje, u mjeri u kojoj je to moguće, hemikalije: i. koje obuhvataju različita agregatna stanja; ii. koje obuhvataju puni raspon odgovora u obliku *in vivo* teške ozljede oka/nadraživanja oka na osnovu visokokvalitetnih rezultata dobijanje u referentnom *in vivo* ispitivanju na oku kunića (ispitna metoda B.5.) (2. i 14.) te prema sistemu klasifikovanja UN GHS (tj. kategorije 1., 2.A, 2.B ili bez kategorije) (1.) i CLP-u (tj. kategorije 1., 2. ili bez kategorije); iii. koje obuhvataju različite *in vivo* pokretače klasifikovanja (24. i 25.); iv. koje su reprezentativne za hemijske klase koji su korišteni u validacionoj studiji (8., 10. i 11.); v. koje obuhvataju dobru i široku zastupljenost organskih funkcionalnih grupa (8., 10. i 11.); vi. koje imaju dobro utvrđene hemijske strukture (8., 10. i 11.); vii. koje su obojene i/ili koje direktno redukuju MTT; viii. koje su dale ponovljive rezultate u ispitnim metodama RhCE tokom njihovih validacija; ix. koje su tačno predviđene ispitnim metodama RhCE tokom njihovih validacijskih studija; x. koje obuhvataju puni raspon *in vitro* odgovora na osnovu visokokvalitetnih podataka iz ispitnih metoda RhCE (vijabilnost od 0

do 100 %); xi. koje su komercijalno dostupne; i xii. koje nisu povezane s neprimjereno visokim troškovima nabave i/ili zbrinjavanja. U situacijama kada navedena hemikalija nije dostupna ili se ne može upotrijebiti iz drugih opravdanih razloga, mogla bi se upotrijebiti druga hemikalija koja ispunjava prethodno opisane kriterijume, npr. hemikalije koje su upotrijebljene u validaciji validirane referentne metode. Međutim, takva odstepena treba obrazložiti.

***Tabela 1.*Lista hemikalija koje služe za dokazivanje osposobljenosti**

Hemijski naziv	CAS br.	Organska funkcionalna grupa	Agregatno stanje	Vijabilnost za VRM1 (%)	Vijabilnost za VRM2 (%)	Predviđanje VRM-a	TSupstanca koja redukuje MTT	Interferencija s bojom
***In vivo* kategorija 1.**								
Metil-tioglikolat	2365-48-2	Ester karboksilne kiseline; tioalkohol	Tečne	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	Predviđanje nije moguće	Da (jako)	Ne
Hidroksietil-akrilat	818-61-1	Akrilat; alkohol	Tečne	7,5 ± 4,7	1,6 ± 1,0	Predviđanje nije moguće	Ne	Ne
2,5-dimetil-2,5-heksandiol	110-03-2	Alkohol	Kruto	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	Predviđanje nije moguće	Ne	Ne
Natrijum oksalat	62-76-0	Okso-karboksilna kiselina	Kruto	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	Predviđanje nije moguće	Ne	Ne
In vivo kategorija 2.A								
2,4,11,13-tetraazatetradekan-diimidamid, N,N″-bis(4-hlorfenil)-3,12-	18472-51-0	Aromatski heterociklično halid; aril halid;	Tečne	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	Predviđanje nije moguće	Ne	Da (slabo)

diimino-, di-D-glukonat (20 %, vodena RASTVOR A) ([85])		dihidroksilna grupa; gvanidin						
Natrijum benzoat	532-32-1	Aril; karboksilna kiselina	Kruto	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	Predviđanje nije moguće	Ne	Ne
***In vivo* kategorija 2.B**								
Dietiltoluamid	134-62-3	Benzamid	Tečne	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	Predviđanje nije moguće	Ne	Ne
2,2-dimetil-3-metilenbiciklo [2.2.1] heptan	79-92-5	Alkan, razgranat tercijarnim ugljom; alken; bicikloheptan; karbociklički jedinjenjeevi s premoštenim prstenastim sistemom; cikloalkan	Kruto	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	Predviđanje nije moguće	Ne	Ne
***In vivo* bez kategorije**								
1-etil-3-metilimidazolium etilsulfat	342573-75-5	Alkoksi; amonijeva sol; aril;	Tečne	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Bez kat.	Ne	Ne

		imidazol; sulfat						
Dikaprilil eter	629-82-3	Alkoksi; eter	Tečne	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Bez kat.	Ne	Ne
Piperonil butoksid	51-03-6	Alkoksi; benzodioksol; benzil; eter	Tečne	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Bez kat.	Ne	Ne
Polietilen glikol (PEG-40) hidrogenirano g ricinusovog ulja	61788-85-0	Acilal; alkohol; alil; eter	Viskozno	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Bez kat.	Ne	Ne
1-(4-hlorfenil)-3-(3,4-dihlorfenil) urea	101-20-2	Aromatski heterociklično halid; aril halid; derivati uree	Kruto	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	Bez kat.	Ne	Ne
2,2′-metilen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol)	103597-45-1	Alkan razgranat kvarternim ugljom; vezani karbociklički aromatski jedinjenje; vezani zasićeni heterocik	Kruto	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	Bez kat.	Ne	Ne

		jedinjenjeevi; prekursori kinoidnih jedinjeeva; tert-butil						
Kalijev tetrafluoroborat	14075-53-7	Neorganska sol	Kruto	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Bez kat.	Ne	Ne

Skraćenice:

CAS br. = registarski broj Službe za podatke o hemijskim supstancama; UN GHS = Globalno usklađeni sistem Ujedinjenih naroda za klasifikovanje i označivanje hemikalija (1.); VRM1 = validirana referentna metoda, EpiOcular™ EIT; VRM2 = validirana referentna metoda, SkinEthic™ HCE EIT; Interferencija s bojom = interferencija s bojom kod mjerenja standardne apsorbancije (optička gustina (OD)) MTT formazana.

U okviru ispitivanja osposobljenosti preporučuje se da korisnici po primitku provjere svojstva barijere tkiva u skladu sa specifikacijama proizvođača modela tkiva RhCE To je posebno važno ako se tkiva šalju na velike udaljenosti/tokom dugih vremenskih perioda. Nakon što se ispitivanje uspješno uspostavi te nakon što se stekne i dokaže osposobljenost u pogledu njegove upotrebe, takva rutinska provjera neće biti potrebna. Međutim, kod rutinske upotrebe ispitivanja preporučuje se dalje ocjenjivanje svojstava barijere u pravilnim vremenskim razmacima.

POSTUPAK

Ovom ispitnom metodom trenutno su obuhvaćeni naučno valjani test nadraživanja oka EpiOcular™ i test nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnjače SkinEthic™, koji se nazivaju validirane referentne metode (VRM1 i VRM2). Dostupni su standardni operativni postupci (SOP) za ispitnu metodu RhCE te bi ih trebalo primjenjivati pri sprovođenju i primjeni ispitnih metoda u laboratoriju.

ELEMENTI ISPITNE METODE RHCE

Opšti uslovi

Treba upotrebljavati relevantne ljudske ćelije za rekonstrukciju trodimenzionalnog tkiva epitela koje nalikuje rožnici, a koje bi se trebalo sastojati od progresivno stratificiranih, ali ne i kornificiranih ćelija. Model tkiva RhCE priprema se u umetcima s poroznom sintetičkom membranom kroz koju hranjive supstance mogu proći do ćelija. U rekonstruiranom epitelu koji nalikuje rožnici trebaju biti prisutni višestruki slojevi vijabilnih, nekeratiniziranih ćelija epitela. Model tkiva RhCE trebao bi imati površinu epitela koja je u direktnom dodiru sa zrakom kako bi se omogućilo direktno lokalno izlaganje ispitivanim hemikalijama na način koji je sličan načinu na koji bi epitel rožnjače bio izložen *in vivo*. Model tkiva RhCE treba činiti funkcionalnu barijeru koja je dovoljno otporna da zaustavi brzi prodor citotoksičnih referentnih supstanci, npr. Tritona

X-100 ili natrijuma dodecil-sulfata (SDS). Treba dokazati funkciju barijere, a ona se može ocijeniti utvrđivanjem ili vremena izlaganja potrebnog za smanjenje vijabilnosti tkiva za 50 % (ET_{50}) nakon primjene referentne supstance u utvrđenoj, fiksnoj koncentraciji (npr. 100 µl 0,3-postotnog (v/v) Tritona X-100) ili koncentracije pri kojoj referentna supstanca smanjuje vijabilnost tkiva za 50 % (IC_{50}) nakon fiksnog vremena izlaganja (npr. 30 minuta tretiranja s 50 µl SDS-a). Model tkiva RhCE treba biti dovoljno nepropustan da spriječi prolazak ispitivane hemikalije oko ruba vijabilnog tkiva, jer bi to moglo značiti loše modeliranje izlaganja rožnjače. Ljudske ćelije koje se upotrebljavaju za utvrđivanje modela tkiva RhCE ne smiju biti onečišćene bakterijama, virusima, mikoplazmom i gljivicama. Dobavljač treba provjeriti je li model tkiva sterilan i utvrditi da nema kontaminacije gljivicama i bakterijama.

Funkcionalni uslovi

Vijabilnost

Za kvantifikaciju vijabilnosti tkiva upotrebljava se MTT test (16.). Vijabilne ćelije modela tkiva RhCE redukuju vitalnu boju MTT u talog plavog MTT formazana, koji se zatim ekstrahira iz tkiva izopropanolom (ili sličnim rastvaračem). Ekstrahirani MTT formazan može se kvantifikovati upotrebom mjerenja standardne apsorbancije (optička gustina (OD)) ili postupkom HPLC/UPLC spektrofotometrije (36.). Optička gustina (OD) samog ekstrakcijskog rastvarača treba biti dovoljno mala, tj. OD < 0,1. Korisnici modela tkiva RhCE trebali bi osigurati da svaka šarža modela tkiva RhCE koji se upotrebljava ispunjava utvrđene kriterijume za negativnu kontrolu. Rasponi prihvatljivosti za vrijednosti optičke gustine negativne kontrole za validirane referentne metode navedeni su u tabeli 2. Korisnik HPLC/UPLC spektrofotometrije trebao bi upotrebljavati raspone optičke gustine negativne kontrole navedene u tabeli 2. kao kriterij prihvatljivosti za negativnu kontrolu. U ispitnom izvješću potrebno je dokumentirati da su tkiva tretirana s supstance za negativnu kontrolu stabilna u kulturi (daju slična mjerenja vijabilnosti tkiva) za vrijeme trajanja ispitnog izlaganja. Proizvođač tkiva trebao bi slijediti isti postupak kao dio kontrole kvalitete šarže tkiva, ali u tom se slučaju mogu primjenjivati različiti kriterijumi prihvatljivosti od kriterijuma navedenih u tabeli 2. Raspon prihvatljivosti (gornja i donja granica) za vrijednosti optičke gustine negativne kontrole (u uslovima ispitne metode za kontrolu kvalitete) treba utvrditi subjekt koji je razvio model tkiva RhCE ili dobavljač tog modela.

***Tabela 2.*Rasponi prihvatljivosti vrijednosti optičke gustine negativne kontrole (za korisnike testa)**

Test	Donja granica prihvatljivosti	Gornja granica prihvatljivosti
EIT EpiOcular™ (OCL-200) – VRM1 (za protokole za tečnosti i čvrste supstance)	> 0,8 ([86])	< 2,5
EIT s HCE-om SkinEthic™ (HCE/S) – VRM2 (za protokole za tečnosti i čvrste supstance)	> 1,0	≤ 2,5

Funkcija barijere

Model tkiva RhCE treba biti dovoljno debeo i čvrst kako bi onemogućio brzu penetraciju citotoksičnih referentnih supstanci, kako je procijenjeno npr. vrijednošću ET_{50} (Triton X-100) ili

IC_{50} (SDS). Subjekt koji je razvio model tkiva RhCE ili njegov prodavatelj trebao bi pri dostavi tkiva krajnjem korisniku dokazati funkciju barijere svake šarže modela tkiva RhCE koji se upotrebljava.

Morfologija

Histološko ispitivanje modela tkiva RhCE trebalo bi pokazivati strukturu epitela koja nalikuje ljudskoj rožnici (uključujući barem tri sloja vijabilnih ćelija epitela i nekeratiniziranu površinu). Subjekt koji je razvio model ili dobavljač utvrdio je odgovarajuću morfologiju za validirane referentne metode te je stoga korisnik ispitne metode ne mora ponovno dokazivati za svaku šaržu tkiva.

Obnovljivost

Rezultati pozitivne i negativne kontrole ispitne metode trebaju dokazati obnovljivost tokom vremena.

Kontrola kvalitete (KK)

Model tkiva RhCE trebao bi se upotrebljavati samo ako subjekt koji ga je razvio ili dobavljač dokaže da svaka šarža upotrijebljenog modela tkiva RhCE ispunjava definisane kriterijume za odobrenje proizvoda, među kojima su najvažniji vijabilnost i funkcija barijere. Raspon prihvatljivosti (gornje i donje granice) za funkcije barijere, kako se mjeri vrijednošću ET_{50} ili IC_{50}. i 26.), treba utvrditi subjekt koji je razvio model tkiva RhCE ili njegov dobavljač. Raspon prihvatljivosti vrijednosti ET_{50} i IC_{50} koji subjekt koji je razvio modele tkiva RhCE (koji se upotrebljavaju u validiranim referentnim metodama) ili njihov dobavljač upotrebljava kao kriterij za kontrolu kvalitete šarže naveden je u tabeli 3. Subjekt koji je razvio model tkiva RhCE ili njegov dobavljač treba korisnicima ispitne metode dostaviti podatke kojima se dokazuje usklađenost sa svim kriterijumima za odobrenje proizvoda kako bi korisnici mogli uključiti te informacije u izvještaj o ispitivanju. Samo rezultati dobijeni s tkivima koja ispunjavaju sve te kriterijume za odobrenje proizvoda mogu se prihvatiti za pouzdano predviđanje hemikalija koje ne treba klasifikovati i označiti s obzirom na nadraživanje oka ili tešku povredu oka u skladu sa sistemom UN GHS/CLP-om.

***Tabela 3.*Kriterijum za kontrolu kvalitete šarže**

Test	Donja granica prihvatljivosti	Gornja granica prihvatljivosti
EIT EpiOcular™ (OCL-200) – VRM1 (100 µl 0,3-postotnog (v/v) Tritona X-100)	ET_{50} = 12,2 min	ET_{50} = 37,5 min
EIT s HCE-om SkinEthic™ (HCE/S) – VRM2 (30 minuta tretiranja s 50 µl SDS-a)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Primjena ispitivane hemikalije i kontrolnih supstanci

Za svaku ispitivanu hemikaliju i svaku kontrolnu supstancu trebalo bi upotrijebiti najmanje dva ponovljena uzorka tkiva u svakom ciklusu. Upotrebljavaju se dva različita protokola za tretiranje, jedan za tečne ispitivane hemikalije i jedan za hemikalije u čvrstom stanju (34. i 35.). Kod obje

metode i oba protokola površinu modela tkiva treba navlažiti Dulbeccovom fiziološkom rastvorinom puferiranom fosfatnim puferom bez kalcija i magnezija (DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}) prije primjene ispitivanih hemikalija kako bi se oponašali vlažni uslovi ljudskog oka. Tretiranje tkiva započinje izlaganjem ispitivanim hemikalijama i kontrolnim supstancama. Kod oba protokola za tretiranje u obje validirane ispitne metode treba primijeniti dovoljnu količinu ispitivane hemikalije ili kontrolne supstance kako bi se ravnodnosno prekrila površina epitela tako da se izbjegne beskonačna doza (Dodatak 2.).

Ispitivane hemikalije koje se mogu pipetirati pri temperaturi od 37 °C ili nižoj (prema potrebi upotrebom pipete koja radi na načelu pozitivnog istisnog volumena) tretiraju se kao tečnosti u validiranim referentnim metodama, a u suprotnom bi se trebale tretirati kao hemikalije u čvrstom stanju. U validiranim referentnim metodama tečne ispitivane hemikalije ravnodnosno se nanose na površinu tkiva (tj. primjenjuje se najmanje 60 µl/cm^2) (vidjeti Dodatak 2., 33. i 34.). Kapilarnost (efekat površinske napetosti) do koje može doći zbog malih volumena koji se primjenjuju na umetak (na površinu tkiva) treba izbjegavati u mjeri u kojoj je to moguće kako bi se zajamčilo tačno doziranje tkiva. Tkiva tretirana tekućim ispitivanim hemikalijama inkubiraju se 30 minuta u standardnim uslovima kulture (37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %). Na kraju perioda izlaganja tekuću ispitivanu hemikaliju i kontrolne supstance treba pažljivo ukloniti s površine tkiva obilnim ispiranjem DPBS-om bez Ca^{2+}/Mg^{2+} na sobnoj temperaturi. Nakon tog koraka ispiranja slijedi uranjanje u svježi medij na sobnoj temperaturi nakon izlaganja (kako bi se uklonila ispitivana hemikalija koju je tkivo apsorbiralo) u unaprijed utvrđenom razdoblju koje zavisi o upotrijebljenoj validiranoj referentnoj metodi. Samo u slučaju metode VRM1 prije primjene MTT testa primjenjuje se inkubacija nakon izlaganja u svježem medijumu u standardnim uslovima kulture (vidjeti Dodatak 2., 34. i 35.).

Ispitivane hemikalije koje se ne mogu pipetirati pri temperaturama do 37 °C u validiranim referentnim metodama tretiraju se kao čvrste supstance. Količina ispitivane hemikalije koja se primjenjuje treba biti dovoljna kako bi se prekrila cijela površina tkiva, tj. treba primijeniti najmanje 60 mg/cm^2 (Dodatak 2.). Kad god je to moguće, hemikalije u čvrstom stanju treba ispitivati u obliku sitnog praha. Tkiva tretirana ispitivanim hemikalijama u čvrstom stanju inkubiraju se u unaprijed utvrđenom razdoblju (u zavisnosti o upotrijebljenoj validiranoj referentnoj metodi) u standardnim uslovima kulture (vidjeti Dodatak 2., 34. i 35.). Na kraju perioda izlaganja ispitivanu hemikaliju u čvrstom stanju i kontrolne supstance treba pažljivo ukloniti s površine tkiva obilnim ispiranjem DPBS-om bez Ca^{2+}/Mg^{2+} na sobnoj temperaturi. Nakon tog koraka ispiranja, a prije primjene MTT testa, nakon izlaganja slijedi uranjanje u svježi medij na sobnoj temperaturi (kako bi se uklonila ispitivana hemikalija koju je tkivo apsorbiralo) u unaprijed utvrđenom razdoblju, koje zavisi o upotrijebljenoj validiranoj referentnoj metodi, te inkubacija u svježem medijumu nakon izlaganja u standardnim uslovima kulture (vidjeti Dodatak 2., 34. i 35.).
U svaki ciklus treba uključiti istovremene negativne i pozitivne kontrole kako bi se dokazalo da su vijabilnost (utvrđena negativnom kontrolom) i osjetljivost (utvrđena pozitivnom kontrolom) tkiva u okviru raspona prihvatljivosti koji su utvrđeni na osnovu prošlih podataka. Istodobna negativna kontrola pruža i osnovicu (100-postotna vijabilnost) za izračun postotka relativne vijabilnosti tkiva tretiranih ispitivanom hemikalijom (%$vijabilnost_{test}$). Kao supstanca za pozitivnu kontrolu za upotrebu s validiranim referentnim metodama preporučuje se čisti metil-acetat (CAS br. 79-20-9, komercijalno dostupan kod npr. društva Sigma-Aldrich, Cat# 45997; tečnosti). Kao supstance za negativnu kontrolu za upotrebu s metodama VRM1 i VRM2 preporučuju se ultračisti H_2O i DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}. Te su se kontrolne supstance upotrebljavale u validacijskim studijama validiranih referentnih metoda i za njih postoji najviše prošlih podataka. Upotrebu primjerenih alternativnih supstance za pozitivnu i negativnu kontrolu treba naučno i

primjereno obrazložiti. Negativne i pozitivne kontrole treba ispitati primjenom istih protokola kao što su oni koji su upotrijebljeni za ispitivane hemikalije uključene u ciklus (tj. za tečnosti i/ili hemikalije u čvrstom stanju). Nakon te primjene slijedi tretiranje izlaganjem, ispiranje, uranjanje nakon izlaganja i inkubacija nakon izlaganja, ako je primjenjivo, kako je opisano za kontrole koje se provode istovremeno s tekućim ispitivanim hemikalijama ili za kontrole koje se provode istovremeno s ispitivanim hemikalijama u čvrstom stanju, prije primjene MTT testa. Jedan skup negativnih i pozitivnih kontrola dovoljan je za sve ispitivane hemikalije u istom agregatnom stanju (tečnosti ili hemikalije u čvrstom stanju) uključene u isti ciklus.

Mjerenja vijabilnosti tkiva

MTT test standardizirana je kvantitativna metoda koja bi se trebala upotrebljavati za mjerenje vijabilnosti tkiva u okviru ove ispitne metode. Taj je test prikladan za trodimenzionalni model tkiva. MTT test sprovodi se neposredno nakon perioda inkubacije nakon izlaganja. Kod validiranih referentnih metoda uzorak modela tkiva RhCE stavlja se u 0,3 ml rastvora MTT-a koncentracije 1 mg/ml na 180 ± 15 min u standardnim uslovima kulture. Vijabilne ćelije modela tkiva RhCE redukuju vitalnu boju MTT u talog plavog MTT formazana. Nataloženi proizvod plavog MTT formazana zatim se ekstrahira iz tkiva upotrebom primjerenog volumena izopropanola (ili sličnog rastvarača) (34. i 35.). Tkiva koja se ispituju tekućim ispitivanim hemikalijama treba ekstrahirati i iz gornjeg i donjeg dijela tkiva, dok tkiva koja se ispituju hemikalijama u čvrstom stanju i obojenim tečnostima treba ekstrahirati samo iz donjeg dijela tkiva (kako bi se smanjila potencijalna kontaminacija ekstrakcijske rastvora izopropanola ispitivanom hemikalijom koja je možda ostala u tkivu). Tkiva koja se ispituju tekućim ispitivanim hemikalijama koje nije jednostavno isprati isto se mogu ekstrahirati samo iz donjeg dijela tkiva. Supstance za negativnu i pozitivnu kontrolu koje se ispituju istovremeno treba tretirati slično kao i ispitivane hemikalije. Ekstrahirani MTT formazan može se kvantifikovati mjerenjem standardne apsorbancije (OD) na 570 nm upotrebom pojasa propuštanja do najviše ±30 nm ili upotrebom postupka HPLC/UPLC spektrofotometrije.

Optička svojstva ispitivanih hemikalija ili njihovo hemijsko djelovanje na MTT može uticati na mjerenje MTT formazana, što dovodi do pogrešne procjene vijabilnosti tkiva. Ispitivane hemikalije mogu uticati na mjerenje MTT formazana direktnom redukcijom MTT-a u plavi MTT formazan i/ili interferencijom s bojom ako ispitivana hemikalija apsorbira, prirodno ili zbog postupaka obrade, u istom rasponu optičke gustine kao i MTT formazan (tj. približno 570 nm). Prije ispitivanja treba sprovesti prethodne provjere kako bi se omogućilo utvrđivanje potencijalnih supstance koje direktno redukuju MTT i/ili hemikalija koje interferiraju s bojom te se trebaju upotrijebiti dodatne kontrole za otkrivanje i ispravljanje moguće interferencije tih ispitivanih hemikalija. To je naročito važno kada se određena ispitivana hemikalija ne ispere u potpunosti s modela tkiva RhCE ili prodre u epitel koji nalikuje rožnici te je stoga prisutna u modelima tkiva RhCE pri provođenju MTT testa. Za ispitivane hemikalije koje apsorbiraju svjetlost u istom rasponu kao i MTT formazan (prirodno ili nakon tretiranja), koje nisu kompatibilne s mjerenjem standardne apsorbancije (OD) MTT formazana zbog prejake interferencije, tj. jake apsorbancije na 570 ± 30 nm, za mjerenje MTT formazana može se upotrijebiti postupak HPLC/UPLC spektrofotometrije. Detaljan opis načina na koji se otkrivaju i ispravljaju izravna redukcija MTT-a i interferencije s bojilima dostupan je u standardnim operativnim pokolonama za validirane referentne metode. Ilustrativni dijagrami toka koji daju smjernice o tome kako utvrditi hemikalije koje direktno redukuju MTT i/ili hemikalije koje interferiraju s bojom te kako postupati s njima u okviru VRM1 i VRM2 navedeni su u dodacima III. i IV.

Kako bi se utvrdila potencijalna interferencija ispitivanih hemikalija koje apsorbiraju svjetlost u istom rasponu kao i MTT formazan (prirodno ili nakon tretiranja) i odlučilo jesu li potrebne dodatne kontrole, ispitivana hemikalija dodaje se vodi i/ili izopropanolu te se inkubira na

odgovarajuće vrijeme na sobnoj temperaturi. Ako ispitivana hemikalija u vodi i/ili izopropanolu apsorbira dovoljno svjetlosti u rasponu od 570 ± 20 nm za VRM1 (vidjeti Dodatak 3.) ili ako se miješanjem ispitivane hemikalije s vodom za VRM2 dobije obojena RASTVORA (vidjeti Dodatak 4.), pretpostavlja se da ispitivana hemikalija utiče na mjerenje standardne apsorbancije (OD) MTT formazana i treba sprovesti dalje kontrole bojila ili treba upotrijebiti postupak HPLC/UPLC spektrofotometrije, u kojem slučaju te kontrole nisu potrebne. Pri sprovođenju mjerenja standardne apsorbancije (OD), svaku interferirajuću ispitivanu hemikaliju treba primijeniti na najmanje dva ponovljena uzorka vijabilnog tkiva, koji se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja, ali se u koraku inkubacije MTT-a inkubiraju s medijem, a ne s rastvorinom MTT-a, kako bi se provela kontrola nespecifične boje u živim tkivima (NSC_{living}) (34. i 35.). Kontrolu NSC_{living} treba obavljati istovremeno uz ispitivanje obojene ispitivane hemikalije, a u slučaju više ispitivanja sa svakim provedenim ispitivanjem (u svakom ciklusu) treba sprovesti neovisnu kontrolu NSC_{living} zbog svojstvene biološke varijabilnosti živih tkiva. Prava vijabilnost tkiva računa se kao: postotak vijabilnosti tkiva koji se dobija iz živih tkiva izloženih interferirajućoj ispitivanoj hemikaliji i inkubiranih rastvorinom MTT-a (%$Vijabilnost_{test}$), umanjeno za postotak nespecifične boje dobijen sa živim tkivima izloženima interferirajućoj ispitivanoj hemikaliji i inkubiranima s medijem bez MTT-a, koji se sprovodi istovremeno kao i test koji se ispravlja (%NSC_{living}), tj. prava vijabilnost tkiva = [%$Vijabilnost_{test}$] – [%NSC_{living}].

Kako bi se identificirale supstance koje direktno redukuju MTT, svaku bi ispitivanu hemikaliju trebalo dodati u svježe pripremljenu rastvor MTT-a. Primjerena količina ispitivane hemikalije dodaje se rastvorini MTT-a i smjesa se inkubira približno tri sata u standardnim uslovima kulture (vidjeti dodatke III. i IV.) (34. i 35.). Ako smjesa MTT-a koja sadrži ispitivanu hemikaliju (ili suspenziju za nerastvorive ispitivane hemikalije) postane plava/ljubičasta, pretpostavlja se da ispitivana hemikalija direktno redukuje MTT i treba se sprovesti dalja funkcionalna provjera nevijabilnih modela tkiva RhCE, neu zavisnosti o upotrebi mjerenja standardne apsorbancije (OD) ili postupka HPLC/UPLC spektrofotometrije. U toj dodatnoj funkcionalnoj provjeri upotrebljavaju se mrtva tkiva kod kojih je prisutna samo preostala metabolička aktivnost, ali koja apsorbiraju i zadržavaju ispitivanu hemikaliju na sličan način kao i vijabilna tkiva. Mrtva tkiva za metodu VRM1 pripremaju se izlaganjem niskoj temperaturi („usmrćivanje zamrzavanjem"). Mrtva tkiva za metodu VRM2 pripremaju se produženom inkubacijom (npr. najmanje 24 ± 1 h) u vodi, nakon čega slijedi skladištenje na niskoj temperaturi („usmrćivanje vodom"). Svaka ispitivana hemikalija koja redukuje MTT primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka mrtvog tkiva koji se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja kako bi se provela kontrola nespecifične redukcije MTT-a (NSMTT) (34. i 35.). Dovoljna je jedna kontrola NSMTT po ispitivanoj hemikaliji neu zavisnosti o broju provedenih nezavisnih ispitivanja/ciklusa. Prava vijabilnost tkiva računa se kao: postotak vijabilnosti tkiva dobijen sa živim tkivima izloženim supstancama koje redukuje MTT (%$Vijabilnost_{test}$), umanjen za postotak nespecifične redukcije MTT-a dobijen s mrtvim tkivima izloženima istoj supstanci koja redukuje MTT, izračunano u odnosu na negativnu kontrolu koja se sprovodi istovremeno kao i test koji se ispravlja (%NSMTT), tj. prava vijabilnost tkiva = [%$Vijabilnost_{test}$] – [%NSMTT].

Za ispitivane hemikalije za koje se utvrdi da interferiraju s bojom i direktno redukuju MTT bit će potreban i treći skup kontrola pri mjerenju standardne apsorbancije (OD) osim kontrola NSMTT i NSC_{living} opisanih. To je obično slučaj kod tamno obojenih ispitivanih hemikalija koje apsorbiraju svjetlost u rasponu od 570 ± 30 nm (npr. plave, ljubičaste ili crne hemikalije) jer njihova intrinzična boja sprečava procjenu njihove sposobnosti da direktno redukuju MTT. Zbog toga je automatski obvezna upotreba kontrola NSMTT, zajedno s kontrolama NSC_{living}. I živa i mrtva tkiva mogu apsorbirati i zadržati ispitivane hemikalije za koje se provode i kontrola NSMTT i kontrola NSC_{living}. Stoga se u tom slučaju kontrolom NSMTT može ispraviti ne samo potencijalna izravna redukcija MTT-a ispitivanom hemikalijom, već i interferencija s bojom koja je posljedica apsorpcije i zadržavanja ispitivane hemikalije u mrtvim tkivima. To bi moglo dovesti do dvostrukog ispravka za interferenciju s bojom jer se kontrolom NSC_{living} već ispravlja

interferencija s bojom koja je posljedica apsorpcije i zadržavanja ispitivane hemikalije u živim tkivima. Kako bi se izbjegao mogući dvostruki ispravak za interferenciju s bojom, treba sprovesti treću kontrolu za nespecifičnu boju u mrtvim tkivima (NSC_{killed}) (vidjeti dodatke III. i IV. te literaturu pod 34. i 35.). U toj dodatnoj kontroli ispitivana hemikalija primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka mrtvog tkiva, koja se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja, ali se u koraku inkubacije MTT-a inkubiraju s medijem, a ne s rastvorinom MTT-a. Dovoljna je jedna kontrola NSC_{killed} po ispitivanoj hemikaliji neu zavisnosti o broju provedenih nezavisnih ispitivanja/ciklusa, ali treba je sprovoditi istovremeno s kontrolom NSMTT i s istom šaržom tkiva. Prava vijabilnost tkiva računa se kao: postotak vijabilnosti tkiva dobijen sa živim tkivima izloženima ispitivanoj hemikaliji ($\%Vijabilnost_{test}$), umanjeno za %NSMTT i $\%NSC_{living}$ te uvećano za postotak nespecifične boje dobijen s mrtvim tkivima izloženima interferirajućoj ispitivanoj hemikaliji i inkubiranima s medijem bez MTT-a, izračunano u odnosu na negativnu kontrolu koja se sprovodi istovremeno kao i test koji se ispravlja ($\%NSC_{killed}$), tj. prava vijabilnost tkiva = $[\%Vijabilnost_{test}] – [\%NSMTT] – [\%NSC_{living}] + [\%NSC_{killed}]$.

Važno je napomenuti da nespecifična redukcija MTT-a i interferencije s nespecifičnim bojama mogu povećati optičku gustinu (kod mjerenja standardne apsorbancije) ekstrakta tkiva iznad raspona linearnosti spektrofotometra i da nespecifična redukcija MTT-a može povećati i površinu pika MTT formazana (kod mjerenja HPLC/UPLC spektrofotometrijom) ekstrakta tkiva iznad raspona linearnosti spektrofotometra. Na osnovu toga važno je da svaki laboratorij prije početka ispitivanja ispitivanih hemikalija u regulatorne svrhe utvrdi raspon linearnosti optičke gustine/površine pika svojeg spektrofotometra, npr. s MTT formazanom (CAS # 57360-69-7), komercijalno dostupnim kod npr. društva Sigma-Aldrich (Cat# M2003).

Mjerenje standardne apsorbancije spektrofotometrom primjereno je za procjenu hemikalija koje direktno redukuju MTT i ispitivanih hemikalija koje interferiraju s bojom ako je uočena interferencija kod mjerenja MTT formazana prevelika (tj. vrijednosti optičke gustine ekstrakata tkiva dobijanje s ispitivanom hemikalijom bez ispravaka za direktnu redukciju MTT-a i/ili interferencija s bojom unutar su linearnog raspona spektrofotometra). Ipak, rezultate za ispitivane hemikalije koji daju %NSMTT i/ili $\%NSC_{living} \geq 60$ % (VRM1 i VRM2 za protokol za tečnosti) ili 50 % (VRM2 za protokol za hemikalije u čvrstom stanju) negativne kontrole trebalo bi oprezno tumačiti jer je to utvrđena granična vrijednost koja se u validiranim referentnim metodama upotrebljava za razlikovanje klasifikovanih i neklasifikovanih hemikalija. Međutim, standardna apsorbancija ne može se mjeriti kada je interferencija s mjerenjem MTT formazana prejaka (tj. kada dovodi do neispravljenih vrijednosti optičke gustine ispitivanih ekstrakata tkiva izvan linearnog raspona spektrofotometra). Obojene ispitivane hemikalije ili ispitivane hemikalije koje se oboje u dodiru s vodom ili izopropanolom koje prejako interferiraju s mjerenjem standardne apsorbancije (OD) MTT formazana mogu se procijeniti primjenom HPLC/UPLC spektrofotometrije (vidjeti dodatke III. i IV.). Razlog je tome što sistem HPLC/UPLC omogućuje izdvajanje MTT formazana iz hemikalije prije njegove kvantifikacije. Zato pri upotrebi HPLC/UPLC spektrofotometrije nikada nisu potrebne kontrole NSC_{living} i NSC_{killed}, neu zavisnosti o hemikaliji koja se ispituje. Kontrole NSMTT ipak treba upotrijebiti ako se sumnja u to da ispitivana hemikalija direktno redukuje MTT. Kontrole NSMTT treba upotrijebiti i s ispitivanim hemikalijama koje imaju boju (intrinzičnu ili koja se javlja u vodi) koja sprečava procjenu njihove sposobnosti da direktno redukuju MTT. Ako se za mjerenje MTT formazana upotrebljava HPLC/UPLC spektrofotometrija, postotak vijabilnosti tkiva računa se kao postotak površine pika MTT formazana dobijen sa živim tkivima izloženima ispitivanoj hemikaliji u odnosu na pik MTT formazana dobijen s istovremenom negativnom kontrolom. Za ispitivane hemikalije koje mogu direktno redukujeti MTT prava vijabilnost tkiva računa se kao: $\%Vijabilnost_{test}$ umanjeno za %NSMTT. Naposljetku, treba napomenuti da se ispitnim metodama RhCE ne mogu procijeniti hemikalije koje direktno redukuju MTT ili hemikalije koje direktno redukuju MTT koje ujedno mogu interferirati s bojom, koje se zadržavaju u tkivima nakon tretiranja i redukuju MTT toliko jako da dovode do optičke gustine (upotrebom standardnog mjerenja optičke gustine) ili

površina pika (upotrebom UPLC/HPLC spektrofotometrije) ispitivanih ekstrakata tkiva koje su izvan raspona linearnosti spektrofotometra, iako se očekuje da će se one javljati samo u isključivo rijetkim slučajevima.
HPLC/UPLC spektrofotometrija može se upotrebljavati sa svim vrstama ispitivanih hemikalija (obojenima i neobojenima, koje redukuju MTT i koje ga ne redukuju) za mjerenje MTT formazana. Zbog raznolikosti sistema HPLC/UPLC spektrofotometrije nije izvodivo da svaki korisnik uspostavi identične uslove sistema. Stoga bi kvalifikaciju sistema HPLC/UPLC spektrofotometrije trebalo dokazati prije njegove upotrebe za kvantificiranje MTT formazana iz ekstrakata tkiva tako da sistem ispuni kriterijume prihvatljivosti za skup standardnih parametara kvalifikacije u skladu s parametrima opisanima u smjernicama američke Uprave za hranu i lijekove o validaciji bioanalitičkih metoda namijenjenih industriji. Ti ključni parametri i njihovi kriterijumi prihvatljivosti prikazani su u Dodatku 5. Kada se ispune kriterijumi prihvatljivosti definišeni u Dodatku 5., smatra se da je sistem HPLC/UPLC spektrofotometrije kvalifikovan i spreman za mjerenje MTT formazana u eksperimentnim uslovima opisanima u ovoj ispitnoj metodi.

Kriterijumi prihvatljivosti

Za svaki ciklus u kojem se upotrebljavaju šarže tkiva RhCE koje ispunjavaju kontrolu kvalitete, tkiva tretirana s supstance za negativnu kontrolu trebala bi imati optičku gustinu koja odražava kvalitetu tkiva za koja su poštovani koraci dopreme i preuzimanja te svi postupci protokola i koja ne bi smjela biti izvan prethodno utvrđenih granica opisanih u tabeli 2. Slično tome, tkiva tretirana s supstance za pozitivnu kontrolu, tj. metilacetatom, trebaju pokazivati srednju vijabilnost tkiva < 50 % u odnosu na negativnu kontrolu u metodi VRM1 s protokolom za tečnosti ili hemikalije u čvrstom stanju i ≤ 30 % (protokol za tečnosti) ili ≤ 20 % (protokol za hemikalije u čvrstom stanju) u odnosu na negativnu kontrolu u metodi VRM2, što odražava sposobnost tkiva da odgovore na nadražujuću ispitivanu hemikaliju u uslovima ispitivane metode. Varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva s ispitivanim hemikalijama i kontrolnim supstancama trebala bi biti unutar prihvaćenih granica (tj. razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva trebala bi biti manja od 20 % odnosno standardna devijacija u tri ponovljena uzorka tkiva ne bi trebala biti veća od 18 %). Ako je negativna ili pozitivna kontrola uključena u ciklus izvan prihvaćenih raspona, smatra se da ciklus ne ispunjava zahtjeve i treba ga ponoviti. Ako je varijabilnost između ponovljenih uzorka tkiva s ispitivanom hemikalijom izvan prihvaćenog raspona, mora se smatrati da test ne ispunjava zahtjeve i ispitivanu hemikaliju treba ponovno ispitati.

Tumačenje rezultata i model predviđanja

Vrijednosti optičke gustine/površine pika dobijene s ponovljenim ekstraktima tkiva za svaku ispitivanu hemikaliju treba upotrebljavati za izračun srednjeg postotka vijabilnosti tkiva (srednja vrijednost među ponovljenim uzorcima tkiva) normaliziranog u odnosu na negativnu kontrolu, koja je određena kao 100 %. Granična vrijednost postotka vijabilnosti tkiva za utvrđivanje ispitivanih hemikalija koje ne treba klasifikovati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku povredu oka (bez kategorije prema sistemu UN GHS i CLP-u) navedena je u tabeli 4. Rezultate stoga treba tumačiti na sljedeći način:

—utvrđuje se da ispitivanu hemikaliju ne treba klasifikovati i označiti u skladu sa sistemom UN GHS i CLP-om (bez kategorije) ako je srednji postotak vijabilnosti tkiva nakon izlaganja i inkubacije nakon izlaganja veći od (>) utvrđene granične vrijednosti postotka vijabilnosti tkiva, kako je prikazano u tabeli 4. U tom slučaju nije potrebno dalje ispitivanje drugim ispitnim metodama,

—ako je srednji postotak vijabilnosti tkiva nakon izlaganja te inkubacije nakon izlaganja manji

od ili jednak (≤) utvrđenoj graničnoj vrijednosti postotka vijabilnosti tkiva, predviđanje nije moguće, kako je prikazano u tabeli 4. U tom će slučaju biti potrebno dalje ispitivanje s drugim ispitnim metodama jer ispitne metode RhCE pokazuju određeni broj lažno pozitivnih rezultata ne razlikuju kategorije 1. i 2. prema sistemu UN GHS i CLP-u.

***Tabela 4.*Modeli predviđanja u skladu s klasifikovanjem prema sistemu UN GHS i CLP-u**

VRM	Bez kategorije	Predviđanje nije moguće
VRM 1 – EIT EpiOcular™ (za oba protokola)	Srednja vijabilnost tkiva > 60 %	Srednja vijabilnost tkiva ≤ 60 %
VRM 2 – EIT s HCE-om SkinEthic™ (za protokol za tečnosti)	Srednja vijabilnost tkiva > 60 %	Srednja vijabilnost tkiva ≤ 60 %
VRM2 – EIT s HCE-om SkinEthic™ (za protokol za hemikalije u čvrstom stanju)	Srednja vijabilnost tkiva > 50 %	Srednja vijabilnost tkiva ≤ 50 %

Jedan test koji obuhvata najmanje dva ponovljena uzorka tkiva trebao bi biti dovoljan za ispitivanu hemikaliju ako je rezultat nedvosmislen. Međutim, u slučajevima graničnih rezultata, kao što su neusklađena ponovljena mjerenja i/ili srednji postotak vijabilnosti tkiva od 60 ± 5 % (VRM1 i VRM2 za protokol za tečnosti) ili 50 ± 5 % (VRM2 za protokol za hemikalije u čvrstom stanju), trebalo bi razmotriti drugi test, a i treći test u slučaju neusklađenih rezultata između prva dva testa.

Za specifične vrste smjesa mogu se razmotriti različite granične vrijednosti postotaka vijabilnosti tkiva prema kojima se klasifikovane ispitivane hemikalije razlikuju od neklasifikovanih, ako je primjereno i obrazloženo, kako bi se povećala ukupna uspješnost ispitne metode za te vrste smješa. Referentne hemikalije mogu biti korisne za procjenu potencijala nepoznate ispitivane hemikalije ili klasaa proizvoda da uzrokuju tešku povredu oka/nadraživanje oka ili za procjenu relativne potencijalne okularne toksičnosti klasifikovane hemikalije unutar specifičnog raspona pozitivnih odgovora.

PODACI I IZVJEŠTAVANJE

Podaci

Podatke iz pojedinačnih ponovljenih tkiva u ciklusu (npr. podaci o vrijednosti optičke gustine/površini pika MTT formazana i izračunanom postotku vijabilnosti tkiva za ispitivanu hemikaliju i kontrole te konačno predviđanje na osnovu ispitne metode RhCE) treba navesti u obliku tabele za svaku ispitivanu hemikaliju, prema potrebi uključujući i podatke iz ponovljenih testova. Osim toga, treba navesti i srednji postotak vijabilnosti tkiva i razliku vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva (ako je n = 2 ponovljena uzorka tkiva) ili standardnu devijaciju (ako

je n ≥ 3 ponovljena uzorka tkiva) za svaku pojedinačnu ispitivanu hemikaliju i kontrolu. Za svaku ispitanu hemikaliju treba navesti svaku uočenu interferenciju s mjerenjem MTT formazana koje ispitivana hemikalija uzrokuje direktnom redukcijom MTT-a i/ili interferencijom s bojom.

Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju trebalo bi da sadrži sljedeće informacije.

Ispitivana hemikalija

Supstanca s jednim sastojkom:

—hemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS registracijski broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

—agregatno stanje, isparljivost, pH-vrijednost, LogP, molekularna masa, hemijski klasa i dodatna relevantna fizičko-hemijska svojstva relevantna za primjenu studije, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.,

— obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

— uslovi skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni.

Supstanca s više sastojaka, UVCB supstanca i smješa:

—opisane koliko god je to moguće npr. hemijskim identitetom (vidjeti gore), čistoćom, količinskom zastupljenošću i relevantnim fizičko-hemijskim svojstvima sastojaka (vidjeti gore), u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

—agregatno stanje i dodatna relevantna fizičko-hemijska svojstva relevantna za primjenu studije, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.,

— obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

— uslovi skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni.

Supstanca za pozitivnu i negativnu kontrolu

—hemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS registracijski broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

—agregatno stanje, isparljivost, molekularna masa, hemijski klasa i dodatna relevantna fizičko-hemijska svojstva relevantna za primjenu studije, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

— čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.,

— obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

— uslovi skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

—ako je primjenjivo, obrazloženje upotrebe negativne kontrole koja nije ultračisti H_2O ili DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+},

—ako je primjenjivo, obrazloženje upotrebe pozitivne kontrole koja nije čisti metil-acetat,

—upućivanje na rezultate koji se odnose na prošle pozitivne i negativne kontrole i pokazuju primjerenost kriterijuma prihvatljivosti ciklusa.

Informacije o naručitelju i ustanovi koja sprovodi ispitivanje:

— naziv i adresa naručitelja, ustanove koja sprovodi ispitivanje i voditelja istraživanja.

— *Upotrijebljeni model tkiva RhCE i protokol (uz obrazloženje izbora ako je primjenjivo)*

Uslovi primjene ispitne metode:

— upotrijebljeni model tkiva RhCE, uključujući broj šarže,

—talasna dužina i pojas propuštanja (ako je primjenjivo) koji se upotrebljavaju za kvantifikaciju MTT formazana te raspon linearnosti mjernog uređaja (npr. spektrofotometra),

— opis metode koja se upotrebljava za kvantifikaciju MTT formazana,

— opis upotrijebljenog sistema HPLC/UPLC spektrofotometrije, ako je primjenjivo,

—potpune popratne informacije o konkretnom modelu tkiva RhCE koji je korišten, uključujući njegove radne karakteristike. To bi, među ostalim, trebalo uključivati:

i. kontrolu kvalitete vijabilnosti (dobavljač);

ii. vijabilnost u uslovima primjene ispitne metode (korisnik);

iii. kontrolu kvalitete funkcije barijere;

iv. morfologiju ako je dostupna;

v. obnovljivost i prediktivnu sposobnost;

vi. druge kontrole kvalitete (KK) modela tkiva RhCE ako su dostupne,

—upućivanje na prošle podatke za model tkiva RhCE. To bi, među ostalim, trebalo uključivati: prihvatljivost podataka o kontroli kvalitete s upućivanjem na prošle podatke o šarži,

—izjava o tome da je ustanova koja sprovodi ispitivanje dokazala osposobljenost za upotrebu ispitne metode prije rutinske upotrebe ispitivanjem hemikalija koje služe za dokazivanje osposobljenosti.

Kriterijumi prihvatljivosti ciklusa i ispitivanja:

—srednje vrijednosti i rasponi prihvatljivosti pozitivnih i negativnih kontrola na osnovu prošlih podataka,

—prihvatljiva varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva za pozitivne i negativne kontrole,

— prihvatljiva varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva za ispitivanu hemikaliju.

Ispitni postupak:

— pojedinosti o upotrijebljenom ispitnom postupku,

— doze upotrijebljenih ispitivanih hemikalija i kontrolnih supstanci,

—trajanja i temperature izlaganja, uranjanja nakon izlaganja i inkubacije nakon izlaganja (ako je primjenjivo),

— opis svih izmjena ispitnog postupka,

—oznake kontrola koje se koriste za supstance koje neposredno redukuju MTT i/ili ispitivane

hemikalije za bojenje, ako je primjenjivo,

—broj ponovljenih uzoraka tkiva upotrijebljenih po ispitivanoj hemikaliji i kontrolama (pozitivna kontrola, negativna kontrola i NSMTT, NSC_{living} i NSC_{killed}, ako je primjenjivo).

Rezultati

—tablični prikaz podataka za pojedinačne ispitivane hemikalije i kontrolne supstance za svaki ciklus (uključujući ponovljene eksperimente ako je primjenjivo) i svako ponovljeno mjerenje, uključujući vrijednost optičke gustine ili površinu pika MTT formazana, postotak vijabilnosti tkiva, srednji postotak vijabilnosti tkiva, razlike između ponovljenih uzoraka tkiva ili standardne devijacije te konačno predviđanje,

—ako je primjenjivo, rezultati kontrola upotrijebljenih za hemikalije koje neposredno redukuju MTT i/ili obojenih ispitivanih hemikalija, uključujući vrijednost optičke gustine ili površinu pika MTT formazana, %NSMTT, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, razliku između ponovljenih uzoraka tkiva ili standardnu devijaciju, konačni tačni postotak vijabilnosti tkiva i konačno predviđanje,

—rezultati dobijeni s ispitivanim hemikalijama i kontrolnim supstancama u odnosu na utvrđene kriterijume prihvatljivosti za ciklus i ispitivanje,

— opis drugih uočenih efekata, npr. ako obojena ispitivana hemikalija oboji tkiva.

Rasprava o rezultatima

Zaključak

***Dodatak 2.*GLAVNI ELEMENTI TESTOVA RHCE VALIDIRANIH ZA UTVRĐIVANJE HEMIKALIJA KOJE NIJE POTREBNO KLASIFIKOVATI I OZNAČITI S OBZIROM NA NADRAŽIVANJE OKA ILI TEŠKU POVREDU OKA**

Elementi testa	**EIT EpiOcular™ (VRM 1)**		**EIT s HCE-om SkinEthic™ (VRM 2)**	
Protokoli	Tečnosti (koje se mogu pipetirati na temperaturi od 37 ± 1 °C ili nižoj 15 min)	Hemikalije u čvrstom stanju (ne mogu se pipetirati)	Tečnosti i viskozne hemikalije (mogu se pipetirati)	Hemikalije u čvrstom stanju (ne mogu se pipetirati)
Površina modela	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Broj ponovljenih uzoraka tkiva	Najmanje dva	Najmanje dva	Najmanje dva	Najmanje dva
Prethodna provjera za interferenciju s bojom	50 µl + 1 ml H_2O 60 min na 37 ± 2 ^oC, 5 ± 1 % CO_2, relativna	50 mg + 1 ml H_2O 60 min na 37 ± 2 ^oC, 5 ± 1 % CO_2, relativna	10 µl + 90 µl H_2O miješano 30 ± 2 min na sobnoj temperaturi	10 mg + 90 µl H_2O miješano 30 ± 2 min na sobnoj temperaturi

	vlažnost ≥ 95 % (bezbojne ispitivane hemikalije) ili 50 µl + 2 ml izopropanola miješano 2–3 h na sobnoj temp. (obojene ispitivane hemikalije) ➔ ako je OD ispitivane hemikalije pri 570 ± 20 nm, nakon što se oduzme OD za izopropanol ili vodu, > 0,08 (što odgovara približno 5 % srednjeg OD-a negativne kontrole), trebalo bi sprovesti prilagođene kontrole na živom tkivu	vlažnost ≥ 95 % (bezbojne ispitivane hemikalije) i/ili 50 mg + 2 ml izopropanola miješano 2–3 h na sobnoj temp. (obojene i bezbojne ispitivane hemikalije) ➔ ako je OD ispitivane hemikalije pri 570 ± 20 nm, nakon što se oduzme OD za izopropanol ili vodu, > 0,08 (što odgovara približno 5 % srednjeg OD-a negativne kontrole), trebalo bi sprovesti prilagođene kontrole na živom tkivu	(18–28 ^{o}C) ➔ ako je ispitivana hemikalija obojena, trebalo bi sprovesti prilagođene kontrole na živom tkivu	➔ ako je ispitivana hemikalija obojena, trebalo bi sprovesti prilagođene kontrole na živom tkivu
Prethodna provjera direktne redukcije MTT-a	RASTVORA 50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml tokom 180 ± 15 min na 37 ± 2 ^{o}C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 % ➔ ako RASTVORA postane plava/ljubičasta, treba sprovesti prilagođene kontrole usmrćivanjem zamrzavanjem	RASTVORA 50 mg + 1 ml MTT 1 mg/ml tokom 180 ± 15 min na 37 ± 2 ^{o}C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 % ➔ ako RASTVORA postane plava/ljubičasta, treba sprovesti prilagođene kontrole usmrćivanjem zamrzavanjem	RASTVORA 30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml tokom 180 ± 15 min na 37 ± 2 ^{o}C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 % ➔ ako RASTVORA postane plava/ljubičasta, treba sprovesti prilagođene kontrole usmrćivanjem vodom	30 mg + 300 µl MTT RASTVORA 1 mg/ml tokom 180 ± 15 min na 37 ± 2 ^{o}C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 % ➔ ako RASTVORA postane plava/ljubičasta, treba sprovesti prilagođene kontrole usmrćivanjem

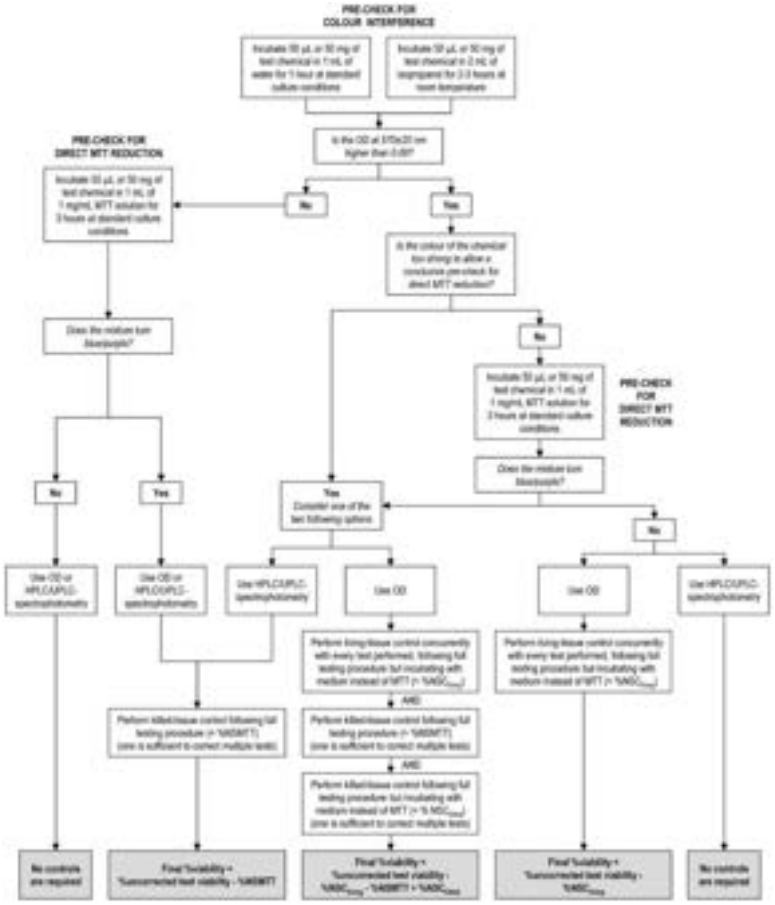
	(kao negativna kontrola upotrebljava se 50 µl sterilne deionizirane vode u rastvorini MTT-a)	(kao negativna kontrola upotrebljava se 50 µl sterilne deionizirane vode u rastvorini MTT-a)	(kao negativna kontrola upotrebljava se 30 µl sterilne deionizirane vode u rastvorini MTT-a)	vodom (kao negativna kontrola upotrebljava se 30 µl sterilne deionizirane vode u rastvorini MTT-a)
Prethodna obrada	20 µl DPBS-a bez Ca^{2+}/Mg^{2+} tokom 30 ± 2 min na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %, zaštićeno od svjetla	20 µl DPBS-a bez Ca^{2+}/Mg^{2+} tokom 30 ± 2 min na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %, zaštićeno od svjetla	–	–
Doze za tretiranje i primjena	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) upotrebom kalibriranog alata (npr. žlica kalibrirana tako da sadrži 50 mg natrijuma hlorida kada je vrhom puna)	10 µl DPBS-a bez Ca^{2+}/Mg^{2+} + 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) Za viskozne hemikalije upotrijebiti najlonsku mrežu	30 µl DPBS-a bez Ca^{2+}/Mg^{2+} + 30 ± 2 mg (60 mg/cm_2)
Vrijeme i temperatura izloženosti	30 min (± 2 min) u medijumu za uzgoj kulture na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %	6 sati (± 0,25 sati) u medijumu za uzgoj kulture na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %	30 min (± 2 min) u medijumu za uzgoj kulture na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %	4 sata (± 0,1 sat) u medijumu za uzgoj kulture na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %
Ispiranje na sobnoj temperaturi	3 puta u 100 ml DPBS-a bez Ca_{2+}/Mg^{2+}	3 puta u 100 ml DPBS-a bez Ca^{2+}/Mg^{2+}	20 ml DPBS-a bez Ca^{2+}/Mg^{2+}	25 ml DPBS-a bez Ca^{2+}/Mg^{2+}
Uranjanje nakon izlaganja	12 min (± 2 min) na sobnoj	25 min (± 2 min) na sobnoj	30 min (± 2 min) na 37 °C,	30 min (± 2 min) na sobnoj

	temp. u medijumu za uzgoj kulture	temp. u medijumu za uzgoj kulture	5 % CO_2, relativna vlažnost od 95 % u medijumu za uzgoj kulture	temp. u medijumu za uzgoj kulture
Inkubacija nakon izlaganja	120 min (± 15 min) u medijumu za uzgoj kulture na 37 ± 2 ^oC, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %	18 h (± 0,25 h) u medijumu za uzgoj kulture na 37 ± 2 ^oC, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %	nema	18 h (± 0,5 h) u medijumu za uzgoj kulture na 37 ± 2 ^oC, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %
Negativna kontrola	50 µl H_2O Ispitano istovremeno	50 µl H_2O Ispitano istovremeno	30 ± 2 µl DPBS-a bez Ca^{2+}/Mg^{2+} Ispitano istovremeno	30 ± 2 µl DPBS-a bez Ca^{2+}/Mg^{2+} Ispitano istovremeno
Pozitivna kontrola	50 µl metilacetata Ispitano istovremeno	50 µl metilacetata Ispitano istovremeno	30 ± 2 µl metilacetata Ispitano istovremeno	30 ± 2 µl metilacetata Ispitano istovremeno
RASTVORA MTT-a	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Vrijeme i temperatura inkubacije MTT-a	180 min (± 15 min) na 37 ± 2 ^oC, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %	180 min (± 15 min) na 37 ± 2 ^oC, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %	180 min (± 15 min) na 37 ± 2 ^oC, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %	180 min (± 15 min) na 37 ± 2 ^oC, 5 ± 1 % CO_2, relativna vlažnost ≥ 95 %
Ekstrakcijsko rastvarač	2 ml izopropanola (ekstrakcija s vrha i dna umetka bušenjem tkiva)	2 ml izopropanola (ekstrakcija s dna umetka bušenjem tkiva)	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija s vrha i dna umetka)	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija s dna umetka)
Vrijeme i temperatura ekstrakcije	2–3 h uz protresanje (~ 120 o/min) na sobnoj temp. ili	2–3 h uz protresanje (~ 120 o/min) na sobnoj temp. ili	4 h uz protresanje (~ 120 o/min) na sobnoj temp. ili	Najmanje 2 h uz protresanje (~ 120 o/min)

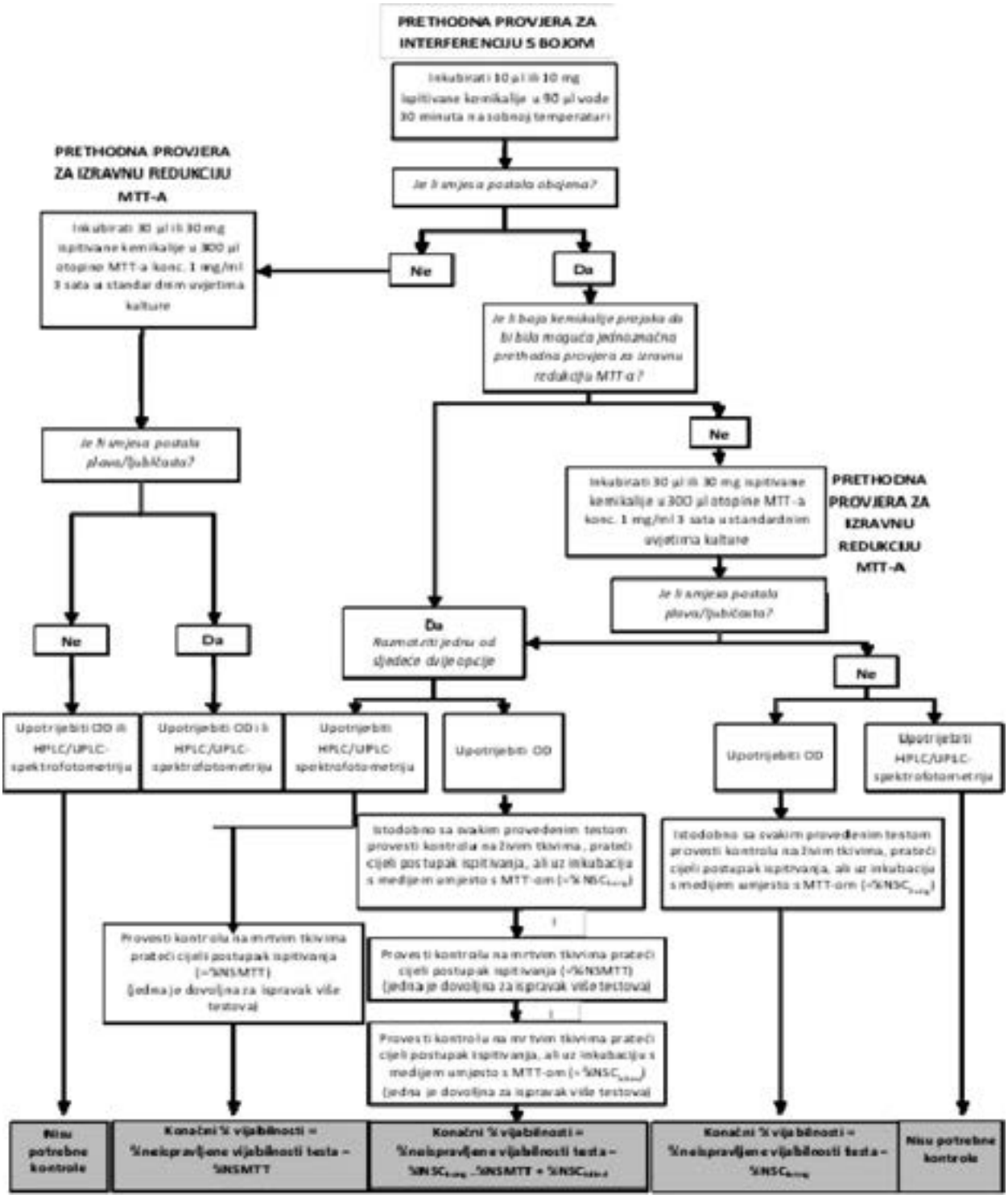
	preko noći na 4–10 °C	preko noći na 4–10 °C	barem preko noći bez protresanja na 4–10 °C	na sobnoj temp.
Očitavanje optičke gustine	570 nm (550–590 nm) bez referentnog filtra	570 nm (550–590 nm) bez referentnog filtra	570 nm (540–600 nm) bez referentnog filtra	570 nm (540–600 nm) bez referentnog filtra
Kontrola kvalitete tkiva	Tretiranje sa 100 µl 0,3-postotnog (v/v) Tritona X-100 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Tretiranje sa 100 µl 0,3-postotnog (v/v) Tritona X-100 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	tretiranje SDS-om 30 min (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	tretiranje SDS-om 30 min (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml
Kriterijumi prihvatljivosti	1. Srednja optička gustina ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom trebala bi biti > 0,8 i < 2,5. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli na 30 min, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti < 50 %. 3. Razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva trebala bi biti manja od	1. Srednja optička gustina ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom trebala bi biti > 0,8 i < 2,5. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli na šest sati, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti < 50 %. 3. Razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva trebala bi biti	1. Srednja optička gustina ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom trebala bi biti > 1,0 i ≤ 2,5. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli na 30 min, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti ≤ 30 %. 3. Razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva trebala bi biti manja od	1. Srednja optička gustina ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom trebala bi biti > 1,0 i ≤ 2,5. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli na četiri sata, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti ≤ 20 %. 3. Razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva trebala bi biti

	20 %.	manja od 20 %.	20 %.	manja od 20 %.

Dodatak 3. **ILUSTRATIVNI DIJAGRAM TOKA KOJI DAJE SMJERNICE O TOME KAKO UTVRDITI HEMIKALIJE KOJE DIREKTNO REDUKUJU MTT I/ILI HEMIKALIJE KOJE INTERFERIRAJU S BOJOM TE KAKO S NJIMA POSTUPATI, NA OSNOVU STANDARDNIH OPERATIVNIH POSTUPAKA ZA VRM1**



Dodatak 4. **ILUSTRATIVNI DIJAGRAM TOKA KOJI DAJE SMJERNICE O TOME KAKO UTVRDITI HEMIKALIJE KOJE DIREKTNO REDUKUJU MTT I/ILI HEMIKALIJE KOJE INTERFERIRAJU S BOJOM TE KAKO S NJIMA POSTUPATI, NA OSNOVU STANDARDNIH OPERATIVNIH POSTUPAKA ZA VRM2**



***Dodatak 5.*KLJUČNI PARAMETRI I KRITERIJUMI PRIHVATLJIVOSTI ZA KVALIFIKACIJU SISTEMA HPLC/UPLC SPEKTROFOTOMETRIJE ZA MJERENJE MTT FORMAZANA EKSTRAHIRANOG IZ MODELA TKIVA RHCE**

Parametar	Protokol	Kriterijumi

	izveden iz smjernica Uprave za hranu i lijekove (FDA) (36. i 38.)	prihvatljivosti
Selektivnost	Analiza izopropanola, slijepe probe na živom tkivu (ekstrakt izopropanola iz modela živih tkiva RhCE bez ikakve obrade), slijepe probe na mrtvom tkivu (ekstrakt izopropanola iz modela mrtvih tkiva RhCE bez ikakve obrade) i boje (npr. metilensko plavilo)	$Površina_{interference}$ ≤ 20 % $površine_{LLOQ}$
Preciznost	Kontrole kvalitete (tj. MTT formazan pri 1,6 µg/ml, 16 µg/ml i 160 µg/ml) u izopropanolu (n = 5)	CV ≤ 15 % ili ≤ 20 % za LLOQ
Tačnost	Kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 5)	%Dev ≤ 15 % ili ≤ 20 % za LLOQ

Efekat matrice	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 5)	85 % ≤ % efekta matrice ≤ 115 %
Prijenos	Analiza izopropanola nakon standardnog ULOQ	$Površina_{interference}$ ≤ 20 % $površine_{LLOQ}$
Obnovljivost (u danu)	3 nezavisne kalibracijske krive (na osnovu šest uzastopnih razrjeđivanja 1/3 MTT formazana u izopropanolu, počevši s ULOQ-om, tj. 200 µg/ml) Kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 5)	Kalibracijske krive: %Dev ≤ 15 % ili ≤ 20 % za LLOQ Kontrole kvalitete: %Dev ≤ 15 % i CV ≤ 15 %
Obnovljivost (među danima)	Prvi dan: 1 kalibraciona kriva i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3) Drugi dan: 1 kalibraciona kriva i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3) Treći dan: 1 kalibraciona kriva i kontrole	

	kvalitete u izopropanolu (n = 3)	
Kratkoročna stabilnost MTT formazana u ekstraktu tkiva RhCE	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 3) analizirane na dan pripreme i nakon 24 sata skladištenja na sobnoj temperaturi	%Dev ≤ 15 %
Dugoročna stabilnost MTT formazana u ekstraktu tkiva RhCE, ako je potrebno	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 3) analizirane na dan pripreme i nakon nekoliko dana skladištenja na –20 °C	%Dev ≤ 15 %

B.70. *IN VITRO* TESTOVI LJUDSKOG REKOMBINANTNOG ESTROGENSKOG RECEPTORA (hrER) ZA OTKRIVANJE HEMIKALIJA S AFINITETOM VEZIVANJA NA ESTROGENSKI RECEPTOR

OPŠTI UVOD

OECD-ova smjernica za ispitivanje koja se zasniva na uspješnosti

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 493 (TG) (2015.). Smjernica za ispitivanje 493 jest smjernica za ispitivanje koja se zasniva na uspješnosti (PBTG), u kojoj se opisuje metodologija za *in vitro* testove ljudske rekombinante za otkrivanje supstance s afinitetom vezivanja na estrogenske receptore (testovi vezivanja na hrER). Sastoji se od dva mehanicistički i funkcionalno slična testa za identifikaciju hemikalija koje se vežu na estrogenske receptore (tj. ERα) i trebala bi olakšati razvoj novih sličnih ili izmijenjenih testova u skladu s načelima za validaciju utvrđenima u Vodiču OECD-a o validaciji i međunarodnom prihvata novih ili ažuriranih ispitnih metoda za procjenu opasnosti (1.). Potpuno validirane

referentne ispitne metode (Dodatak 2. i Dodatak 3.) koje čine osnovu ove smjernice za ispitivanje koja se zasniva na uspješnosti uključuju:

—Freyberger-Wilsonov (FW) *in vitro* test vezivanja na estrogenske receptore (ER) upotrebom cijelog ljudskog rekombinantnog receptora ERα (2.), i

—*in vitro* test vezivanja na estrogenski receptor upotrebom ljudskog rekombinantnog proteina domene vezivanja liganda koji je razvio CERI (Institut za procjenu i istraživanje hemikalija) (2.).

Dostupni su zahtjevi izvođenja (PS) (3.) za lakši razvoj i validaciju sličnih ispitnih metoda za istu krajnju tačku opasnosti te omogućivanje pravovremene izmjene PBTG-a 493 kako bi se novi slični testovi mogli dodati u ažurirani PBTG. Međutim, slični testovi dodat će se samo nakon što ih OECD pregleda i složi se da su ispunjeni zahtjevi izvođenja. Testovi uključeni u Smjernicu za ispitivanje 493 mogu se upotrebljavati neselektivno za ispunjavanje zahtjeva zemalja članica OECD-a u pogledu rezultata ispitivanja vezivanja na estrogenske receptore, uz ostvarivanje koristi od OECD-ova uzajamnog prihvaćanja podataka.

Kontekst i načela testova uključenih u ovu ispitnu metodu

OECD je 1998. pokrenuo aktivnost visokog prioriteta u cilju revizije postojećih i razvoja novih smjernica za ispitivanje za izbor i ispitivanje potencijalnih endokrino disruptivnih hemikalija. OECD-ov konceptualni okvir (CF) za ispitivanje i procjenu potencijalnih endokrino disruptivnih hemikalija revidiran je 2012. Izvorni i revidirani konceptualni okvir uključeni su kao prilozi Vodiču o standardiziranim smjernicama za ispitivanje za ocjenu hemikalija u pogledu endokrine disrupcije (4.). Konceptualni okvir sastoji se od pet nivoa, a svaka nivoa odgovara različitoj nivou biološke složenosti. Testovi vezivanja na estrogenske receptore opisani u ovoj ispitnoj metodi testovi su 2. nivoa, koja uključuje „*in vitro* testove koji pružaju podatke o odabranim endokrinim mehanizmima/putovima". Ova je ispitna metoda namijenjena za *in vitro* testove vezivanja na receptor osmišljene za identifikaciju liganda na ljudski estrogenski receptor alfa (ERα).

Relevantnost *in vitro* testa vezivanja na estrogenske receptore za biološke funkcije jasno je dokazana. Testovi vezivanja na estrogenski receptor osmišljeni su za utvrđivanje hemikalija koje potencijalno mogu ometati hormonski put estrogena te su se u posljednja dva desetljeća često upotrebljavali za opisivanje distribucije estrogenskog receptora u tkivu i za utvrđivanje agonista/antagonista estrogenskog receptora. Tim se testovima oponaša interakcija liganda i receptora koja čini početni korak estrogenskog signalnog puta i ključna je za reproduktivnu funkciju svih kralježnjaka.

Interakcija estrogena i estrogenskog receptora može uticati na transkripciju gena koje sastojci estrogen i indukovati negenomske efekte, a to može dovesti do indukcije ili inhibicije ćelijskih procesa, među ostalim i onih koji su potrebni za proliferaciju ćelija, uobičajeni fetalni razvoj i reproduktivnu funkciju (5., 6. i 7.). Poremećaj uobičajenih estrogenskih sistema potencijalno može uzrokovati štetne efekte na uobičajeni razvoj (ontogeneza), reproduktivno zdravlje i integritet reproduktivnog sistema. Neispravno signaliziranje estrogenskog receptora može dovesti do efekata kao što su povećani rizik od karcinoma koji ovise o hormonima, smanjenje plodnosti te promjene fetalnog rasta i razvoja (8.).

In vitro testovi vezivanja baziraju se na direktnoj interakciji supstance sa specifičnim mjestom vezivanja liganda na receptor koje reguliše transkripciju gena. Ključni element testa vezivanja na ljudski rekombinantni estrogenski receptor alfa (hrERα) mjeri sposobnost radioaktivno obilježenog liganda ([^{3}H]17β-estradiol) da se veže na estrogenski receptor u prisutnosti povećavajućih koncentracija ispitivane hemikalije (tj. konkurenata). Ispitivane hemikalije koje imaju velik afinitet za estrogenski receptor natječu se s radioaktivno obilježenim ligandom pri nižoj koncentraciji u odnosu na hemikalije s manjim afinitetom za taj receptor. Ovaj se test

sastoji od dva glavna elementa: eksperimenta vezivanja do zasićenja kako bi se opisali parametri interakcije receptora i liganda i evidentirala specifičnost estrogenskog receptora, nakon čega slijedi eksperiment konkurentskog vezivanja u kojem se ispitivana hemikalija i radioaktivno obilježeni ligand natječu u vezivanju na estrogenski receptor.
Validacione studije CERI-jevog i FW testa vezivanja pokazale su njihovu relevantnost i pouzdanost za predviđenu svrhu (2.).
Definicije i skraćenice upotrijebljene u ovoj ispitnoj metodi opisuju se u Dodatku 1.

Područje primjene testova vezivanja na receptore i ograničenja povezana s njima

Ovi se testovi predlažu u svrhu izbora i utvrđivanja prioriteta, ali u njima se mogu dobiti i informacije za početni molekularni događaj (MIE) koje se mogu upotrijebiti u pristupu snage dokaza. Testovima se ispituje hemijsko vezivanje na domenu vezivanja liganda receptora ERα u *in vitro* sistemu. Stoga rezultate ne bi trebalo direktno ekstrapolisati na signalizaciju kompleksa i regulaciju netaknutog endokrinog sistema *in vivo*.
Vezivanje prirodnog liganda, 17β-estradiola, početni je korak u nizu molekularnih događaja koji aktivira transkripciju ciljnih gena i naposljetku kulminira fiziološkom promjenom (9.). Stoga se vezivanje na domenu vezivanja liganda receptora ERα smatra jednim od ključnih mehanizama endokrine disrupcije posredovane estrogenskim receptorom, iako postoje i drugi mehanizmi preko kojih može doći do endokrine disrupcije, uključujući: i. interakcije s mjestima na receptoru ERα koja nisu džep za vezivanje liganda; ii. interakcije s ostalim receptorima relevantnima za signaliziranje estrogena, receptorom ERβ i estrogenskim receptorom spregnutim s G-proteinima, ostalim receptorima i enzimskim sistemima u endokrinom sistemu; iii. sintezu hormona; iv. metaboličku aktivaciju i/ili inaktivaciju hormona; v. distribuciju hormona u ciljna tkiva i vi. uklanjanje hormona iz tijela. Nijedan test u okviru ove ispitne metode ne bavi se tim načinima djelovanja.
Ovom ispitnom metodom ispituje se sposobnost supstanci da se vežu na ljudski receptor ERα i njome se ne razlikuju agonisti i antagonisti receptora ERα. Test se ne bavi daljim događajima kao što su transkripcija gena ili fiziološke promjene. Budući da su se u validaciji upotrebljavale samo pojedinačne supstance s jednim sastojkom, nije se razmatrala primjenjivost za ispitivanje smjesa. Uprkos tome, testovi su u teoriji primjenjivi i za ispitivanje supstance s više sastojaka i smjesa. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smješi radi dobijanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smješe.
Sistemi receptora koji ne sadržiju ćelije nemaju intrinzičnu metaboličku sposobnost i nisu validirani u kombinaciji s metaboličkim enzimskim sistemima. Međutim, metabolička aktivnost možda se može uključiti u plan istraživanja, ali za to bi bila potrebna dodatna validacija.
Hemikalije koje mogu denaturirati protein (tj. protein receptora), kao što su površinski aktivne supstance ili hemikalije koje mogu promijeniti pH-vrijednost testnog pufera, ne mogu se ispitati ili se mogu ispitati samo pri koncentracijama kod kojih nema tih interakcija. Osim toga, raspon koncentracija koji se može ispitati u testovima za ispitivanu hemikaliju ograničen je njenom topljivošću u testnom puferu.
U informativne svrhe u tabeli 1. navedeni su rezultati ispitivanja za 24 supstance koje su ispitane u oba potpuno validirana testa opisana u ovoj ispitnoj metodi. Na osnovu objavljenih izvještaja, od tih supstanci 17 ih je klasifikovano kao hemikalije koje se vežu na estrogenski receptor, a šest kao hemikalije koje se ne vežu, uključujući *in vitro* testove za transkripcionu aktivaciju estrogenskog receptora i/ili uterotrofni test (9., 10., 11., 12., 13., 14. i 15.). S obzirom na podatke sažete u tabeli 1., postojala je gotovo 100-postotna podudarnost između dva testa u vezi s klasifikovanjem svih supstanci do 10^{-4} M i svaka je supstanca tačno klasifikovana kao hemikalija koja se veže ili ne veže na estrogenske receptore. Dodatne informacije o ovoj grupi

supstanci i o dodatnim supstancama koje su ispitane u testovima vezivanja na estrogenske receptore tokom validacijskih studija navedene su u zahtjevima izvođenja za test vezivanja na hrER (3.), Dodatak 2. (tabele 1., 2. i 3.).

***Tabela 1.*Klasifikovanje supstance kao hemikalija koje se vežu ili ne vežu na estrogenske receptore kada se ispituju u FW i CERI-jevom testu vezivanja na hrER**

	Naziv supstance	**CAS br.**	**Predviđeni odgovor**	**FW test**		**CERI-jev test**		**Hemijski klasa prema MESH-u**	**Klasa proizvoda**
				Raspon konc. (M)	**Klasifikovanje**	**Raspon konc. (M)**	**Klasifikovanje**		
1	17β-estradiol	50-28-2	*Hemikalija koja se veže*	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Hemikalija koja se veže	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Hemikalija koja se veže	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
2	Noretinodrel	68-23-5	*Hemikalija koja se veže*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Hemikalija koja se veže	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Hemikalija koja se veže	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
3	Noretindron	68-22-4	*Hemikalija koja se veže*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Hemikalija koja se veže	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Hemikalija koja se veže	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
4	Di-n-butil-ftalat	84-74-2	*Hemikalija koja se ne veže*	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Hemikalija koja se ne veže	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Hemikalija koja se ne veže	Ugljovodonik (ciklički), ester	Plastifikator, hemijski međuproizvod
5	DES	56-53	*Hemikalija*	$1 \times 10^{-$	Hemikalija koja se	$1 \times 10^{-$	Hemikalija koja se	Ugljovodonik	Farmaceutski

		1	*koja se veže*	10^{-10} – 1 × 10^{-3}	veže	10^{-10} – 1 × 10^{-3}	veže	(ciklički), fenol	proizvod, veterinarski proizvod
6	17α-etinilestradiol	57-63-6	*Hemikalija koja se veže*	1 × 10^{-10} – 1 × 10^{-3}	Hemikalija koja se veže	1 × 10^{-10} – 1 × 10^{-3}	Hemikalija koja se veže	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
7	Mezo-heksestrol	84-16-2	*Hemikalija koja se veže*	1 × 10^{-10} – 1 × 10^{-3}	Hemikalija koja se veže	1 × 10^{-10} – 1 × 10^{-3}	Hemikalija koja se veže	Ugljovodonik (ciklički), fenol	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
8	Genistein	446-72-0	*Hemikalija koja se veže*	1 × 10^{-10} – 1 × 10^{-3}	Hemikalija koja se veže	1 × 10^{-10} – 1 × 10^{-3}	Hemikalija koja se veže	Ugljovodonik (heterocikl.), flavonoid	Prirodni proizvod
9	Ekvuol	531-95-3	*Hemikalija koja se veže*	1 × 10^{-10} – 1 × 10^{-3}	Hemikalija koja se veže	1 × 10^{-10} – 1 × 10^{-3}	Hemikalija koja se veže	Metabolit fitoestrogena	Prirodni proizvod
10	Butil paraben (*n* butil-4-hidroksibenzoat)	94-26-8	*Hemikalija koja se veže*	1 × 10^{-10} – 1 × 10^{-3}	Hemikalija koja se veže	1 × 10^{-10} – 1 × 10^{-3}	Hemikalija koja se veže	Paraben	Konzervans
11	Nonilfenol (smjesa)	84852-15-3	*Hemikalija koja se veže*	1 × 10^{-10} – 1 × 10^{-3}	Hemikalija koja se veže	1 × 10^{-10} – 1 × 10^{-3}	Hemikalija koja se veže	Alkilfenol	Međujedinjenje
12	o,p'-DDT	789-02-	*Hemikalija*	1 × 10^{-10}	Hemikalija koja se	1 × 10^{-10}	Hemikalija koja se	Organohlor	Insekticid

		6	*koja se veže*	10^{-10} – 1 × 10^{-3}	veže	10^{-10} – 1 × 10^{-3}	veže		
13	Kortikosteron	50-22-6	*Hemikalija koja se ne veže (*[5])*	1 × 10^{-10} – 1 × 10^{-4}	Hemikalija koja se ne veže	1 × 10^{-10} – 1 × 10^{-4}	Hemikalija koja se ne veže	Steroid	Prirodni proizvod
14	Zearalenon	17924-92-4	*Hemikalija koja se veže*	1 × 10^{-10} – 1 × 10^{-3}	Hemikalija koja se veže	1 × 10^{-10} – 1 × 10^{-3}	Hemikalija koja se veže	Ugljovodonik (heterocikl.), lakton	Prirodni proizvod
15	Tamoksifen	10540-29-1	*Hemikalija koja se veže*	1 × 10^{-10} – 1 × 10^{-3}	Hemikalija koja se veže	1 × 10^{-10} – 1 × 10^{-3}	Hemikalija koja se veže	Ugljovodonik (ciklički)	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
16	5α-dihidrotestosteron	521-18-6	*Hemikalija koja se veže*	1 × 10^{-10} – 1 × 10^{-3}	Hemikalija koja se veže	1 × 10^{-10} – 1 × 10^{-3}	Hemikalija koja se veže	Steroid, nefenoloni	Prirodni proizvod
17	Bisfenol A	80-05-7	*Hemikalija koja se veže*	1 × 10^{-10} – 1 × 10^{-3}	Hemikalija koja se veže	1 × 10^{-10} – 1 × 10^{-3}	Hemikalija koja se veže	Fenol	Hemijski međuproizvod
18	4-*n*-heptilfenol	1987-50-4	*Hemikalija koja se veže*	1 × 10^{-10} – 1 × 10^{-3}	Daje dvosmislen odgovor ([6])	1 × 10^{-10} – 1 × 10^{-3}	Hemikalija koja se veže	Alkilfenol	Međuproizvod
19	Kepon (hlordekon)	143-50-0	*Hemikalija koja se*	1 × 10^{-10} – 1 ×	Hemikalija koja se veže	1 × 10^{-10} – 1 ×	Hemikalija koja se veže	Ugljovodonik (halogenirani)	Pesticid

			veže	0^{-3}		0^{-3}			
20	Benz(a)antracen	56-55-3	*Hemikalija koja se ne veže*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Hemikalija koja se ne veže ([7])	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Hemikalija koja se ne veže ([7])	Aromatični ugljovodonik	Međuproizvod
21	Enterolakton	78473-71-9	*Hemikalija koja se veže*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Hemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Hemikalija koja se veže	Fitoestrogen	Prirodni proizvod
22	Progesteron	57-83-0	*Hemikalija koja se ne veže ([*5])*	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Hemikalija koja se ne veže	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Hemikalija koja se ne veže	Steroid	Prirodni proizvod
23	Oktil-trietoksisilan	2943-75-1	*Hemikalija koja se ne veže*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Hemikalija koja se ne veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Hemikalija koja se ne veže	Silan	Modifikator površine
24	Atrazin	1912-24-9	*Hemikalija koja se ne veže ([*5])*	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Hemikalija koja se ne veže	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Hemikalija koja se ne veže	Heterociklično jedinjenje	Herbicid

SASTOJCI TESTA VEZIVANJA NA hrER

Ključne sastojci testa

Ova se ispitna metoda primjenjuje na testove u kojima se upotrebljava estrogenski receptor i primjereno snažan ligand na receptor koji se može upotrijebiti kao marker/obilježivač za test i koji se može istisnuti s povećavajućim koncentracijama ispitivane hemikalije. Testovi vezivanja sadržiju sljedeće dvije glavne sastojci: 1. vezivanje do zasićenja i 2. konkurentsko vezivanje. Test vezivanja do zasićenja upotrebljava se za potvrdu specifičnosti i aktivnosti pripreme receptora, dok se eksperiment konkurentskog vezivanja upotrebljava za procjenu sposobnosti ispitivane hemikalije da se veže na receptor hrER.

Kontrole

Treba opisati osnovu za predloženi istodobni referentni estrogen i kontrole. Istovremene kontrole (rastvarač (nosač), pozitivne kontrole (hemikalija koja se veže na estrogenski receptor; snažan i slab afinitet), negativne kontrole (hemikalija koja se ne veže)), prema potrebi, znak su da test djeluje u ispitnim uslovima i osnova su za poređenje između eksperimenta; obično su dio kriterijuma prihvatljivosti za određeni eksperiment (1.). Na jednoj ploči tokom svakog ciklusa treba upotrijebiti cijelu krivu koncentracija referentnog estrogena i kontrola (tj. hemikalije koja se slabo veže i koja se ne veže). Sve ostale ploče trebaju da sadrži: 1. visoku (približno potpuno istiskivanje radioaktivno obilježenog liganda) i srednju (približno IC_{50}) koncentraciju E2 i hemikalije koja se slabo veže u tri ponavljanja; 2. kontrolu s rastvaračem i nespecifično vezivanje, svako u tri ponavljanja.

Standardni postupci kontrole kvalitete

Treba sprovesti standardne postupke kontrole kvalitete kako je opisano za svaki test da bi se osigurala stabilnost aktivnih receptora, tačne koncentracije hemikalija i održavanja granica tolerancije kroz više ponavljanja i zadržala sposobnost pružanja očekivanih odgovora vezivanja na estrogenske receptore tokom vremena.

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija

Prije ispitivanja nepoznatih hemikalija primjenom bilo kojeg od testova u okviru ove ispitne metode, svaki laboratorij treba dokazati osposobljenost za primjenu testa sprovođenjem testova zasićenja kako bi se potvrdile specifičnost i aktivnost smješa estrogenskog receptora te testova konkurentskog vezivanja s referentnim estrogenom i kontrolama (hemikalije koje se slabo vežu i koje se ne vežu). Laboratorij treba uspostaviti bazu prošlih podataka s rezultatima za referentni estrogen i kontrole nastale u 3–5 nezavisnih eksperimenta provedenih na različite dane. Ti će eksperimenti biti osnova za referentni estrogen i prošle kontrole za laboratorij te će se upotrebljavati kao djelomična ocjena prihvatljivosti testa za buduće cikluse.
Osjetljivost ispitnog sistema potvrdit će se i ispitivanjem supstance za dokazivanje osposobljenosti navedenih u tabeli 2. Lista supstance za dokazivanje osposobljenosti podskup je referentnih supstance koje su navedene u zahtjevima izvođenja za testove vezivanja na estrogenske receptore (3.). Te su supstance komercijalno dostupne, čine klase hemikalija koji se obično povezuju s aktivnošću vezivanja na estrogenski receptor, pokazuju primjeren raspon jakosti koji se očekuje za hemikalije koje se vežu (tj. slabe do jake) i koje se ne vežu na estrogenski receptor (tj. negativne). Ispitane koncentracije svake supstance za dokazivanje osposobljenosti trebaju obuhvatati raspon naveden u tabeli 2. Za svaku supstancu treba sprovesti najmanje tri eksperimenta i rezultati trebaju biti u skladu s očekivanom aktivnošću hemikalije. Svaki eksperiment treba sprovesti neu zavisnosti (tj. sa svježim razrjeđivanjima receptora, hemikalija i reagensa), s tri ponavljanja za svaku koncentraciju. Osposobljenost se dokazuje tačnim klasifikovanjem (pozitivno/negativno) svake supstance za dokazivanje osposobljenosti. Pri učenju testova svaki tehničar treba sprovesti ispitivanje osposobljenosti.

Tabela 2. Lista kontrola i supstance za dokazivanje osposobljenosti za testove konkurentskog vezivanja na hrER

Br.	Naziv supstance	CAS br.	Predviđeni odgovor	Raspon ispitne koncentracije (M)	Hemijski klasa prema MeSH-u	Klasa proizvoda
Kontrole (referentni estrogen, hemikalija koja se slabo veže, hemikalija koja se ne						

veže)						
1	17β-estradiol	50-28-2	Hemikalija koja se veže	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
2	Noretinodrel (ili) noretindron	68-23-5 (ili) 68-22-4	Hemikalija koja se veže	3×10^{-9} – 30×10^{-6}	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
3	Oktil-trietoksisilan	2943-75-1	Hemikalija koja se ne veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Silan	Modifikator površine
Supstance za dokazivanje osposobljenosti						
4	Dietilstilbestrol	56-53-1	Hemikalija koja se veže	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Ugljovodonik (ciklički), fenol	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
5	17α-etinilestradiol	57-63-6	Hemikalija koja se veže	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
6	Mezo-heksestrol	84-16-2	Hemikalija koja se veže	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Ugljovodonik (ciklički), fenol	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
7	Tamoksifen	10540-29-1	Hemikalija koja se veže	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Ugljovodonik (ciklički)	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
8	Genistein	446-72-0	Hemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Heterociklično jedinjenje, flavonoid	Prirodni proizvod
9	Bisfenol A	80-05-7	Hemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Fenol	Hemijski međuproizvod

10	Zearalenon	17924-92-4	Hemikalija koja se veže	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Heterociklično jedinjenje, lakton	Prirodni proizvod
11	Butil paraben	94-26-8	Hemikalija koja se veže	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Karboksilna kiselina, fenol	Konzervans
12	Atrazin	1912-24-9	Hemikalija koja se ne veže	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Heterociklično jedinjenje	Herbicid
13	Di-*n*-butil-ftalat (DBP)	84-74-2	Hemikalija koja se ne veže	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Ugljovodonik (ciklički), ester	Plastifikator, hemijski međuproizvod
14	Kortikosteron	50-22-6	Hemikalija koja se ne veže	1×10^{-11} – 1×10^{-4}	Steroid	Prirodni proizvod

Ispitivanje rastvorljivosti i utvrđivanje raspona koncentracija za ispitivane hemikalije

Treba sprovesti preliminarno ispitivanje kako bi se utvrdila granica rastvorljivosti za svaku ispitivanu hemikaliju i utvrdio primjereni raspon koncentracija za upotrebu u testu. Granicu rastvorljivosti svake ispitivane hemikalije prvo treba utvrditi u rastvraču i zatim potvrditi u uslovima testa. Konačna koncentracija ispitana u testu ne bi trebala biti veća od 1 mM. Ispitivanje za utvrđivanje raspona sastoji se od kontrole s rastvaračem i osam log-serijskih razrjeđivanja, počevši od najveće prihvatljive koncentracije (npr. 1 mM ili manje, na osnovu granice rastvorljivosti) i uočene prisutnosti zamućenja ili taloga. Koncentracije u drugom i trećem eksperimentu po potrebi treba prilagoditi kako bi se bolje opisala kriva koncentracija – odgovor.

Kriterijumi prihvatljivosti ciklusa ispitivanja

Prihvatanje ili odbijanje ciklusa ispitivanja zasniva se na procjeni rezultata dobijanje za referentni estrogen i kontrolu koji se koriste za svaki eksperiment. Prvo, kod ploče 1 cijele krive koncentracija referentne kontrole iz svakog eksperimenta trebaju zadovoljiti mjerila uspješnosti s pomoću parametara prilagođene krive (npr. IC_{50} i Hillov nagib) na osnovu rezultata navedenih za odgovarajuće protokole za CERI-jev i FW test (dodaci 2. i 3.) i prošlih kontrolnih podataka laboratorija koji sprovodi test. Sve kontrole (referentni estrogen, hemikalija koja se slabo veže i hemikalija koja se ne veže) treba tačno klasifikovati za svaki eksperiment. Kontrole na svim kasnijim pločama zatim treba procijeniti u pogledu dosljednosti s pločom 1. Treba upotrijebiti dovoljan raspon koncentracija ispitivane hemikalije kako bi se jasno utvrdio vrh krive konkurentskog vezivanja. Varijabilnost među ponavljanjima pri svakoj koncentraciji ispitivane hemikalije te među tri nezavisna ciklusa treba biti razumna i naučno opravdana. Sposobnost dosljedne primjene testa treba dokazati razvojem i održavanjem baze prošlih podataka za referentni estrogen i kontrole. Kao mjera obnovljivosti unutar jedne laboratorije mogu se koristiti

standardne devijacije (SD) ili koeficijenti varijacije (CV) za srednje vrijednosti parametara prilagođavanja kriva referentnog estrogena i kontrolne hemikalije koja se slabo veže. Pri pregledu rezultata kontrole na ploči iz svakog ciklusa te za svaku ispitivanu hemikaliju treba primijeniti stručnu prosudbu.

Osim toga, treba ispuniti sljedeća načela u pogledu kriterijuma prihvatljivosti:

—podaci bi trebali biti dovoljni za kvantitativnu procjenu vezivanja na estrogenske receptore,

—ispitane koncentracije trebale bi biti unutar područja rastvorljivosti ispitivane hemikalije.

Analiza podataka

Utvrđeni postupak analize podataka o vezivanju do zasićenja i konkurentskom vezivanju treba ispunjavati ključna načela za opis interakcija receptora i liganda. Podaci o vezivanju do zasićenja obično se analiziraju upotrebom modela nelinearne regresije kojim se uzimaju u obzir ukupno i nespecifično vezivanje. Pri utvrđivanju vrijednosti Bmax i Kd možda će biti potreban ispravak potrošnje liganada (npr. Swillens, 1995. (19.)). Podaci iz testova konkurentskog vezivanja obično se transformiraju (npr. postotak specifičnog vezivanja i koncentracija ispitivane hemikalije (log M)). Procjene za log (IC_{50}) za svaku ispitivanu hemikaliju treba utvrditi upotrebom primjerenog softvera za nelinearno prilagođavanje krive kako bi se prilagodila Hillova jednačina s četiri parametra. Nakon početne analize treba izvršiti pregled parametara prilagođene krive i izvršiti vizualni pregled mjere u kojoj podaci o vezivanju odgovaraju izrađenoj krivoj konkurentskog vezivanja. U nekim slučajevima može biti potrebna dodatna analiza kako bi se dobila najbolje prilagođena kriva (npr. ograničavanje vrha i/ili dna krive, upotreba pravila od 10 %; vidjeti Dodatak 4. i literaturu pod 2. (odjeljak III.A.2.)).
Ispunjavanje kriterijuma prihvatljivosti znači da sistem testa pravilno funkcioniše, ali time se ne osigurava da će svaki pojedinačni test dati tačne podatke. Ponavljanje tačnih rezultata prvog testa najbolji je znak toga da su dobijeni tačni podaci.

Opšti kriterijumi za tumačenje podataka

Trenutno ne postoji opšteprihvaćena metoda za tumačenje podataka o vezivanju na estrogenske receptore. Međutim, i kvalitativne (npr. hemikalija koja se veže/ne veže) i/ili kvantitativne (npr. IC_{50}, relativni afinitet vezivanja (RBA) itd.) procjene aktivnosti posredovane hrER-om trebaju se bazirati na empirijskim podacima i valjanoj naučnoj prosudbi.

Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju trebalo bi da sadrži sljedeće informacije:

Test:

— korišteni test.

Kontrolna/referentna/ispitivana hemikalija:

— izvor, broj serije, rok upotrebe, ako su dostupni,

— stabilnost ispitivane hemikalije, ako je poznata,

— rastvorljivost i stabilnost ispitivane hemikalije u rastvraču ako su poznate,

—prema potrebi, mjerenja pH-vrijednosti, osmolalnosti i taloga u medijumu za uzgoj kulture kojem je dodata ispitivana hemikalija.

Supstanca s jednim sastojkom:

— fizički izgled, rastvorljivost u vodi i druga relevantna fizičko-hemijska svojstva,

—hemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.

Supstanca s više sastojaka, UVCB supstance i smješe:

—opis (koliko je to moguće) hemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizičko-hemijskih svojstava sastojaka.

Rastvarač/nosač:

— karakterizacija (priroda, dobavljač i serija),

— obrazloženje za izbor rastvarača/nosača,

—rastvorljivost i stabilnost ispitivane hemikalije u rastvraču/nosaču, ako su poznate.

Receptori:

—izvor receptora (dobavljač, kataloški broj, serija, vrste receptora, koncentracija aktivnih receptora koju je naveo dobavljač, potvrda dobavljača),

— opis receptora (uključujući rezultate vezivanja do zasićenja): Kd, Bmax,

— skladištenje receptora,

— radioaktivno obilježeni ligand,

— dobavljač, kataloški broj, serija, specifična aktivnost.

Ispitni uslovi:

— ograničenja rastvorljivosti u uslovima testa,

— sastav pufera za vezivanje,

— koncentracija receptora,

— koncentracija obilježivača (tj. radioaktivno obilježenog liganda),

— koncentracije ispitivane hemikalije,

— postotak nosača u konačnom testu,

— temperatura i vrijeme inkubacije,

— metoda odvajanja vezanih/slobodnih supstanci,

— pozitivne i negativne kontrole/referentne supstance,

—kriterijumi na osnovu kojih se test smatra pozitivnim, negativnim ili dvosmislenim.

Provjera prihvatljivosti:

—stvarne vrijednosti IC_{50} i vrijednosti Hillova nagiba za istovremene pozitivne kontrole/referentne supstance.

Rezultati:

— neobrađeni podaci i podaci o vezanim/slobodnim supstancama,

— ako je primjereno, provjera radi potvrde denaturiranja,

— ako postoji, najniža efikasna koncentracija (LEC),

— vrijednosti RBA i/ili IC_{50}, ako je primjereno,

— odnos koncentracije i odgovora, ako je moguće,

—statističke analize, ako postoje, i mjera greške i pouzdanosti (npr. SEM, SD, CV interval 95-postotne pouzdanosti) te opis načina na koji se došlo do tih vrijednosti.

Rasprava o rezultatima:

— primjena pravila od 10 %.

Zaključak

***Dodatak 2.*FREYBERGER-WILSONOVI IN VITRO TESTOVI VEZIVANJA NA ESTROGENSKI RECEPTOR (ERA) DO ZASIĆENJA I KONKURENTSKOG VEZIVANJA UPOTREBOM CIJELOG REKOMBINANTNOG RECEPTORA ERA**

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA (VIDJETI I OPŠTI UVOD)

U ovom *in vitro* testu vezivanja na estrogenski receptor (ERα) do zasićenja i konkurentskog vezivanja upotrebljava se cijeli ljudski receptor ERαα(hrERα) koji se proizvodi i izolira iz ćelija kukaca zaraženih bakulovirusom. Protokol koji su razvili Freyberger i Wilson podvrgnut je međunarodnoj validacionoj studiji u više laboratorija (2.) i ona je pokaza njegovu relevantnost i pouzdanost za predviđenu svrhu testa.

Ovaj je test postupak izbora za utvrđivanje supstance koje se mogu vezati na cijeli receptor hrERα. Upotrebljava se za utvrđivanje sposobnosti ispitivanih hemikalija da se natječu sa 17β-estradiolom u vezivanju na hrERα. Kvantitativni rezultati testa mogu uključivati IC_{50} (mjera koncentracije ispitivane hemikalije koja je potrebna da se istisne pola [^{3}H]-17β-estradiola s receptora hrERα) i relativne afinitete vezivanja ispitivanih hemikalija za hrERα u u poređenju sa 17β-estradiolom. U svrhu izbora hemikalija prihvatljivi kvalitativni rezultati testa mogu uključivati klasifikovanja ispitivanih hemikalija kao hemikalija koje se vežu na hrERα, koje se ne vežu ili koje daju dvosmislen odgovor na osnovu kriterijuma opisanih za krive vezivanja.

U testu se upotrebljava radioaktivno obilježeni ligand, što znači da laboratorij mora imati dozvolu za radioaktivne materijale. U svim pokolonama s radioizrastvorima i opasnim hemikalijama treba poštovati propise i postupke kako je opisano u nacionalnom zakonodavstvu.

Prije upotrebe ovog testa u regulatorne svrhe treba pročitati odjeljke „**OPŠTI UVOD**” i „**SASTOJCI TESTA VEZIVANJA NA hrER**”. Definicije i skraćenice upotrijebljene u ovoj Smjernici za ispitivanje navedene su u Dodatku 1.

NAČELA TESTA (VIDJETI I OPŠTI UVOD)

Test vezivanja na hrERα mjeri sposobnost vezivanja radioaktivno obilježenog liganda ([^{3}H]17β-estradiol) na estrogenski receptor u prisutnosti povećavajućih koncentracija ispitivane hemikalije (tj. konkurenta). Ispitivane hemikalije koje imaju velik afinitet za estrogenski receptor natječu se s radioaktivno obilježenim ligandom pri nižoj koncentraciji u odnosu na hemikalije s manjim afinitetom za taj receptor.

Ovaj se test sastoji od dva glavna elementa: eksperimenta vezivanja do zasićenja kako bi se opisali parametri interakcije receptora i liganda, nakon čega slijedi eksperiment konkurentskog vezivanja u kojem se ispitivana hemikalija i radioaktivno obilježeni ligand natječu u vezivanju na estrogenski receptor.

Svrha je eksperimenta vezivanja do zasićenja opisati određenu šaržu receptora u pogledu afiniteta vezivanja i broja u pripravku za eksperiment konkurentskog vezivanja. Eksperimentom vezivanja do zasićenja mjeri se, u uslovima ravnoteže, afinitet fiksne koncentracije estrogenskog receptora za njegov prirodni ligand (koji predstavlja konstanta disocijacije, Kd) i koncentracija aktivnih mjesta na receptorima (Bmax).

Eksperimentom konkurentskog vezivanja mjeri se afinitet supstanci da se s [^{3}H]17β-estradiolom

u vezivanju na estrogenski receptor. Afinitet se kvantificira koncentracijom ispitivane hemikalije koja, u uslovima ravnoteže, inhibira 50 % specifičnog vezivanja [^{3}H]17β-estradiola (koja se naziva „50-postotna inhibitorska koncentracija" ili IC_{50}). To se može procijeniti i upotrebom relativnog afiniteta vezivanja (RBA, u odnosu na IC_{50} estradiola koji je izmjeren zasebno u istom ciklusu). Eksperimentom konkurentskog vezivanja mjeri se vezivanje [^{3}H]17β-estradiola pri fiksnoj koncentraciji u prisutnosti širokog raspona (osam redova veličine) koncentracija ispitivanih hemikalija. Ako je moguće, podaci se zatim prilagođavaju u oblik Hillove jednačine (Hill, 1910.) koja opisuje istiskivanje radioaktivno obilježenog liganda konkurentnom hemikalijom koja se veže na jedno mjesto. Mjera istiskivanja radioaktivno obilježenog estradiola u uslovima ravnoteže upotrebljava se za opis ispitivane hemikalije kao hemikalije koja se veže, koja se ne veže ili koja daje dvosmislen odgovor.

POSTUPAK

Dokazivanje prihvatljivog djelovanja proteina receptora hrERα

Prije rutinske primjene testova vezivanja do zasićenja i konkurentskog vezivanja za svaku novu šaržu receptora hrERα treba dokazati da ispravno djeluju u laboratoriju u kojem će se upotrebljavati. Za dokazivanje uspješnosti treba upotrijebiti proces koji se sastoji od dva koraka. Riječ je o sljedećim koracima:

—sprovođenje testa vezivanja [^{3}H]-17β-estradiola do zasićenja kako bi se dokazali specifičnost i zasićenje receptora hrERα. Nelinearnom regresijskom analizom tih podataka (npr. BioSoft; McPherson, 1985.; Motulsky, 1995.) i kasnijom Scatchardovom krivuljom treba evidentirati afinitet vezivanja [^{3}H]-17β-estradiola na receptor hrERα (Kd) i broj receptora (Bmax) za svaku šaržu receptora hrERα,

—sprovođenje testa konkurentskog vezivanja upotrebom kontrolnih supstanci (referentni estrogen (17β-estradiol)), hemikalije koja se slabo veže (npr. noretinodrel ili noretindron) i hemikalije koja se ne veže (oktil-trietoksisilan, OTES). Svaki laboratorij treba uspostaviti bazu prošlih podataka kako bi evidentirao dosljednost vrijednosti IC_{50} i drugih relevantnih vrijednosti za referentni estrogen i hemikaliju koja se slabo veže između eksperimenta i među različitim šaržama receptora hrERα. Parametri kriva konkurentskog vezivanja za kontrolne supstance trebaju biti unutar ograničenja intervala pouzdanosti od 95 % (vidjeti tabelu 1.) koja su određena na osnovu podataka iz laboratorija koji su učestvovali u validacionoj studiji za ovaj test (2.).

***Tabela 1.*Kriterijumi uspješnosti razvijeni za referentni estrogen i hemikaliju koja se slabo veže, FW test vezivanja na hrER**

Supstanca	Parametar	Srednja vrijednost	Standardna devijacija (n)	Intervali pouzdanosti od95 %	
				Donja granica	Gornja granica
17β-estradiol	Vrh (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Dno (%)	0,29	1,25 (67)	–0,01	0,60

	Hillov nagib	–1,06	0,20 (67)	–1,11	–1,02
	$LogIC_{50}$ (M)	–8,92	0,18 (67)	–8,97	–8,88
Noretinodrel	Vrh (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Dno (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hillov nagib	–1,01	0,38 (68)	–1,10	–0,92
	Log IC_{50} (M)	–6,39	0,27 (68)	–6,46	–6,33
Noretindron[c]	Vrh (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Dno (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hillov nagib	–1,41	0,32 (27)	–1,53	–1,28
	$LogIC_{50}$ (M)	–5,73	0,27 (27)	–5,84	–5,62

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija

Svaki test (zasićenje i konkurentsko vezivanje) treba se sastojati od tri nezavisna ciklusa (tj. sa svježim razrjeđivanjima receptora, hemikalija i reagensa) provedena na različite dane te svaki ciklus treba da sadrži tri ponavljanja.

Utvrđivanje koncentracije receptora (hrERα)

Koncentracija aktivnih receptora malo se razlikuje s obzirom na šaržu i uslove skladištenja. Zato treba utvrditi koncentraciju aktivnih receptora koja je dobijena od dobavljača. Tako će se dobiti primjerena koncentracija aktivnih receptora u trenutku primjene ciklusa.
Nominalne koncentracije od 0,25, 0,5, 0,75 i 1 nM receptora treba inkubirati bez (ukupno vezivanje) i sa (nespecifično vezivanje) 1 µM neobilježenog estradiola u uslovima koji odgovaraju konkurentskom vezivanju (tj. 1 nM [^{3}H]-estradiola). Specifično vezivanje, izračunano kao razlika ukupnog i nespecifičnog vezivanja, grafički se prikazuje u u zavisnostisti o nominalnoj koncentraciji receptora. Koncentracija receptora koja pokaže specifične vrijednosti vezivanja koje odgovaraju 20 % dodane radioaktivne oznake povezana je s odgovarajućom nominalnom koncentracijom receptora i tu koncentraciju receptora treba upotrebljavati za eksperimente vezivanja do zasićenja i konkurentskog vezivanja. Konačna koncentracija receptora hrER od 0,5 nM često će ispunjavati taj uslov.
Ako se kriterij od 20 % ne može ispuniti u više navrata, treba provjeriti plan eksperimenta kako bi se utvrdile potencijalne greške. Neuspjeh u ispunjavanju kriterijuma od 20 % može biti znak toga da u rekombinantnoj šarži ima vrlo malo aktivnih receptora pa treba razmotriti upotrebu druge šarže receptora.

Test zasićenja

Osam povećavajućih koncentracija [^{3}H]17β-estradiola treba procijeniti u tri ponavljanja, u sljedeća tri uslova (vidjeti tabelu 2.):

—bez neobilježenog 17β-estradiola i u prisutnosti estrogenskog receptora. Tako se utvrđuje ukupno vezivanje mjerenjem radioaktivnosti u porculanskim tanjirima sa udubljenjima u kojima se nalazi samo [^{3}H]17β-estradiol,

—u prisutnosti koncentracije neobilježenog 17β-estradiola koja je 1 000 veća od koncentracije obilježenog 17β-estradiola i u prisutnosti estrogenskog receptora. Svrha je ovog uslova zasititi aktivna vezna mjesta neobilježenim 17β-estradiolom te mjerenjem radioaktivnosti u porculanskim tanjirima sa udubljenjima utvrditi nespecifično vezivanje. Sav radioaktivno obilježeni estradiol koji je preostao a koji se može vezati na receptor smatra se vezanim na nespecifično mjesto jer bi neobilježeni estradiol trebao biti prisutan u tako visokoj koncentraciji da se veže na sva dostupna specifična mjesta na receptoru,

—bez neobilježenog 17β-estradiola i bez estrogenskog receptora (utvrđivanje ukupne radioaktivnosti).

Priprema RASTVORA [^{3}H]-17β-estradiola i neobilježenog 17β-estradiola

Razrjeđivanja [^{3}H]-17β-estradiola trebaju se pripremiti dodavanjem testnog pufera u glavnu rastvor [^{3}H]-17β-estradiola od 12 nM kako bi se dobile koncentracije koje su prvotno u rasponu od 0,12 nM do 12 nM. Dodavanjem 40 µl tih RASTVORA odgovarajućim testnim porculanskim tanjirima sa udubljenjima na mikrotitracijskoj ploči s 96 udubljenja (u konačnom volumenu od 160 µl) dobit će se konačne koncentracije testa, u rasponu od 0,03 do 3,0 nM. Priprema testnog pufera, glavne rastvora [^{3}H]-17β-estradiola i razrjeđivanja te utvrđivanje koncentracija detaljno su opisani u protokolu za FW test (2.).

Razrjeđivanja etanolskih RASTVORA 17β-estradiola treba pripremiti dodavanjem testnog pufera kako bi se dobilo osam povećavajućih koncentracija koje su prvo u rasponu od 0,06 µM do 6 µM. Dodavanjem 80 µl tih RASTVORA odgovarajućim testnim porculanskim tanjirima sa udubljenjima na mikrotitracijskoj ploči s 96 udubljenja (u konačnom volumenu od 160 µl) dobit će se konačne koncentracije testa, u rasponu od 0,03 do 3 µM. Konačna koncentracija neobilježenog 17β-estradiola u pojedinačnim testnim porculanskim tanjirima sa udubljenjima za nespecifično vezivanje treba biti 1 000 puta veća od koncentracije obilježenog [^{3}H]-17β-estradiola. Priprema razrjeđivanja neobilježenog 17β-estradiola detaljno je opisana u protokolu za FW test (2.).

Treba upotrebljavati nominalnu koncentraciju receptora koja rezultira specifičnim vezivanjem od 20 ± 5 %. Rastvor receptora hrERα treba pripremiti neposredno prije upotrebe.

Mikrotitracione ploče s 96 udubljenja pripremaju se kako je prikazano u tabeli 2., pufera i receptora na pločama naveden je u Dodatku 2.2.

***Tabela 2.*Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test vezivanja do zasićenja**

	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			Ukupno vezivanje (rastvarač)

B	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER	0,60 nM [^{3}H] E2 + ER	1,0 nM [^{3}H] E2 + ER	3,0 nM [^{3}H] E2 + ER	
C					
D	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,03 µM E2	0,06 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,06 µM E2	0,08 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,08 µM E2	0,10 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,10 µM E2	Nespec. vezivanje
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: estrogenski receptor

E2: neobilježenog 17β-estradiola

Mikrotitracione ploče testa treba inkubirati na temperaturi od 2 do 8 °C od 16 do 20 sati te ih tokom perioda inkubacije treba staviti u rotator.

Mjerenje [^{3}H]-17β-estradiola koji se vezao na receptore hrERα

[^{3}H]-17β-estradiol koji se vezao na receptore hrERα treba odvojiti od slobodnog [^{3}H]-17β-estradiola dodavanjem 80 µl hladne suspenzije DCC-a svakoj jažici, protresanjem mikrotitacijskih ploča deset minuta i centrifugiranjem tokom deset minuta pri približno 2 500 o/min. Kako bi se tokom tog procesa smanjila disocijacija vezanog [^{3}H]-17β-estradiola s receptora hrERα, vrlo je važno da se puferi i testne posude sa udubljenjima drže na temperaturi od 2 do 8 °C i da se svaki korak provede brzo. Potrebna je jedinica za miješanje za mikrotitracione ploče kako bi se ploče obradile efektivno i brzo.
Zatim vrlo oprezno treba uzeti 50 µl supernatanta koji sadrži [^{3}H]-17β-estradiol vezan na receptor hrERα kako bi se izbjegla bilo kakva kontaminacija udubljenja dodirivanjem DCC-a i treba ga staviti na drugu mikrotitracijsku ploču.
Zatim u svaku kadicu treba dodati 200 µl scintilacijske tečnosti, koja može pretvoriti kinetičku energiju nuklearnih emisija u svjetlosnu energiju (A1–B12 i D1–E12). Posude sa udubljenjima G1–H12 (utvrđene kao ukupni dpm) predstavljaju serijska razrjeđivanja [^{3}H]-17β-estradiola (40 µl) koja treba direktno dodati scintilacijskoj tečnosti u porculanskim tanjirima sa udubljenjima ploče za mjerenje, kako je navedeno u tabeli 3., tj. te posude sa udubljenjima sadržiju samo 200

µl scintilacijske tečnosti i odgovarajuće razrjeđivanje [^{3}H]-17β-estradiola. Te mjere pokazuju koliko je [^{3}H]-17β-estradiola u dpm-ovima dodano svakoj grupi udubljenja za ukupno vezivanje i nespecifično vezivanje.

***Tabela 3.*Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test vezivanja do zasićenja, mjerenje radioaktivnosti**

	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			Ukupno vezivanje (rastvarač)
B	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,03 µM E2			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,06 µM E2			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,08 µM E2			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,10 µM E2			Nespec. vezivanje
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(ukupno dpm)			0,06 nM [^{3}H] E2			0,08 nM [^{3}H] E2			0,10 nM [^{3}H] E2			Ukupno dpm ([*7])
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: estrogenski receptor

E2: neobilježeni 17β-estradiol

dpm: raspadi u minuti

Mjerenje treba započeti s odgodom od najmanje dva sata i vrijeme brojenja treba iznositi 40

minuta po jažici. Kako bi se utvrdio dpm po jažici, treba upotrijebiti scintilacijski brojač za mikrotitracione ploče s ispravkom za gašenje. Umjesto toga, ako nije dostupan scintilacijski brojač za mikrotitracijsku ploču, uzorci se mogu mjeriti uobičajenim brojačem. U tim uslovima treba razmotriti smanjenje vremena brojenja.

Test konkurentskog vezivanja

Testom konkurentskog vezivanja mjeri se vezivanje jedne koncentracije [^{3}H]-17β-estradiola u prisutnosti povećavajućih koncentracija ispitivane hemikalije. Za svaku koncentraciju unutar jednog ciklusa treba upotrijebiti tri istodobna ponovljena uzorka. Osim toga, za svaku ispitanu hemikaliju treba sprovesti tri istodobna ciklusa. Test treba sprovesti na jednoj mikrotitracijskoj ploči s 96 udubljenja ili više ploča.

Kontrole

Pri sprovođenju testa u svaki eksperiment istovremeno treba uključiti rastvarač i kontrole (tj. referentni estrogen, hemikaliju koja se slabo veže i hemikaliju koja se ne veže). Na jednoj ploči tokom svakog ciklusa treba upotrijebiti cijelu krivu koncentracija referentnog estrogena i kontrola (tj. hemikalije koja se slabo veže i koja se ne veže). Sve ostale ploče trebaju da sadrži: i. visoku (najveće istiskivanje) i srednju (približno IC_{50}) koncentraciju E2 i hemikalije koja se slabo veže u triplikatima; ii. kontrolu s rastvaračem i nespecifično vezivanje, najmanje u tri ponavljanja. Postupci za pripremu testnog pufera, kontrola, [^{3}H]-17β-estradiola, receptora hrERα i RASTVORA ispitivanih hemikalija opisani su u literaturi pod 2. (Prilog K, vidjeti protokol za test FW).

Kontrola s rastvaračem:

Kontrola s rastvaračem pokazuje da rastvarač nije u interakciji s ispitnim sistemom i mjeri ukupno vezivanje (TB). Poželjno je rastvarač etanol. Umjesto toga, ako najviša koncentracija ispitivane hemikalije nije rastvorljiva u etanolu, može se upotrijebiti DMSO. Koncentracija etanola ili DMSO-a, ako se upotrebljavaju, u konačnim testnim porculanskim tanjirima sa udubljenjima iznosi 1,5 % i ne smije biti veća od 2 %.

Kontrola s puferom

Kontrola s puferom (BC) ne smije da sadrži ni rastvarač ni ispitivanu hemikaliju, ali treba da sadrži sve ostale sastojci testa. Rezultati kontrole s puferom upoređuju se s kontrolom s rastvaračem kako bi se potvrdilo da rastvarač koje se upotrebljava ne utiče na ispitni sistem.

Hemikalija koja se jako veže (referentni estrogen)

Endogeni je ligand 17β-estradiol (CAS 50-28-2) i on se veže s velikim afinitetom na estrogenski receptor podvrste alfa. Za svaki test konkurentskog vezivanja na hrERα treba pripremiti standardnu krivu u kojoj se upotrebljava neobilježeni 17β-estradiol kako bi se omogućila procjena varijabilnosti pri sprovođenju testa tokom vremena u istom laboratoriju. Treba pripremiti osam RASTVORA neobilježenog 17β-estradiola u etanolu, s koncentracijama u testnim porculanskim tanjirima sa udubljenjima u rasponu od 100 nM do 10 pM (od –7[logM] do –11[logM]), raspoređeno na sljedeći način: (–7[logM], –8[logM], –8,5[logM], –9[logM], –9,5[logM], –10[logM], –11[logM]). Najviša koncentracija neobilježenog 17β-estradiola (1 μM) služi i kao pokazatelj nespecifičnog vezivanja. Ova se koncentracija prepoznaje po oznaci „NSB” u tabeli 4. iako je ona isto dio standardne krive.

Hemikalija koja se slabo veže

Treba uključiti hemikaliju koja se slabo veže (noretinodrel (CAS 68-23-5) ili noretindron (CAS 68-22-4)) kako bi se dokazala osjetljivost svakog eksperimenta i omogućila procjena varijabilnosti pri sprovođenju testa tokom vremena. Treba pripremiti osam RASTVORA hemikalije koja se slabo veže u etanolu, s koncentracijama u testnim porculanskim tanjirima sa udubljenjima u rasponu od 3 nM do 30 pM (od –8,5[logM] do –4,5[logM]), raspoređeno na sljedeći način: –4,5[logM], –5[logM], –5,5[logM], –6[logM], –6,5[logM], –7[logM], –7,5[logM], –8,5[logM].

Hemikalija koja se ne veže

Kao negativnu kontrolu (hemikaliju koja se ne veže) treba upotrebljavati oktil-trietoksisilan (OTES, CAS 2 943-75-1). Ona je garantuje da će se načinom na koji se test sprovodi otkriti kada se ispitivane hemikalije ne vežu na receptor hrERα. Treba pripremiti osam RASTVORA hemikalije koja se ne veže u etanolu, s koncentracijama u testnim porculanskim tanjirima sa udubljenjima u rasponu od 0,1 nM do 1 000 µM (od –10[logM] do –3[logM]), u log povećanjima. Kao alternativna kontrolna hemikalija koja se ne veže može se upotrebljavati di-*n*-butil-ftalat (DBP). Pokazalo se da je njegova najveća rastvorljivost –4[logM].

Koncentracija receptora hrERα

Treba upotrebljavati količinu receptora koja daje specifično vezivanje od 20 ± 5 % 1 nM radioaktivno obilježenog liganda. Rastvor receptora hrERα treba pripremiti neposredno prije upotrebe.

[^{3}H]-17β-estradiol

Koncentracija [^{3}H]-17β-estradiola u testnim porculanskim tanjirima sa udubljenjima treba biti 1,0 nM.

Ispitivane hemikalije

U prvom se redu treba ispitati rastvorljivost kako bi se utvrdila granica rastvorljivosti za svaku ispitivanu hemikaliju i utvrdio primjereni raspon koncentracija za upotrebu u protokolu ispitivanja. Granicu rastvorljivosti svake ispitivane hemikalije prvo treba utvrditi u rastvraču i zatim potvrditi u uslovima testa. Konačna koncentracija koja se ispituje u testu ne smije biti veća od 1 mM. Test za utvrđivanje raspona sastoji se od kontrole s rastvaračem i osam log-serijskih razrjeđivanja, počevši od najveće prihvatljive koncentracije (npr. 1 mM ili manje, na osnovu granice rastvorljivosti) i uočene prisutnosti zamućenja ili taloga. Ispitivanu hemikaliju treba ispitati upotrebom kriva s osam raspoređenih log koncentracija, kako se utvrdi u prethodnom ispitivanju za utvrđivanje raspona. Koncentracije u drugom i trećem eksperimentu po potrebi treba prilagoditi kako bi se bolje opisala kriva koncentracija – odgovor.

Razrjeđivanja ispitivane hemikalije treba pripremiti u odgovarajućem rastvaraču. Ako najviša koncentracija ispitivane hemikalije nije rastvorljiva ni u etanolu ni u DMSO-u te bi dodavanjem još rastvarača koncentracija rastvarača u konačnoj epruveti porasla iznad prihvatljivog ograničenja, najviša koncentracija može se smanjiti na sljedeću nižu koncentraciju. U tom se slučaju može dodati dodatna koncentracija na donjem kraju niza koncentracija. Ostale koncentracije u nizu ne smiju se mijenjati.

Rastvora ispitivane hemikalije treba pažljivo pratiti kada se dodaju u testnu kadicu jer se ispitivana hemikalija može nataložiti nakon dodavanja u testnu kadicu. Podatke za sve posude sa udubljenjima koje sadržiju talog treba isključiti iz prilagođavanja krive i treba evidentirati razlog za isključivanje podataka.

Ako već postoje informacije iz drugih izvora koje pokazuju log(IC_{50}) ispitivane hemikalije, može biti primjereno geometrijski rasporediti razrjeđivanja (tj. polovine log jedinica oko očekivane

vrijednosti log(IC_{50}). Konačni rezultat treba odražavati dovoljnu raspoređenost koncentracija na obje strane log(IC_{50}), uključujući „vrh" i „dno", tako da se kriva vezivanja može primjereno opisati.

Organizacija testne ploče

Označene mikrotitracione ploče treba pripremiti razmatrajući inkubacije u šest ponavljanja sa šiframa za kontrolu s rastvaračem, najviše koncentracije referentnog estrogena koji služi i kao pokazatelj nespecifičnog vezivanja (NSB) i kontrole s puferom te uzimajući u obzir inkubacije u tri ponavljanja sa šiframa za svaku od osam koncentracija kontrole koja se ne veže (oktil-trietoksisilan), sedam nižih koncentracija za referentni estrogen, osam nivoa koncentracije hemikalije koja se slabo veže i osam koncentracija svake ispitivane hemikalije (TC). Primjer rasporeda dijagrama ploče za cijele krive koncentracija referentnog estrogena i kontrola naveden je u tabeli 4. u nastavku. Za ispitivanu hemikaliju upotrebljavaju se dodatne mikrotitracione ploče koje trebaju uključivati kontrole na ploči, tj.: 1. visoku (najveće istiskivanje) i srednju (približno IC_{50}) koncentraciju E2 i hemikalije koja se slabo veže u tri ponavljanja; 2. kontrolu s rastvaračem i nespecifično vezivanje u šest ponavljanja (tabela 5.). Primjer radnog lista s rasporedom na mikrotitracijskoj ploči za test konkurentskog vezivanja s tri nepoznate ispitivane hemikalije naveden je u Dodatku 2.3. Koncentracije navedene u tabelama 4. i 5. konačne su koncentracije testa. Najveća koncentracija za E2 treba iznositi 1×10^{-7} M, a za hemikaliju koja se slabo veže treba upotrebljavati najvišu koncentraciju koja se upotrebljavala za hemikaliju koja se slabo veže na ploči 1. Laboratorij mora utvrditi koncentraciju IC_{50} na osnovu svoje baze podataka o prošlim kontrolama. Očekuje se da će ta vrijednost biti slična vrijednosti uočenoj u validacijskim studijama (vidjeti tabelu 1.).

***Tabela 4.*Raspored na mikrotitracijskoj ploča za test konkurentskog vezivanja, cijele krive koncentracija referentnog estrogena i kontrola (ploča 1)**

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	TB (samo rastvarač)			TB (samo rastvarač)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1 \times 10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Slijepa proba (^{*8})		
D	NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1 \times 10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1 \times 10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1 \times 10^{-7,5}$)			NE ($1 \times 10^{-8,5}$)		
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	Slijepa proba (za radioakt.) (*9)	Slijepa proba (za radioakt.) (*9)	Kontrola s puferom	Kontrola s puferom
U ovom se primjeru kao hemikalija koja se slabo veže upotrebljava noretinodrel (NE)				

***Tabela 5.*Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test konkurentskog vezivanja, cijele krive koncentracija ispitivane hemikalije i kontrola na ploči**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (samo rastvarač)			TB (samo rastvarač)			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 ($1 \times 10^{-4,5}$)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10^{-7})		
U ovom se primjeru kao hemikalija koja se slabo veže upotrebljava noretinodrel (NE)												

Dovršetak testa konkurentskog vezivanja

Kako je prikazano u tabeli 6., u posude sa udubljenjima treba dodati 80 µl kontrole s

rastvaračem, kontrole s puferom, referentnog estrogena, hemikalije koja se slabo veže, hemikalije koja se ne veže i ispitivanih hemikalija pripremljenih u testnom puferu. Zatim u svaku kadicu treba dodati 40 µl rastvora 4 nM [^{3}H]-17β-estradiola. Nakon lagane rotacije od 10 do 15 minuta na temperaturi od 2 do 8 °C, treba dodati 40 µl rastvora receptora hrERα. Mikrotitracione ploče testa treba inkubirati na temperaturi od 2 do 8 °C od 16 do 20 sati te ih tokom perioda inkubacije treba staviti u rotator.

Tabela 6. **Volumen sastavnica testa za test konkurentskog vezivanja na hrER, mikrotitracione ploče**

Volumen (µl)	Sastojak
80	Neobilježeni 17β-estradiol, noretinodrel, OTES, ispitivane hemikalije, rastvarač ili pufer
40	RASTVORA 4 nM [^{3}H]-17β-estradiola
40	RASTVORA hrERα, koncentracija kako je utvrđena
160	***Ukupni volumen u svakoj testnoj jažici***

Zatim treba kvantifikovati [^{3}H]-17β-estradiol vezan na receptore hrERα, nakon odvajanja [^{3}H]-17β-estradiola vezanog na receptore hrERα od slobodnog [^{3}H]-17β-estradiola dodavanjem 80 µl suspenzije hladnog DCC-a u svaku kadicu, za test vezivanja do zasićenja.
Posude sa udubljenjima H1–6 (utvrđene kao slijepe probe (za radioaktivnost) u tabeli 4.) predstavljaju dpm radioaktivno obilježenog [^{3}H] estradiola u 40 µl. Alikvot od 40 µl treba direktno dodati scintilacijskoj tečnosti u porculanskim tanjirima sa udubljenjima H1–H6.

Kriterijumi prihvatljivosti

Test vezivanja do zasićenja

Kriva specifičnog vezivanja treba dosegnuti plato kako se upotrebljavaju povećavajuće koncentracije [^{3}H]-17β-estradiola, što ukazuje na zasićenje receptora hrERα ligandom.
Specifično vezivanje pri 1 nM [^{3}H]-17β-estradiola treba biti unutar prihvatljivog raspona od 15 % do 25 % prosječne izmjerene ukupne radioaktivnosti dodane u svim ciklusima. Prihvatljiva su povremena manja odstepena od tog raspona, ali ako su ciklusi dosljedno izvan tog raspona ili je određeni ciklus znatno izvan tog raspona, koncentraciju proteina treba prilagoditi i treba ponoviti test zasićenja.
Iz podataka bi trebala nastati linearna Scatchardova kriva.
Nespecifično vezivanje ne bi trebalo biti preveliko. Vrijednost za nespecifično vezivanje obično bi trebala biti < 35 % ukupnog vezivanja. Međutim, odnos povremeno može biti veći od tog ograničenja kada se mjeri vrlo niski dpm za najniže koncentracije ispitanog radioaktivno obilježenog 17β-estradiola.

Test konkurentskog vezivanja

Povećavanjem koncentracija neobilježenog 17β-estradiola trebao bi se istisnuti [^{3}H]-17β-estradiol s receptora na način koji je dosljedan konkurentskom vezivanju na jedno mjesto.
Vrijednost IC_{50} za referentni estrogen (tj. 17β-estradiol) treba biti približno jednaka molarnoj

koncentraciji [^{3}H]-17β-estradiola uvećanoj za Kd utvrđen u testu vezivanja do zasićenja.
Ukupno specifično vezivanje dosljedno bi trebalo biti unutar prihvatljivog raspona od 20 ± 5 % ako je prosječna izmjerena koncentracija ukupne radioaktivnosti dodane svakoj jažici iznosila 1 nM u svim ciklusima. Prihvatljiva su povremena manja odstepena od tog raspona, ali ako su ciklusi dosljedno izvan tog raspona ili je određeni ciklus znatno izvan tog raspona, koncentraciju proteina treba prilagoditi.
Rastvarač ne bi smjelo promijeniti osjetljivost ili obnovljivost testa. Rezultati kontrole s rastvaračem (posude sa udubljenjima TB) uspoređuju se s kontrolom s puferom kako bi se potvrdilo da rastvarač koje se upotrebljava ne utiče na ispitni sistem. Ako rastvarač ne utiče na test, rezultati TB-a i kontrole s puferom trebaju biti uporedivi.
Hemikalija koje se ne veže ne bi trebala istisnuti više od 25 % [^{3}H]-17β-estradiola s receptora hrERα ako se ispituje do 10^{-3} M (OTES) ili 10^{-4} M (DBP).
Kriterijumi uspješnosti razvijeni su za referentni estrogen i dvije hemikalije koje se slabo vežu (npr. noretinodrel, noretindron) upotrebom podataka iz validacione studije FW testa vezivanja na hrER (Prilog N literaturi pod 2.). Intervali pouzdanosti od 95 % navode se za srednju vrijednost (n) +/– standardnu devijaciju za sve kontrolne cikluse u svim laboratorijima koji sudjeluju u validacionoj studiji. Intervali pouzdanosti od 95 % izračunani su za parametre prilagođene krive (tj. vrh, dno, Hillov nagib, logIC_{50}) za referentni estrogen i hemikalije koje se slabo vežu te za log10RBA hemikalija koje se slabo vežu u odnosu na referentni estrogen te se navode kao kriterijumi uspješnosti za pozitivne kontrole. U tabeli 1. navedeni su očekivani rasponi za parametre prilagođene krive koji se mogu upotrebljavati kao kriterijumi uspješnosti. U praksi se raspon vrijednosti IC_{50} može neznatno razlikovati u zavisnosti o vrijednosti Kd smješa receptora i koncentraciji liganda.
Za parametre prilagođene krive za ispitivane hemikalije nisu razvijeni kriterijumi uspješnosti zbog velikog raspona postojećih potencijalnih ispitivanih hemikalija i varijacije u mogućim afinitetima i ishodima (npr. cijela kriva, djelomična kriva, bez prilagođavanja krive). Međutim, pri pregledu rezultata iz svakog ciklusa za ispitivanu hemikaliju treba primijeniti stručnu prosudbu. Treba upotrijebiti dovoljan raspon koncentracija ispitivane hemikalije kako bi se jasno utvrdio vrh (npr. od 90 do 100 % vezivanja) konkurentske krive. Varijabilnost među ponavljanjima pri svakoj koncentraciji ispitivane hemikalije te među tri neistodobna ciklusa treba biti razumna i naučno opravdana. Kontrole iz svakog ciklusa za ispitivanu hemikaliju trebale bi se približiti mjerama uspješnosti koje su navedene za ovaj FW test i biti dosljedne prošlim podacima o kontrolama iz svakog odgovarajućeg laboratorija.

ANALIZA PODATAKA

Test vezivanja do zasićenja

Mjere se i ukupno i nespecifično vezivanje. Iz tih se vrijednosti računa specifično vezivanje povećavajućih koncentracija [^{3}H]-17β-estradiola u uslovima ravnoteže tako da se nespecifično vezivanje oduzme od ukupnoga. Grafikon specifičnog vezivanja u odnosu na koncentraciju [^{3}H]-17β-estradiola treba dosegnuti plato za najveće specifično vezivanje koje ukazuje na zasićenje receptora hrERα [^{3}H]-17β-estradiolom. Osim toga, analizom podataka treba evidentirati vezivanje [^{3}H]-17β-estradiola na jedno vezno mjesto s velikim afinitetom. Nespecifično, ukupno i specifično vezivanje treba prikazati na krivoj vezivanja do zasićenja. Za dalju analizu tih podataka treba upotrijebiti nelinearnu regresijsku analizu (npr. BioSoft; McPherson, 1985.; Motulsky, 1995.), s konačnim prikazom podataka u obliku Scatchardove krive.
Analizom podataka treba utvrditi Bmax i Kd samo iz podataka o ukupnom vezivanju upotrebom pretpostavke da je nespecifično vezivanje linearno, osim ako se obrazloži upotreba druge metode. Osim toga, pri utvrđivanju najbolje prilagođavanja treba upotrijebiti zasnivatu regresiju osim ako se obrazloži drugačiji izbor. Treba navesti metodu odabranu za zasnivatu regresiju.

Kod utvrđivanja vrijednosti Bmax i Kd iz podataka o vezivanju do zasićenja uvijek treba primijeniti ispravak potrošnje liganada (npr. upotrebom Swillensove metode iz 1995.).

Test konkurentskog vezivanja

Kriva konkurentskog vezivanja grafički se prikazuje kao specifično vezivanje [^{3}H]-17β-estradiola u odnosu na koncentraciju (log10 jedinice) konkurenta. Koncentracija ispitivane hemikalije koja inhibira 50 % najvećeg specifičnog vezivanja [^{3}H]-17β-estradiola čini vrijednost IC_{50}.
Procjene za vrijednosti log(IC_{50}) za pozitivne kontrole (npr. referentni estrogen i hemikalija koja se slabo veže) treba utvrditi upotrebom primjerenog softvera za nelinearno prilagođavanje krive kako bi se prilagodila Hillova jednačina s četiri parametra (npr. BioSoft; McPherson, 1985.; Motulsky, 1995.). Vrh, dno, nagib i log(IC_{50}) obično ne bi trebalo ograničavati pri prilagođavanju tih kriva. Pri utvrđivanju najbolje prilagođavanja treba upotrijebiti zasnivatu regresiju osim ako se obrazloži drugačiji izbor. Ne treba primijeniti ispravak potrošnje liganada. Nakon početne analize svaku krivu vezivanja treba pregledati kako bi se osigurala odgovarajuća prilagođavanje modelu. Relativni afinitet vezivanja (RBA) za hemikaliju koja se slabo veže treba izračunati kao postotak log (IC_{50}) za hemikaliju koja se slabo veže u odnosu na log (IC_{50}) za 17β-estradiol. Rezultate iz pozitivnih kontrola i kontrola s hemikalijama koje se ne vežu treba procijeniti upotrebom mjera uspješnosti testa.
Podatke za sve ispitivane hemikalije treba analizirati upotrebom stupnjevitog pristupa kako bi se osiguralo da su podaci primjereno analizirani i da je svaka kriva konkurentskog vezivanja pravilno klasifikovana. Preporučuje se da se svaki ciklus za ispitivanu hemikaliju prvo podvrgne standardiziranoj analizi podataka koja je identična analizi upotrijebljenoj za referentni estrogen i kontrolne hemikalije koje se slabo vežu. Kada se to dovrši, treba izvršiti tehnički pregled parametara prilagođene krive i vizualni pregled mjere u kojoj podaci odgovaraju izrađenoj krivoj konkurentskog vezivanja za svaki ciklus. Tokom tog tehničkog pregleda dobar pokazatelj toga da su test i analiza podataka pravilno provedeni uključuju uočavanje smanjenja postotka specifično vezanog [^{3}H]-17β-estradiola koje zavisi o koncentraciji, malu varijabilnost među tehničkim ponavljanjima pri svakoj koncentraciji hemikalije i dosljednost u parametrima prilagođavanja među tri ciklusa.

Tumačenje podataka

Pod uslovom da su ispunjeni svi kriterijumi prihvatljivosti, ispitivana hemikalija smatra se hemikalijom koja se veže na receptor hrERα ako se kriva vezivanja može prilagoditi, a najniža tačka na krivoj odgovora u rasponu podataka manja je od 50 % (slika 1.).
Pod uslovom da su ispunjeni svi kriterijumi prihvatljivosti, ispitivana hemikalija smatra se hemikalijom koja se ne veže na receptor hrERα:

—ako se kriva vezivanja može prilagoditi i ako je najniža tačka na prilagođenoj krivoj odgovora u rasponu podataka veća od 75 %, ili

—ako se kriva vezivanja ne može prilagoditi i ako je najniži neizglađeni prosječni postotak vezivanja među grupama koncentracija u podacima veći od 75 %.

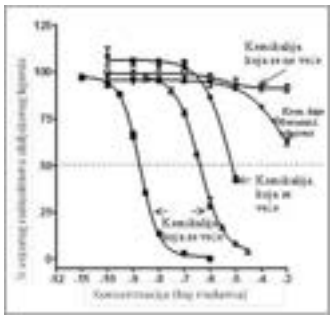
Smatra se da ispitivane hemikalije daju dvosmislen odgovor ako se ne ispuni nijedan od prethodno navedenih uslova (npr. najniža tačka na prilagođenoj krivoj odgovora nalazi se između 76 i 51 %).

***Tabela 7.*Kriterijumi za dodjelu klasifikovanja na osnovu krive konkurentskog vezivanja za ispitivanu hemikaliju**

Klasifikovanje	Kriterijumi

Hemikalija koja se veže[a]	Može se prilagoditi kriva vezivanja. **Najniža tačka na krivoj odgovora u rasponu podataka manja je od 50 %.**
Hemikalija koja se ne veže[b]	Ako se kriva vezivanja može prilagoditi, **najniža tačka na prilagođenoj krivoj odgovora u rasponu podataka veća je od 75 %**. Ako se kriva vezivanja ne može prilagoditi, **najniži neizglađeni prosječni postotak vezivanja među grupama koncentracija u podacima veći je od 75 %.**
Daje dvosmislen odgovor[c]	Bilo koji ciklus koji se može ispitati, a nije ni hemikalija koja se veže ni koja se ne veže (npr. najniža tačka na prilagođenoj krivoj odgovora nalazi se između 76 i 51 %).

***Slika 1.*Primjeri klasifikovanja ispitivanih hemikalija upotrebom krive konkurentskog vezivanja**



Višestruki ciklusi koji se provedu u laboratoriju za ispitivanu hemikaliju kombinujeju se dodjeljivanjem numeričkih vrijednosti svakom ciklusu i određivanjem prosjeka svih ciklusa kako je prikazano u tabeli 8. Rezultati za kombinujene cikluse u svakom laboratoriju upoređuju se s očekivanim klasifikovanjem za svaku ispitivanu hemikaliju.

***Tabela 8.*Metoda za klasifikovanje ispitivane hemikalije upotrebom višestrukih ciklusa unutar laboratorija**

Za dodjelu vrijednosti svakom ciklusu:	
Klasifikovanje	**Brojčana vrijednost**
Hemikalija koja se veže	2
Daje dvosmislen odgovor	1

Hemikalija koja se ne veže	0
Za klasifikovanje prosječne brojčane vrijednosti u svim ciklusima:	
Klasifikovanje	**Brojčana vrijednost**
Hemikalija koja se veže	Prosječno ≥ 1,5
Daje dvosmislen odgovor	0,5 ≤ prosječno < 1,5
Hemikalija koja se ne veže	Prosječno < 0,5

IZVJEŠTAJ O ISPITIVANJU

Dodatak 2.2.

UOBIČAJENI TEST ZASIĆENJA S [^{3}H]-17B-ESTRADIOLOM S TRI POSUDE SA UDUBLJENJIMA S PONAVLJANJEM

Uobičajeni test zasićenja s [^{3}H]-17β-estradiolom s tri posude sa udubljenjima s ponavljanjem											
Položaj	**Ponavljanje**	**Šifra vrste posude sa udubljenjima**	**Početna koncentracija rad. obilj. E2 (nM)**	**Volumen radioaktivno obilježenog E2 (µl)**	**Konačna koncentracija radioaktivno obilježenog E2 (nM)**	**Početna koncentracija neobilježenog E2 (µM)**	**Volumen neobilježenog E2 (µl)**	**Konačna koncentracija neobilježenog E2 (µM)**	**Volumen pufera (µl)**	**Volumen receptora (µl)**	**Ukupni volumen u porculanskim tanjirima sa udubljenjima**
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
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
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	radio akt.	0,12	40	0,03	——	——	——	——	——	40

G2	2	radio akt.	0,12	40	0,03	——	——	——	——	——	40
G3	3	radio akt.	0,12	40	0,03	——	——	——	——	——	40
G4	1	radio akt.	0,24	40	0,06	——	——	——	——	——	40
G5	2	radio akt.	0,24	40	0,06	——	——	——	——	——	40
G6	3	radio akt.	0,24	40	0,06	——	——	——	——	——	40
G7	1	radio akt.	0,32	40	0,08	——	——	——	——	——	40
G8	2	radio akt.	0,32	40	0,08	——	——	——	——	——	40
G9	3	radio akt.	0,32	40	0,08	——	——	——	——	——	40
G10	1	radio akt.	0,40	40	0,10	——	——	——	——	——	40
G11	2	radio akt.	0,40	40	0,10	——	——	——	——	——	40
G12	3	radio akt.	0,40	40	0,10	——	——	——	——	——	40
H1	1	radio akt.	1,20	40	0,30	——	——	——	——	——	40
H2	2	radio akt.	1,20	40	0,30	——	——	——	——	——	40
H3	3	radio akt.	1,20	40	0,30	——	——	——	——	——	40

H4	1	radio akt.	2,40	40	0,60	——	——	——	——	——	40
H5	2	radio akt.	2,40	40	0,60	——	——	——	——	——	40
H6	3	radio akt.	2,40	40	0,60	——	——	——	——	——	40
H7	1	radio akt.	4,00	40	1,00	——	——	——	——	——	40
H8	2	radio akt.	4,00	40	1,00	——	——	——	——	——	40
H9	3	radio akt.	4,00	40	1,00	——	——	——	——	——	40
H10	1	radio akt.	12,00	40	3,00	——	——	——	——	——	40
H11	2	radio akt.	12,00	40	3,00	——	——	——	——	——	40
H12	3	radio akt.	12,00	40	3,00	——	——	——	——	——	40
Napominje se da su „radioaktivne” posude sa udubljenjima prazne tokom inkubacije. Dodaje se 40 µl samo za brojenje scintilacijom.											

***Dodatak 2.3.*RASPORED UDUBLJENJA ZA TEST KONKURENTSKOG VEZIVANJA**

Ploča	**Položaj**	**Ponavljanje**	**Vrsta posude sa udubljenjima**	**Šifra posude sa udubljenjima**	**Šifra koncentracije**	**Početna koncentracija konkurenta (M)**	**Glavni hrER (µl)**	**Vol. pufera (µl)**	**Vol. obilježivača (rad. obilj. E2) (µl)**	**Volumen s ploče za razrjeđivanje (µl)**	**Konačni volumen (µl)**	**Konačna koncentracija konkurenta (M)**
S	A1	1	ukupno veziv	TB	TB1	–	40		40	80	160	–

			anje									
S	A2	2	ukupno vezivanje	TB	TB2	–	40		40	80	160	–
S	A3	3	ukupno vezivanje	TB	TB3	–	40		40	80	160	–
S	A4	1	ukupno vezivanje	TB	TB4	–	40		40	80	160	–
S	A5	2	ukupno vezivanje	TB	TB5	–	40		40	80	160	–
S	A6	3	ukupno vezivanje	TB	TB6	–	40		40	80	160	–
S	A7	1	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	neob. E2 (visok	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06

			i)									
S	A11	2	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	neobil ježeni E2	S	S1	2,00E-07	40	–	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	neobil ježeni E2	S	S1	2,00E-07	40	–	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	neobil ježeni E2	S	S1	2,00E-07	40	–	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	neobil ježeni E2	S	S2	2,00E-08	40	–	40	80	160	1,0E-08
S	B5	2	neobil ježeni E2	S	S2	2,00E-08	40	–	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	neobil ježeni E2	S	S2	2,00E-08	40	–	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	neobil ježeni E2	S	S3	6,00E-09	40	–	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	neobil ježeni E2	S	S3	6,00E-09	40	–	40	80	160	3,0E-09

S	B9	3	neobil ježeni E2	S	S3	6,00E -09	40	–	40	80	160	3,0E-09
S	B10	1	neobil ježeni E2	S	S4	2,00E -09	40	–	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	neobil ježeni E2	S	S4	2,00E -09	40	–	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	neobil ježeni E2	S	S4	2,00E -09	40	–	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	neobil ježeni E2	S	S5	6,00E -10	40	–	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	neobil ježeni E2	S	S5	6,00E -10	40	–	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	neobil ježeni E2	S	S5	6,00E -10	40	–	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	neobil ježeni E2	S	S6	2,00E -10	40	–	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	neobil ježeni E2	S	S6	2,00E -10	40	–	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	neobil ježeni E2	S	S6	2,00E -10	40	–	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	neobil ježeni E2	S	S7	2,00E -11	40	–	40	80	160	1,0E-11

S	C8	2	neobil ježeni E2	S	S7	2,00E -11	40	–	40	80	160	1,0E-11
S	C9	3	neobil ježeni E2	S	S7	2,00E -11	40	–	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	slijepa proba	slij. proba	B1	–	–	160	–	–	160	–
S	C11	2	slijepa proba	slij. proba	B2	–	–	160	–	–	160	–
S	C12	3	slijepa proba	slij. proba	B3	–	–	160	–	–	160	–
S	D1	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00E -05	40	–	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00E -05	40	–	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00E -05	40	–	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00E -05	40	–	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00E -05	40	–	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00E -05	40	–	40	80	160	1,0E-05

S	D7	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	–	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	–	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	–	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	E1	1	noretinodrel	NE	WP	6.00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	noretinodrel	NE	WP	6.00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	noretinodrel	NE	WP	6.00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	noretinodrel	NE	WP	2.00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	noretinodrel	NE	WP	2.00E-07	40		40	80	160	1,0E-07

S	E6	3	noretinodrel	NE	WP	2.00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	noretinodrel	NE	WP	6.00E-08	40	–	40	80	160	3,0E-08
S	E8	2	noretinodrel	NE	WP	6.00E-08	40	–	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	noretinodrel	NE	WP	6.00E-08	40	–	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	noretinodrel	NE	WP	6.00E-09	40	–	40	80	160	3,0E-09
S	E11	2	noretinodrel	NE	WP	6.00E-09	40	–	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	noretinodrel	NE	WP	6.00E-09	40	–	40	80	160	3,0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	–	40	80	160	1,0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	–	40	80	160	1,0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	–	40	80	160	1,0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	–	40	80	160	1,0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	–	40	80	160	1,0E-04

S	F6	3	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	–	40	80	160	1,0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	–	40	80	160	3,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	–	40	80	160	3,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	–	40	80	160	3,0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	–	40	80	160	3,0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	–	40	80	160	3,0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	–	40	80	160	3,0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	–	40	80	160	1,0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	–	40	80	160	1,0E-08
S	G6	3	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	–	40	80	160	1,0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	–	40	80	160	1,0E-09

S	G8	2	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	–	40	80	160	1,0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	–	40	80	160	1,0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	–	40	–	160	1,0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	–	40	–	160	1,0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	–	40	–	160	1,0E-10
S	H1	1	radio akt.	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H2	1	radio akt.	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H3	1	radio akt.	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H4	1	radio akt.	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H5	1	radio akt.	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H6	1	radio akt.	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H7	1	kontrola s puferom	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–
S	H8	1	kontrola s puferom	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–

S	H9	1	kontrola s puferom	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–
S	H10	1	kontrola s puferom	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–
S	H11	1	kontrola s puferom	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–
S	H12	1	kontrola s puferom	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–

Napominje se da su „radioaktivne” posude sa udubljenjima prazne tokom inkubacije. Dodaje se 40 µl samo za brojenje scintilacijom.

Raspored udubljenja za test konkurentskog vezivanja

Ploča	**Položaj**	**Ponavljanje**	**Vrsta posude sa udubljenjima**	**Šifra posude sa udubljenjima**	**Šifra koncentracije**	**Početna konc. konkurenta (M)**	**Glavni hrER (µl)**	**Vol. pufera (µl)**	**Vol. obilježivača (rad. obilj. E2) (µl)**	**Vol. sploče za razrj. (µl)**	**Konačni volumen (µl)**	**Konačna koncentracija konkurenta (M)**
P1	A1	1	ukupno vezivanje	TB	TBB1B1	–	40	–	40	80	160	–
P1	A2	2	ukupno veziva	TB	TB2	–	40	–	40	80	160	–

			nje									
P1	A3	3	ukupno vezivanje	TB	TB3	–	40	–	40	80	160	–
P1	A4	1	ukupno vezivanje	TB	TB4	–	40	–	40	80	160	–
P1	A5	2	ukupno vezivanje	TB	TB5	–	40	–	40	80	160	–
P1	A6	3	ukupno vezivanje	TB	TB6	–	40	–	40	80	160	–
P1	A7	1	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00 E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00 E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00 E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00 E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	neob. E2 (visoki	NSB	S0	2,00 E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06

			)									
P1	A12	3	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00 E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	ispit. hemikalija 1	TC1	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	ispit. hemikalija 1	TC1	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	ispit. hemikalija 1	TC1	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	ispit. hemikalija 1	TC1	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	ispit. hemikalija 1	TC1	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	ispit. hemikalija 1	TC1	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	ispit. hemikalija 1	TC1	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	ispit. hemikalija 1	TC1	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	ispit. hemikalija 1	TC1	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B1	1	ispit.	TC1	4	2,00	40	0	40	80	160	1,0E-

	0		hemik alija 1			E-06						06
P1	B1 1	2	ispit. hemik alija 1	TC1	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B1 2	3	ispit. hemik alija 1	TC1	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	C1	1	ispit. hemik alija 1	TC1	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	ispit. hemik alija 1	TC1	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	ispit. hemik alija 1	TC1	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	ispit. hemik alija 1	TC1	6	2,00 E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	ispit. hemik alija 1	TC1	6	2,00 E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	ispit. hemik alija 1	TC1	6	2,00 E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	ispit. hemik alija 1	TC1	7	2,00 E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	ispit. hemik alija 1	TC1	7	2,00 E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	ispit.	TC1	7	2,00	40	0	40	80	160	1,0E-

			hemik alija 1			E-09						09
P1	C10	1	ispit. hemik alija 1	TC1	8	2,00 E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	ispit. hemik alija 1	TC1	8	2,00 E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	ispit. hemik alija 1	TC1	8	2,00 E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	ispit. hemik alija 2	TC2	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	ispit. hemik alija 2	TC2	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	ispit. hemik alija 2	TC2	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	ispit. hemik alija 2	TC2	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	ispit. hemik alija 2	TC2	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	ispit. hemik alija 2	TC2	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	ispit. hemik alija 2	TC2	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	ispit.	TC2	3	2,00	40	0	40	80	160	1,0E-

			hemik alija 2			E-05						05
P1	D9	3	ispit. hemik alija 2	TC2	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	ispit. hemik alija 2	TC2	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	ispit. hemik alija 2	TC2	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	ispit. hemik alija 2	TC2	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	E1	1	ispit. hemik alija 2	TC2	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	ispit. hemik alija 2	TC2	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	ispit. hemik alija 2	TC2	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E4	1	ispit. hemik alija 2	TC2	6	–	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	ispit. hemik alija 2	TC2	6	–	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	ispit. hemik alija 2	TC2	6	–	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	ispit.	TC2	7	2,00	40	0	40	80	160	1,0E-

			hemik alija 2			E-06						09
P1	E8	2	ispit. hemik alija 2	TC2	7	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	ispit. hemik alija 2	TC2	7	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	ispit. hemik alija 2	TC2	8	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	ispit. hemik alija 2	TC2	8	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	ispit. hemik alija 2	TC2	8	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	ispit. hemik alija 3	TC3	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	ispit. hemik alija 3	TC3	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	ispit. hemik alija 3	TC3	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	ispit. hemik alija 3	TC3	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	ispit. hemik alija 3	TC3	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	ispit.	TC3	2	2,00	40	0	40	80	160	1,0E-

			hemik alija 3			E-04						04
P1	F7	1	ispit. hemik alija 3	TC3	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	ispit. hemik alija 3	TC3	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	ispit. hemik alija 3	TC3	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	ispit. hemik alija 3	TC3	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	ispit. hemik alija 3	TC3	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	ispit. hemik alija 3	TC3	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	G1	1	ispit. hemik alija 3	TC3	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	ispit. hemik alija 3	TC3	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	ispit. hemik alija 3	TC3	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	ispit. hemik alija 3	TC3	6	2,00 E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	ispit.	TC3	6	2,00	40	0	40	80	160	1,0E-

			hemikalija 3			E-08						08
P1	G6	3	ispit. hemikalija 3	TC3	6	2,00 E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	ispit. hemikalija 3	TC3	7	2,00 E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	ispit. hemikalija 3	TC3	7	2,00 E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	ispit. hemikalija 3	TC3	7	2,00 E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	ispit. hemikalija 3	TC3	8	2,00 E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	ispit. hemikalija 3	TC3	8	2,00 E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	ispit. hemikalija 3	TC3	8	2,00 E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	noreti nodrel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noreti nodrel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noreti nodrel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noreti nodrel	NE		1,00 E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noreti	NE		1,00	40	0	40	80	160	

			nodrel			E-4,5						
P1	H6	3	noreti nodrel	NE		1,00 E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	neobilj eženi E2 S			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	neobilj eženi E2 S			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	neobilj eženi E2 S			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	neobilj eženi E2 S			1,00 E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	neobilj eženi E2 S			1,00 E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	neobilj eženi E2 S			1,00 E-7	40	0	40	80	160	

Dodatak 3. IN VITRO TEST VEZIVANJA NA ESTROGENSKI RECEPTOR UPOTREBOM LJUDSKOG REKOMBINANTNOG PROTEINA DOMENE VEZIVANJA LIGANDA RECEPTORA ERA KOJI JE RAZVIO CERI (INSTITUT ZA PROCJENU I ISTRAŽIVANJE HEMIKALIJA)

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA (VIDJETI I OPŠTI UVOD)

U ovom *in vitro* testu vezivanja na estrogenski receptor (ERα) do zasićenja i konkurentskog vezivanja upotrebljava se domena vezivanja liganda (LBD) ljudskog receptora ERα (hrERα). Taj konstrukt proteina proizveo je CERI (institut za procjenu i istraživanje hemikalija) iz Japana te on postoji kao fuzijski protein glutation S-transferaza (GST) i eksprimira se u bakteriji E. coli. CERI-jev protokol podvrgnut je međunarodnoj validacionoj studiji u više laboratorija (2.) koja je pokaza njegovu relevantnost i pouzdanost za predviđenu svrhu testa.

Ovaj je test postupak izbora za utvrđivanje supstance koje se mogu vezati na receptor hrERα. Upotrebljava se za utvrđivanje sposobnosti ispitivanih hemikalija da se natječu sa 17β-estradiolom u vezivanju na domenu vezivanja liganda receptora hrERα. Kvantitativni rezultati testa mogu uključivati IC_{50} (mjera koncentracije ispitivane hemikalije koja je potrebna da se istisne pola [^{3}H]-17β-estradiola s receptora hrERα) i relativne afinitete vezivanja ispitivanih

hemikalija na hrERα u u poređenju sa 17β-estradiolom. U svrhu izbora hemikalija prihvatljivi kvalitativni rezultati testa mogu uključivati klasifikovanja ispitivanih hemikalija kao hemikalija koje se vežu na hrERα, koje se ne vežu ili koje daju dvosmislen odgovor na osnovu kriterijuma opisanih za krive vezivanja.
U testu se upotrebljava radioaktivno obilježeni ligand, što znači da laboratorij mora imati dozvolu za radioaktivne materijale. U svim pokolonama s radioizrastvorima i opasnim hemikalijama treba poštovati propise i postupke kako je opisano u nacionalnom zakonodavstvu.
Prije upotrebe ovog testa u regulatorne svrhe treba pročitati odjeljke „**OPŠTI UVOD**" i „**SASTOJCI TESTA VEZIVANJA NA hrER**". Definicije i skraćenice upotrijebljene u ovoj Smjernici za ispitivanje navedene su u Dodatku 1.

NAČELA TESTA (VIDJETI I OPŠTI UVOD)

Test vezivanja na hrERα mjeri sposobnost vezivanja radioaktivno obilježenog liganda ([^{3}H]17β-estradiol) na estrogenski receptor u prisutnosti povećavajućih koncentracija ispitivane hemikalije (tj. konkurenta). Ispitivane hemikalije koje imaju velik afinitet za estrogenski receptor natječu se s radioaktivno obilježenim ligandom pri nižoj koncentraciji u odnosu na hemikalije s manjim afinitetom za taj receptor.
Ovaj se test sastoji od dva glavna elementa: eksperimenta vezivanja do zasićenja kako bi se opisali parametri interakcije receptora i liganda, nakon čega slijedi eksperiment konkurentskog vezivanja u kojem se ispitivana hemikalija i radioaktivno obilježeni ligand natječu u vezivanju na estrogenski receptor.
Svrha je eksperimenta vezivanja do zasićenja opisati određenu šaržu receptora u pogledu afiniteta vezivanja i broja u pripravku za eksperiment konkurentskog vezivanja. Eksperimentom vezivanja do zasićenja mjeri se, u uslovima ravnoteže, afinitet fiksne koncentracije estrogenskog receptora za njegov prirodni ligand (koji predstavlja konstanta disocijacije, Kd) i koncentracija aktivnih mjesta na receptorima (Bmax).
Eksperimentom konkurentskog vezivanja mjeri se afinitet supstanci da se s [^{3}H]17β-estradiolom u vezivanju na estrogenski receptor. Afinitet se kvantificira koncentracijom ispitivane hemikalije koja, u uslovima ravnoteže, inhibira 50 % specifičnog vezivanja [^{3}H]17β-estradiola (koja se naziva „50-postotna inhibitorska koncentracija" ili IC_{50}). To se može procijeniti i upotrebom relativnog afiniteta vezivanja (RBA, u odnosu na IC_{50} estradiola koji je izmjeren zasebno u istom ciklusu). Eksperimentom konkurentskog vezivanja mjeri se vezivanje [^{3}H]17β-estradiola pri fiksnoj koncentraciji u prisutnosti širokog raspona (osam redova veličine) koncentracija ispitivanih hemikalija. Ako je moguće, podaci se zatim prilagođavaju u oblik Hillove jednačine (Hill, 1910.) koja opisuje istiskivanje radioaktivno obilježenog liganda konkurentnom hemikalijom koja se veže na jedno mjesto. Mjera istiskivanja radioaktivno obilježenog estradiola u uslovima ravnoteže upotrebljava se za opis ispitivane hemikalije kao hemikalije koja se veže, koja se ne veže ili koja daje dvosmislen odgovor.

POSTUPAK

Dokazivanje prihvatljivog djelovanja proteina receptora hrERα

Prije rutinske primjene testova vezivanja do zasićenja i konkurentskog vezivanja za svaku novu šaržu receptora hrERα treba dokazati da ispravno djeluju u laboratoriju u kojem će se upotrebljavati. Za dokazivanje uspješnosti treba upotrijebiti proces koji se sastoji od dva koraka. Riječ je o sljedećim koracima:

—sprovođenju testa vezivanja [^{3}H]-17β-estradiola do zasićenja kako bi se dokazali specifičnost i zasićenje receptora hrERα. Nelinearnom regresijskom analizom tih podataka (npr. BioSoft; McPherson, 1985.; Motulsky, 1995.) i kasnijom Scatchardovom krivuljom treba evidentirati

afinitet vezivanja [^{3}H]-17β-estradiola na receptor hrERα (Kd) i broj receptora (Bmax) za određenu šaržu receptora hrERα,

—Sprovođenju testa konkurentskog vezivanja upotrebom kontrolnih supstanci (referentni estrogen (17β-estradiol), hemikalije koja se slabo veže (npr. noretinodrel ili noretindron) i hemikalije koja se ne veže (oktil-trietoksisilan, OTES)). Svaki laboratorij treba uspostaviti bazu prošlih podataka kako bi evidentirao dosljednost vrijednosti IC_{50} i relevantnih vrijednosti za referentni estrogen i hemikaliju koja se slabo veže između eksperimenta i među različitim šaržama receptora hrERα. Osim toga, parametri kriva konkurentskog vezivanja za kontrolne supstance trebaju biti unutar ograničenja intervala pouzdanosti od 95 % (vidjeti tabelu 1.) koja su razvijena upotrebom podataka iz laboratorija koji su učestvovali u validacionoj studiji za ovaj test (2.).

Tabela 1 **Kriterijumi uspješnosti razvijeni za referentni estrogen i hemikaliju koja se slabo veže, CERI-jev test vezivanja na hrER**

Supstanca	**Parametar**	**Srednja vrijednost**	**Standardna devijacija (n)**	**Intervali pouzdanosti od 95**	
				Donja granica	**Gornja granica**
17β-estradiol	Vrh	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Dno	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Hillov nagib	– 1,22	0,20 (70)	– 1,27	– 1,17
	$LogIC_{50}$	– 8,93	0,23 (70)	– 8,98	– 8,87
Noretinodrel	Vrh	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Dno	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hillov nagib	– 1,04	0,21 (68)	– 1,09	– 0,99
	$LogIC_{50}$	– 6,19	0,40 (68)	– 6,29	– 6,10
Noretindron	Vrh	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Dno	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10

	Hillov nagib	– 1,18	0,32 (23)	– 1,31	– 1,04
	$LogIC_{50}$	– 6,01	0,54 (23)	– 6,25	– 5,78

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija

Svaki test (zasićenje i konkurentsko vezivanje) treba se sastojati od tri nezavisna ciklusa (tj. sa svježim razrjeđivanjima receptora, hemikalija i reagensa) provedena na različite dane te svaki ciklus treba da sadrži tri ponavljanja.

Utvrđivanje koncentracije receptora (hrERα)

Koncentracija aktivnih receptora malo se razlikuje s obzirom na šaržu i uslove skladištenja. Zato treba utvrditi koncentraciju aktivnih receptora koja je dobijena od dobavljača. Tako će se dobiti primjerena koncentracija aktivnih receptora u trenutku primjene ciklusa.
Nominalne koncentracije od 0,1, 0,2, 0,4 i 0,6 nM receptora treba inkubirati bez (ukupno vezivanje) i s (nespecifično vezivanje) 1 µM neobilježenog estradiola u uslovima koji odgovaraju konkurentskom vezivanju (tj. 0,5 nM [^{3}H]-estradiola). Specifično vezivanje, izračunano kao razlika ukupnog i nespecifičnog vezivanja, grafički se prikazuje u u zavisnostisti o nominalnoj koncentraciji receptora. Koncentracija receptora koja pokaže specifične vrijednosti vezivanja koje odgovaraju 40 % dodane radioaktivne oznake povezana je s odgovarajućom koncentracijom receptora i tu koncentraciju receptora treba upotrebljavati za eksperimente vezivanja do zasićenja i konkurentskog vezivanja. Konačna koncentracija receptora hrER od 0,2 nM često će ispunjavati taj uslov.
Ako se kriterij od 40 % ne može ispuniti u više navrata, treba provjeriti plan eksperimenta kako bi se utvrdile potencijalne greške. Neuspjeh u ispunjavanju kriterijuma od 40 % može biti znak toga da u rekombinantnoj šarži ima vrlo malo aktivnih receptora i zatim treba razmotriti upotrebu druge šarže receptora.

Test zasićenja

Osam povećavajućih koncentracija [^{3}H]17β-estradiola treba procijeniti u tri ponavljanja, u sljedeća tri uslova (vidjeti tabelu 2.):

a. bez neobilježenog 17β-estradiola i u prisutnosti estrogenskog receptora. To je utvrđivanje ukupnog vezivanja mjerenjem radioaktivnosti u porculanskim tanjirima sa udubljenjima u kojima se nalazi samo [^{3}H]17β-estradiol;

b. u prisutnosti koncentracije neobilježenog 17β-estradiola koja je 2000 veća od koncentracije obilježenog 17β-estradiola i u prisutnosti estrogenskog receptora. Namjera je ovog uslova zasititi aktivna vezna mjesta neobilježenim 17β-estradiolom te mjerenjem radioaktivnosti u porculanskim tanjirima sa udubljenjima utvrditi nespecifično vezivanje. Sav radioaktivno obilježeni estradiol koji je preostao koji se može vezati na receptor smatra se vezanim na nespecifično mjesto jer bi neobilježeni estradiol trebao biti prisutan u tako visokoj koncentraciji da se veže na sva dostupna specifična mjesta na receptoru;

c. bez neobilježenog 17β-estradiola i bez estrogenskog receptora (utvrđivanje ukupne radioaktivnosti).

Priprema RASTVORA [^{3}H]-17β-estradiola, neobilježenog 17β-estradiola i receptora hrERα

Rastvor 40 nM [^{3}H]-17β-estradiola treba pripremiti iz 1 µM glavne rastvora [^{3}H]-17β-estradiola u

DMSO-u, dodavanjem DMSO-a (kako bi se pripremilo 200 nM) i testnog pufera na sobnoj temperaturi (kako bi se pripremilo 40 nM). Upotrebom te rastvora od 40 nM priprema se niz razrjeđivanja [^{3}H]-17β-estradiola, u rasponu od 0,313 nM do 40 nM s testnim puferom na sobnoj temperaturi (kako je prikazano u retku 12 tabele 2.). Konačne koncentracije u testu, u rasponu od 0,0313 do 4,0 nM, dobit će se dodavanjem 10 µl tih RASTVORA odgovarajućim testnim porculanskim tanjirima sa udubljenjima na mikrotitracijskoj ploči s 96 udubljenja (vidjeti tabele 2. i 3.). Priprema testnog pufera, izračun izvorne glavne rastvora [^{3}H]-17β-estradiola na osnovu njene specifične aktivnosti, priprema razrjeđivanja te utvrđivanje koncentracija detaljno su opisani u protokolu za CERI-jev test (2.).

Razrjeđivanja neobilježenih RASTVORA 17β-estradiola treba pripremiti iz 1 nM glavne rastvora 17β-estradiola dodavanjem testnog pufera kako bi se dobilo osam povećavajućih koncentracija koje su prvotno u rasponu od 0,625 µM do 80 µM. Konačne koncentracije u testu, u rasponu od 0,0625 do 8 µM, dobit će se dodavanjem 10 µl tih RASTVORA odgovarajućim testnim porculanskim tanjirima sa udubljenjima na mikrotitracijskoj ploči s 96 udubljenja namijenjenima za mjerenje nespecifičnog vezivanja (vidjeti tabele 2. i 3.). Priprema razrjeđivanja neobilježenog 17β-estradiola detaljno je opisana u protokolu za CERI-jev test (2.).

Treba upotrebljavati koncentraciju receptora koja daje specifično vezivanje od 40 ± 10 %. Rastvor receptora hrERα treba pripremiti s vrlo hladnim testnim puferom neposredno prije upotrebe, tj. nakon što se pripreme sve posude sa udubljenjima za ukupno vezivanje, nespecifično vezivanje i samo radioaktivno obilježeni ligand.

Mikrotitracione ploče s 96 udubljenja pripremaju se kako je prikazano u tabeli 2., s tri ponavljanja po koncentraciji [^{3}H]-17β-estradiola. Raspored volumena [^{3}H]-17β-estradiola, neobilježenog 17β-estradiola, pufera i receptora prikazan je u tabeli 3.

***Tabela 2*Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test vezivanja do zasićenja**

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
	Za mjerenje TB-a			Za mjerenje NSB-a			Za utvrđivanje samo radioaktivno obilježenog liganda				Razrjeđivanja neobilježenog E2 za stupce ploče 4–6	Razrjeđivanja [^{3}H]E2 za stupce ploče 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 [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 : ukupno vezivanje NSB : nespecifično vezivanje [^{3}H] E2 : [^{3}H]17β-estradiol E2 : neobilježeni 17β-estradiol						

Tabela 3 **Volumeni reagensa za mikrotitracijsku ploču za zasićenje**

Broj retka		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
Koraci pripreme		**Posude sa udubljenjima za TB**			**Posude sa udubljenjima za NSB**			**Samo radioaktivno obilježeni ligand**		
Volumen sastavnica za prethodne reakcijske posude sa udubljenjima i redoslijed dodavanja	Pufer	60 µl			50 µl			90 µl		
	neobilježeni E2 iz retka 11 u tabeli 2.	–			10 µl			–		

	[^{3}H]E2 iz retka 12 u tabeli 2.	10 µl	10 µl	10 µl
	hrERα	30 µl	30 µl	–
Ukupni reakcijski volumen		100 µl	100 µl	100 µl
Inkubacija		**REAKCIJA NAKON DVA SATA INKUBACIJE**		Kvantifikacija radioaktivnosti odmah nakon pripreme. Bez inkubacije
Tretiranje 0,4-postotnim DCC-om		Da	Da	**Ne**
Volumen 0,4-postotnog DCC-a		100 µl	100 µl	–
Filtriranje		Da	Da	Ne
MJERENJE DPMS-a				
Kvantifikacijski volumen dodan scintilacijskom koktelu		100 µl	100 µl	50 µl

Mikrotitracione ploče testa za utvrđivanje ukupnog i nespecifičnog vezivanja treba inkubirati dva sata na sobnoj temperaturi (od 22 °C do 28 °C).

Mjerenje [^{3}H]-17β-estradiola koji se vezao na receptore hrERα

Nakon dvosatnog perioda inkubacije [^{3}H]-17β-estradiol vezan na receptore hrERα treba odvojiti od slobodnog [^{3}H]-17β-estradiola tako da se u posude sa udubljenjima doda 100 µl 0,4-postotne vrlo hladne suspenzije DCC-a. Ploče zatim treba staviti na led deset minuta, a reakcijsku smjesu i suspenziju DCC-a filtrirati prenošenjem na filtar mikrotitracione ploče kako bi se uklonio DCC. Zatim 100 µl filtrata treba dodati scintilacijskoj tečnosti u bočice LSC-a za utvrđivanje raspada u minuti (dpm) po bočici brojenjem metodom tekućinske scintilacije.
Umjesto toga, ako nije dostupan mikrotitracijski filtar, DCC se može ukloniti centrifugiranjem. Zatim vrlo oprezno treba uzeti 50 µl supernatanta koji sadrži [^{3}H]-17β-estradiol vezan na receptor hrERα kako bi se izbjegla bilo kakva kontaminacija udubljenja dodirivanjem DCC-a i to se treba upotrijebiti za brojenje scintilacijom.
Uslov sa samo radioaktivno obilježenim ligandom upotrebljava se za utvrđivanje raspada u minuti (dpm) [^{3}H]-17β-estradiola dodatog u testne posude sa udubljenjima. Radioaktivnost treba kvantifikovati odmah nakon pripreme. Te posude sa udubljenjima ne treba inkubirati ni tretirati suspenzijom DCC-a, već se njihov sadržaj treba direktno dodati scintilacijskoj tečnosti. Te mjere pokazuju koliko je [^{3}H]-17β-estradiola u dpm-ovima dodano svakoj grupi udubljenja za ukupno vezivanje i nespecifično vezivanje.

Test konkurentskog vezivanja

Testom konkurentskog vezivanja mjeri se vezivanje jedne koncentracije [^{3}H]-17β-estradiola u prisutnosti povećavajućih koncentracija ispitivane hemikalije. Za svaku koncentraciju unutar jednog ciklusa treba upotrijebiti tri istodobna ponovljena uzorka. Osim toga, za svaku ispitanu hemikaliju treba sprovesti tri neparalelna ciklusa. Test treba sprovesti na jednoj mikrotitracijskoj ploči s 96 udubljenja ili više ploča.

Kontrole

Pri sprovođenju testa u svaki eksperiment istovremeno treba uključiti rastvarač i kontrole (tj. referentni estrogen, hemikaliju koja se slabo veže i hemikaliju koja se ne veže). Na jednoj ploči tokom svakog ciklusa treba upotrijebiti cijelu krivu koncentracija referentnog estrogena i kontrola (tj. hemikalije koja se slabo veže i koja se ne veže). Sve ostale ploče trebaju da sadrži: i. visoku (najveće istiskivanje, tj. približno potpuno istiskivanje radioaktivno obilježenog liganda) i srednju (približno IC_{50}) koncentraciju E2 i hemikalije koja se slabo veže u tri ponavljanja; ii. kontrolu s rastvaračem i nespecifično vezivanje, svako u tri ponavljanja. Postupci za pripremu testnog pufera, [^{3}H]-17β-estradiola, receptora hrERα i RASTVORA ispitivanih hemikalija detaljno su opisani u protokolu za test CERI (2.).

Kontrola s rastvaračem

Kontrola s rastvaračem pokazuje da rastvarač nije u interakciji s ispitnim sistemom i mjeri ukupno vezivanje (TB). Poželjno je rastvarač DMSO. Umjesto toga, ako najviša koncentracija ispitivane hemikalije nije rastvorljiva u DMSO-u, može se upotrijebiti etanol. Koncentracija DMSO-a u konačnim testnim porculanskim tanjirima sa udubljenjima treba biti 2,05 % i može se povećati do 2,5 % ako ispitivana hemikalija nije dovoljno rastvorljiva. Ne treba upotrebljavati koncentracije DMSO-a veće od 2,5 % zbog utjecaja većih koncentracija rastvarača na test. Za ispitivane hemikalije koje nisu rastvorive u DMSO-u, ali su rastvorive u etanolu, u testu se može upotrijebiti najviše 2 % etanola bez interferencije.

Kontrola s puferom

Kontrola s puferom (BC) ne smije da sadrži ni rastvarač ni ispitivanu hemikaliju, ali treba da sadrži sve ostale sastojci testa. Rezultati kontrole s puferom uspoređuju se s kontrolom s rastvaračem kako bi se potvrdilo da rastvarač koje se upotrebljava ne utiče na ispitni sistem.

Hemikalija koja se jako veže (referentni estrogen)

Endogeni je ligand 17β-estradiol (CAS 50-28-2) i on se veže s velikim afinitetom za estrogenski receptor podvrste alfa. Za svaki test konkurentskog vezivanja na hrERα treba pripremiti standardnu krivu u kojoj se upotrebljava neobilježeni 17β-estradiol kako bi se omogućila procjena varijabilnosti pri sprovođenju testa tokom vremena u istom laboratoriju. Treba pripremiti osam RASTVORA neobilježenog 17β-estradiola u DMSO-u i testnom puferu, sa sljedećim konačnim koncentracijama u testnim porculanskim tanjirima sa udubljenjima koje se trebaju upotrijebiti za standardnu krivu: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. Najviša koncentracija neobilježenog 17β-estradiola (1 μM) treba služiti kao pokazatelj nespecifičnog vezivanja. Ova se koncentracija prepoznaje po oznaci „NSB” u tabeli 4. iako je ona i dio standardne krive.

Hemikalija koja se slabo veže

Treba uključiti hemikaliju koja se slabo veže (noretinodrel (CAS 68-23-5) ili alternativno noretindron (CAS 68-22-4)) kako bi se dokazala osjetljivost svakog eksperimenta i omogućila

procjena varijabilnosti pri sprovođenju testa tokom vremena. Treba pripremiti osam RASTVORA hemikalije koja se slabo veže u DMSO-u i testnom puferu, sa sljedećim konačnim koncentracijama u testnim porculanskim tanjirima sa udubljenjima: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} i 10^{-9} M.

Hemikalija koja se ne veže

Kao negativnu kontrolu (hemikaliju koja se ne veže) treba upotrebljavati oktil-trietoksisilan (OTES, CAS 2943-75-1). Ona je garantuje da će se načinom na koji se test sprovodi otkriti ispitivane hemikalije koje se ne vežu na receptor hrERα. Treba pripremiti osam RASTVORA hemikalije koja se ne veže u DMSO-u i testnom puferu, sa sljedećim konačnim koncentracijama u testnim porculanskim tanjirima sa udubljenjima: 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Kao alternativna hemikalija koja se ne veže može se upotrebljavati di-n-butil-ftalat (DBP, CAS 84-72-2), ali se ispituje samo do 10^{-4} M. Pokazalo se da je 10^{-4} M najveća rastvorljivost DBP-a u testu.

Koncentracija receptora hrERα

Treba upotrebljavati količinu receptora koja daje specifično vezivanje od 40 ± 10 %. Rastvor receptora hrERα treba pripremiti razrjeđivanjem funkcionalnog receptora hrERα u vrlo hladnom testnom puferu, neposredno prije upotrebe.

[^{3}H]-17β-estradiol

Konačna koncentracija [^{3}H]-17β-estradiola u testnim porculanskim tanjirima sa udubljenjima treba biti 0,5 nM.

Ispitivane hemikalije

U prvom se redu treba ispitati rastvorljivost kako bi se utvrdila granica rastvorljivosti za svaku ispitivanu hemikaliju i utvrdio primjereni raspon koncentracija za upotrebu u protokolu ispitivanja. Granicu rastvorljivosti svake ispitivane hemikalije prvo treba utvrditi u rastvraču i zatim potvrditi u uslovima testa. Konačna koncentracija koja se ispituje u testu ne smije biti veća od 1 mM. Ispitivanje za utvrđivanje raspona uključuje kontrolu s rastvaračem i najmanje osam log-serijskih razrjeđivanja, počevši od najveće prihvatljive koncentracije (npr. 1 mM ili manje, na osnovu granice rastvorljivosti) i uočene prisutnosti zamućenja ili taloga. Kada se utvrdi raspon koncentracija za ispitivanje, ispitivanu hemikaliju treba ispitati upotrebom osam primjereno raspoređenih log koncentracija, kako su utvrđene u prethodnom ispitivanju za utvrđivanje raspona. Ako je potrebno, koncentracije ispitane u drugom i trećem eksperimentu po potrebi treba dodatno prilagoditi kako bi se bolje opisala kriva koncentracija – odgovor.

Razrjeđivanja ispitivane hemikalije treba pripremiti u odgovarajućem rastvraču. Ako najviša koncentracija ispitivane hemikalije nije rastvorljiva ni u etanolu ni u DMSO-u te bi dodavanjem još rastvarača koncentracija rastvarača u konačnoj epruveti porasla iznad prihvatljivog ograničenja, najviša koncentracija može se smanjiti na sljedeću nižu koncentraciju. U tom se slučaju može dodati dodatna koncentracija na donjem kraju niza koncentracija. Ostale koncentracije u nizu ne smiju se mijenjati.

Rastvora ispitivane hemikalije treba pažljivo pratiti kada se dodaju u testnu kadicu jer se ispitivana hemikalija može nataložiti nakon dodavanja u testnu kadicu. Podatke za sve posude sa udubljenjima koje sadrže talog treba isključiti iz prilagođavanja krive i treba evidentirati razlog za isključivanje podataka.

Ako već postoje informacije iz drugih izvora koje pokazuju log(IC_{50}) ispitivane hemikalije, može biti primjereno geometrijski rasporediti razrjeđivanja bliže očekivanoj vrijednosti log(IC_{50}) (tj. polovine log jedinica). Konačni rezultati trebaju pokazivati dovoljnu raspoređenost koncentracija

na obje strane log(IC_{50}), uključujući „vrh” i „dno”, tako da se kriva vezivanja može primjereno opisati.

Organizacija testne ploče

Označene mikrotitracione ploče treba pripremiti upotrebom inkubacija u šest ponavljanja za kontrolu s rastvaračem, najviše koncentracije referentnog estrogena (E2) koji služi i kao pokazatelj nespecifičnog vezivanja (NSB), kontrole s puferom, te inkubacije u tri ponavljanja za svaku od osam koncentracija kontrole koja se ne veže (oktil-trietoksisilan), sedam nižih koncentracija za referentni estrogen (E2), osam koncentracija hemikalije koja se slabo veže (noretinodrel ili noretindron) i osam koncentracija svake ispitivane hemikalije (TC). Primjer rasporeda na ploči za cijele krive koncentracija referentnog estrogena i kontrola naveden je u tabeli 4. u nastavku. Za ispitivanu hemikaliju upotrebljavaju se dodatne mikrotitracione ploče koje trebaju uključivati kontrole na ploči, tj.: i. visoku (najveće istiskivanje) i srednju (približno IC_{50}) koncentraciju E2 i hemikalije koja se slabo veže u tri ponavljanja; ii. kontrolu s rastvaračem (kao ukupno vezivanje) i nespecifično vezivanje u šest ponavljanja (tabela 5.). Primjer radnog lista s rasporedom mikrotitracionih ploča za test konkurentskog vezivanja s tri nepoznate ispitivane hemikalije naveden je u Dodatku 3.3. Koncentracije navedene u radnom listu te u tabelama 4. i 5. odnose se na konačne koncentracije koje se upotrebljavaju u svakoj testnoj jažici. Najveća koncentracija za E2 treba iznositi 1×10^{-7} M, a za hemikaliju koja se slabo veže treba upotrebljavati najvišu koncentraciju koja se upotrebljavala za hemikaliju koja se slabo veže na ploči 1. Laboratorij mora utvrditi koncentraciju IC_{50} na osnovu svoje baze podataka o prošlim kontrolama. Očekuje se da će ta vrijednost biti slična vrijednosti uočenoj u validacijskim studijama (vidjeti tabelu 1.).

Tabela 4 **Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test konkurentskog vezivanja cijele krive koncentracija referentnog estrogena i kontrola (ploča 1)**

	1	***2***	***3***	***4***	***5***	***6***	***7***	***8***	***9***	***10***	***11***	***12***
	Kontrola s puferom i pozitivna kontrola (E2)			**Slabo pozitivna hemikalija (Noretinodrel)**			**Negativna kontrola (OTES)**			**TB i NSB**		
A	Slijepa proba			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (kontrola s rastvaračem) (2,05-postotni DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1 \times 10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					

E	E2 (1×10^{-9} M)	$1 \times 10^{-6,5}$ M	1×10^{-6} M	Kontrola s puferom
F	E2 ($1 \times 10^{-8,5}$ M)	1×10^{-6} M	1×10^{-5} M	
G	E2 (1×10^{-8} M)	$1 \times 10^{-5,5}$ M	1×10^{-4} M	Slijepa proba (za radioakt.)
H	E2 (1×10^{-7} M)	$1 \times 10^{-4,5}$ M	1×10^{-3} M	

Tabela 5 **Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test konkurentskog vezivanja, dodatne ploče za ispitivane hemikalije (TC) i kontrole na ploči**

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
	Ispitivana hemikalija 1 (TC-1)			**Ispitivana hemikalija 2 (TC-2)**			**Ispitivana hemikalija 3 (TC-3)**			**Kontrole**		
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 ($1 \times 10^{-4,5}$ M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (kontrola s rastvaračem)		

H	TC-1 (1 × 10^{-3} M)	TC-2 (1 × 10^{-3} M)	TC-3 (1 × 10^{-3} M)	
U ovom se primjeru kao hemikalija koja se slabo veže upotrebljava noretinodrel (NE)				

Dovršetak testa konkurentskog vezivanja

Uz izuzeće udubljenja za ukupno vezivanje i slijepe probe (za radioaktivnost), kako je prikazano u tabeli 6., u svaku kadicu treba staviti 50 µl testnog pufera i pomiješati s 10 µl kontrole s rastvaračem, referentnog estrogena (E2), hemikalije koja se slabo veže, hemikalije koja se ne veže ili ispitivanih hemikalija te s 10 µl rastvora [^{3}H]-17β-estradiola od 5 nM. Zatim se svakoj ploči dodaje 30 µl vrlo hladne rastvora receptora i lagano promiješa. RASTVORA receptora hrERα trebala bi biti posljednji reagens koji se dodaje. Mikrotitracione ploče testa treba inkubirati dva sata na sobnoj temperaturi (od 22 do 28 °C).

Tabela 6 **Volumen sastavnica testa za test konkurentskog vezivanja na hrER, mikrotitracione ploče**

Koraci pripreme		**Osim udubljenja za TB**	**Posude sa udubljenjima za TB**	**Slijepa proba (za radioakt.)**
Volumen sastavnica za prethodne reakcijske posude sa udubljenjima i redoslijed dodavanja	Testni pufer sobne temperature	50 µl	60 µl	90 µl
	Neobilježeni E2, hemikalija koja se slabo veže, hemikalija koja se ne veže, rastvarač i ispitivane hemikalija	10 µl	–	–
	[^{3}H]-17β-estradiol koji treba imati konačnu koncentraciju od 0,5 nM (tj. 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl

	Koncentracija receptora hrERα kako je utvrđeno	30 µl	30 µl	–
Ukupni volumen u svakoj testnoj jažici		100 µl	100 µl	100 µl

Zatim treba kvantifikovati [^{3}H]-17β-estradiol vezan na receptore hrERα, nakon odvajanja [^{3}H]-17β-estradiola vezanog na receptore hrERα od slobodnog [^{3}H]-17β-estradiola dodavanjem 100 µl suspenzije vrlo hladnog DCC-a u svaku kadicu, za test vezivanja do zasićenja.
Posude sa udubljenjima G10–12 i H10–12 (utvrđene kao slijepe probe (za radioaktivnost) u tabeli 4.) predstavljaju dpm označenog [^{3}H] estradiola u 10 µl. Alikvot od 10 µl treba direktno dodati scintilacijskoj tečnosti.

Kriterijumi prihvatljivosti

Test vezivanja do zasićenja

Kriva specifičnog vezivanja treba dosegnuti plato kako se upotrebljavaju povećavajuće koncentracije [^{3}H]-17β-estradiola, što ukazuje na zasićenje receptora hrERα ligandom.
Specifično vezivanje pri 0,5 nM [^{3}H]-17β-estradiola treba biti unutar prihvatljivog raspona od 30 % do 50 % prosječne izmjerene ukupne radioaktivnosti dodane u svim ciklusima. Prihvatljiva su povremena manja odstepena od tog raspona, ali ako su ciklusi dosljedno izvan tog raspona ili je određeni ciklus znatno izvan tog raspona, koncentraciju proteina treba prilagoditi i treba ponoviti test zasićenja.
Iz podataka bi trebala nastati linearna Scatchardova kriva.
Nespecifično vezivanje ne bi trebalo biti preveliko. Vrijednost za nespecifično vezivanje obično bi trebala biti <35 % ukupnog vezivanja. Međutim, odnos povremeno može biti veći od tog ograničenja kada se mjere vrlo niski dpm-ovi za najniže koncentracije ispitanog radioaktivno obilježenog 17β-estradiola.

Test konkurentskog vezivanja

Povećavanjem koncentracija neobilježenog 17β-estradiola trebao bi se istisnuti [^{3}H]-17β-estradiol s receptora na način koji je dosljedan konkurentskom vezivanju na jedno mjesto.
Vrijednost IC_{50} za referentni estrogen (tj. 17β-estradiol) treba biti približno jednaka molarnoj koncentraciji [^{3}H]-17β-estradiola uvećanoj za Kd utvrđen u testu vezivanja do zasićenja.
Ukupno specifično vezivanje dosljedno bi trebalo biti unutar prihvatljivog raspona od 40 ± 10 % ako je prosječna izmjerena koncentracija ukupne radioaktivnosti dodane svakoj jažici iznosila 0,5 nM u svim ciklusima. Prihvatljiva su povremena manja odstepena od tog raspona, ali ako su ciklusi dosljedno izvan tog raspona ili je određeni ciklus znatno izvan tog raspona, koncentraciju proteina treba prilagoditi.
Rastvarač ne bi smjelo promijeniti osjetljivost ili obnovljivost testa. Rezultati kontrole s rastvaračem (posude sa udubljenjima TB) uspoređuju se s kontrolom s puferom kako bi se potvrdilo da rastvarač koje se upotrebljava ne utiče na ispitni sistem. Ako rastvarač ne utiče na test, rezultati TB-a i kontrole s puferom trebaju biti uporedivi.
Hemikalija koja se ne veže ne bi trebala istisnuti više od 25 % [^{3}H]-17β-estradiola s receptora hrERα ako se ispituje do 10^{-3} M (OTES) ili 10^{-4} M (DBP).
Kriterijumi uspješnosti razvijeni su za referentni estrogen i dvije hemikalije koje se slabo vežu (npr. noretinodrel, noretindron) upotrebom podataka iz validacione studije za CERI-jev test vezivanja na hrER (Prilog N literaturi pod 2.). Intervali pouzdanosti od 95 % navode se za

srednju vrijednost ±SD (n) svih kontrolnih ciklusa u sva četiri laboratorija koja su učestvovala u validacionoj studiji. Intervali pouzdanosti od 95 % izračunani su za parametre prilagođene krive (tj. vrh, dno, Hillov nagib, logIC_{50}) za referentni estrogen i hemikalije koje se slabo vežu te za $\log_{10}$RBA hemikalija koje se slabo vežu u odnosu na referentni estrogen. U tabeli 1. navedeni su očekivani rasponi za parametre prilagođene krive koji se mogu upotrebljavati kao kriterijumi uspješnosti. U praksi se raspon vrijednosti IC_{50} može neznatno razlikovati u zavisnosti o eksperimentalno izvedenoj vrijednosti Kd smješa receptora i koncentraciji liganda upotrijebljenoj u testu.
Za parametre prilagođene krive za ispitivane hemikalije nisu razvijeni kriterijumi uspješnosti zbog velikog raspona postojećih potencijalnih ispitivanih hemikalija i varijacije u mogućim afinitetima i ishodima (npr. cijela kriva, djelomična kriva, bez prilagođavanja krive). Međutim, pri pregledu rezultata iz svakog ciklusa za ispitivanu hemikaliju treba primijeniti stručnu prosudbu. Treba upotrijebiti dovoljan raspon koncentracija ispitivane hemikalije kako bi se jasno utvrdio vrh (npr. od 90 do 100 % vezivanja) konkurentske krive. Varijabilnost među ponavljanjima pri svakoj koncentraciji ispitivane hemikalije te među tri neistodobna ciklusa treba biti razumna i naučno opravdana. Kontrole iz svakog ciklusa za ispitivanu hemikaliju trebale bi se približiti mjerilima uspješnosti koja su navedena za ovaj CERI-jev test i biti dosljedne podacima o prošlim kontrolama iz svakog odgovarajućeg laboratorija.

ANALIZA PODATAKA

Test vezivanja do zasićenja

Mjere se i ukupno i nespecifično vezivanje. Iz tih se vrijednosti računa specifično vezivanje povećavajućih koncentracija [^{3}H]-17β-estradiola u uslovima ravnoteže tako da se nespecifično vezivanje oduzme od ukupnoga. Grafikon specifičnog vezivanja u odnosu na koncentraciju [^{3}H]-17β-estradiola treba dosegnuti plato za najveće specifično vezivanje koje ukazuje na zasićenje receptora hrERα [^{3}H]-17β-estradiolom. Osim toga, analizom podataka treba evidentirati vezivanje [^{3}H]-17β-estradiola na jedno vezno mjesto s velikim afinitetom. Nespecifično, ukupno i specifično vezivanje treba prikazati na krivoj vezivanja do zasićenja. Za dalju analizu tih podataka treba upotrijebiti nelinearnu regresijsku analizu (npr. BioSoft; McPherson, 1985.; Motulsky, 1995.), s konačnim prikazom podataka u obliku Scatchardove krive.
Analizom podataka treba utvrditi Bmax i Kd samo iz podataka o ukupnom vezivanju uz pretpostavku da je nespecifično vezivanje linearno, osim ako se obrazloži upotreba druge metode. Osim toga, pri utvrđivanju najbolje prilagođavanja treba upotrijebiti zasnivatu regresiju osim ako se obrazloži drugačiji izbor. Treba navesti metodu odabranu za zasnivatu regresiju. Kod utvrđivanja vrijednosti Bmax i Kd iz podataka o vezivanju do zasićenja uvijek treba primijeniti ispravak za potrošnju liganada (npr. upotrebom Swillensove metode iz 1995.).

Test konkurentskog vezivanja

Kriva konkurentskog vezivanja grafički se prikazuje kao specifično vezivanje [^{3}H]-17β-estradiola u odnosu na koncentraciju (log10 jedinice) konkurenta. Koncentracija ispitivane hemikalije koja inhibira 50 % najvećeg specifičnog vezivanja [^{3}H]-17β-estradiola čini vrijednost IC_{50}.
Procjene za vrijednosti log(IC_{50}) za pozitivne kontrole (npr. referentni estrogen i hemikalija koja se slabo veže) treba utvrditi upotrebom primjerenog softvera za nelinearno prilagođavanje krive kako bi se prilagodila Hillova jednačina s četiri parametra (npr. BioSoft; McPherson, 1985.; Motulsky, 1995.). Vrh, dno, nagib i log(IC_{50}) obično ne bi trebalo ograničavati pri prilagođavanju tih kriva. Pri utvrđivanju najbolje prilagođavanja treba upotrijebiti zasnivatu regresiju osim ako se obrazloži drugačiji izbor. Ne treba primijeniti ispravak za potrošnju liganada. Nakon početne analize svaku krivu vezivanja treba pregledati kako bi se osigurala odgovarajuća prilagođavanje modelu. Relativni afinitet vezivanja (RBA) za hemikaliju koja se slabo veže treba izračunati kao

postotak log (IC_{50}) za hemikaliju koja se slabo veže u odnosu na log (IC_{50}) za 17β-estradiol. Rezultate iz pozitivnih kontrola i kontrola s hemikalijama koje se ne vežu treba procijeniti upotrebom kriterijuma uspješnosti testa.
Podatke za sve ispitivane hemikalije treba analizirati upotrebom stupnjevitog pristupa kako bi se osiguralo da su podaci primjereno analizirani i da je svaka kriva konkurentskog vezivanja pravilno klasifikovana. Preporučuje se da se svaki ciklus za ispitivanu hemikaliju prvo podvrgne standardiziranoj analizi podataka koja je identična analizi upotrijebljenoj za referentni estrogen i kontrole hemikalije koja se slabo veže. Kada se to dovrši, treba izvršiti tehnički pregled parametara prilagođene krive i vizualni pregled mjere u kojoj podaci odgovaraju izrađenoj krivoj konkurentskog vezivanja za svaki ciklus. Tokom tog tehničkog pregleda dobar pokazatelj toga da su test i analiza podataka pravilno provedeni uključuju uočavanje smanjenja postotka specifično vezanog [^{3}H]-17β-estradiola koje zavisi o koncentraciji, malu varijabilnost među tehničkim ponavljanjima pri svakoj koncentraciji ispitivane hemikalije i dosljednost u parametrima prilagođavanja između tri ciklusa.

Tumačenje podataka

Pod uslovom da su ispunjeni svi kriterijumi prihvatljivosti, ispitivana hemikalija smatra se hemikalijom koja se veže na receptor hrERα ako se kriva vezivanja može prilagoditi te je najniža tačka na krivoj odgovora u rasponu podataka manja od 50 % (slika 1.).
Pod uslovom da su ispunjeni svi kriterijumi prihvatljivosti, ispitivana hemikalija smatra se hemikalijom koja se ne veže na receptor hrERα:

—ako se kriva vezivanja može prilagoditi i ako je najniža tačka na prilagođenoj krivoj odgovora u rasponu podataka veća od 75 %, ili

—ako se kriva vezivanja ne može prilagoditi i ako je najniži neizglađeni prosječni postotak vezivanja među grupama koncentracija u podacima veći od 75 %.

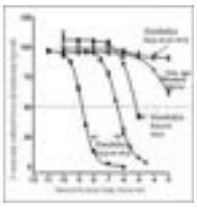
58. Smatra se da ispitivane hemikalije daju dvosmislen odgovor ako se ne ispuni nijedan od prethodno navedenih uslova (npr. najniža tačka na prilagođenoj krivoj odgovora nalazi se između 76 i 51 %).

Tabela 7 **Kriterijumi za dodjelu klasifikovanja na osnovu krive konkurentskog vezivanja za ispitivanu hemikaliju**

Klasifikovanje	Kriterijumi
Hemikalija koja se veže[a]	Može se prilagoditi kriva vezivanja. **Najniža tačka na krivoj odgovora u rasponu podataka manja je od 50 %.**
Hemikalija koja se ne veže[b]	Ako se kriva vezivanja može prilagoditi, **najniža tačka na prilagođenoj krivoj odgovora u rasponu podataka veća je od 75 %**. Ako se kriva vezivanja ne može prilagoditi, **najniži neizglađeni prosječni postotak vezivanja među grupama koncentracija u podacima veći je od 75 %**.

Daje dvosmislen odgovor[c]	Bilo koji ciklus koji se može ispitati, a nije ni hemikalija koja se veže ni koja se ne veže (npr. najniža tačka na prilagođenoj krivoj odgovora nalazi se između 76 i 51 %).

Slika 1 **Primjeri klasifikovanja ispitivanih hemikalija upotrebom krive konkurentskog vezivanja**



Višestruki ciklusi koji se provedu u laboratoriju za ispitivanu hemikaliju kombinujeju se dodjeljivanjem numeričkih vrijednosti svakom ciklusu i određivanjem prosjeka svih ciklusa kako je prikazano u tabeli 8. Rezultati za kombinujene cikluse u svakom laboratoriju upoređuju se s očekivanim klasifikovanjem za svaku ispitivanu hemikaliju.

Tabela 8 **Metoda za klasifikovanje ispitivane hemikalije upotrebom višestrukih ciklusa unutar laboratorija**

Za dodjelu vrijednosti svakom ciklusu:	
Klasifikovanje	**Brojčana vrijednost**
Hemikalija koja se veže	2
Daje dvosmislen odgovor	1
Hemikalija koja se ne veže	0
Za klasifikovanje prosječne brojčane vrijednosti u svim ciklusima:	
Klasifikovanje	**Brojčana vrijednost**
Hemikalija koja se veže	Prosječno ≥ 1,5
Daje dvosmislen odgovor	0,5 ≤ prosječno < 1,5

Hemikalija koja se ne veže	Prosječno < 0,5

IZVJEŠTAJ O ISPITIVANJU

Dodatak 3.2. **RASPORED UDUBLJENJA ZA TEST KONKURENTSKOG VEZIVANJA**

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta posude sa udubljenjima	Šifra posude sa udubljenjima	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (µl)	Vol. pufera (µl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (µl)	Vol. sploče za razrj. (µl)	Konačni volumen (µl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	A1	1	slijepa proba	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	slijepa proba	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	slijepa proba	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	neobilježeni E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	neobilježeni E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	neobilježeni E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	neobilježeni E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

S	C2	2	neobilj eženi E2	S	S2	1,00E -09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	neobilj eženi E2	S	S2	1,00E -09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	neobilj eženi E2	S	S3	3,16E -09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	neobilj eženi E2	S	S3	3,16E -09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D3	3	neobilj eženi E2	S	S3	3,16E -09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	E1	1	neobilj eženi E2	S	S4	1,00E -08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	neobilj eženi E2	S	S4	1,00E -08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	neobilj eženi E2	S	S4	1,00E -08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	neobilj eženi E2	S	S5	3,16E -08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F2	2	neobilj eženi E2	S	S5	3,16E -08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F3	3	neobilj eženi E2	S	S5	3,16E -08	30	50	10	10	100	3,2E-09

S	G1	1	neobilj eženi E2	S	S6	1,00E -07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G2	2	neobilj eženi E2	S	S6	1,00E -07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	neobilj eženi E2	S	S6	1,00E -07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	neobilj eženi E2	S	S7	1,00E -06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	neobilj eženi E2	S	S7	1,00E -06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	neobilj eženi E2	S	S7	1,00E -06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	A4	1	noretin odrel	NE	WP1	1,00E -08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	noretin odrel	NE	WP1	1,00E -08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	noretin odrel	NE	WP1	1,00E -08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	noretin odrel	NE	WP2	1,00E -07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	noretin odrel	NE	WP2	1,00E -07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	noretin odrel	NE	WP2	1,00E -07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	noretin	NE	WP3	3,16E	30	50	10	10	100	3,2E-

			odrel			-07						08
S	C5	2	noretin odrel	NE	WP3	3,16E -07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C6	3	noretin odrel	NE	WP3	3,16E -07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	D4	1	noretin odrel	NE	WP4	1,00E -06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	noretin odrel	NE	WP4	1,00E -06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	noretin odrel	NE	WP4	1,00E -06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	noretin odrel	NE	WP5	3,16E -06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E5	2	noretin odrel	NE	WP5	3,16E -06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E6	3	noretin odrel	NE	WP5	3,16E -06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	F4	1	noretin odrel	NE	WP6	1,00E -05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	noretin odrel	NE	WP6	1,00E -05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	noretin odrel	NE	WP6	1,00E -05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	noretin odrel	NE	WP7	3,16E -05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G5	2	noretin odrel	NE	WP7	3,16E -05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G6	3	noretin odrel	NE	WP7	3,16E -05	30	50	10	10	100	3,2E-06

S	H4	1	noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H5	2	noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H6	3	noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES 1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A8	2	OTES	N	OTES 1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES 1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES 2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES 2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES 2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES 3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES 3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES 3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES 4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES 4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07

S	D9	3	OTES	N	OTES 4	1,00E -06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES 5	1,00E -05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES 5	1,00E -05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E9	3	OTES	N	OTES 5	1,00E -05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F7	1	OTES	N	OTES 6	1,00E -04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES 6	1,00E -04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES 6	1,00E -04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES 7	1,00E -03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES 7	1,00E -03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES 7	1,00E -03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES 8DBP7	1,00E -02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES 88	1,00E -02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES 8	1,00E -02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	A10	1	ukupno vezivanje	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—

S	A11	2	ukupno vezivanje	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	ukupno vezivanje	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	ukupno vezivanje	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
S	B11	5	ukupno vezivanje	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	ukupno vezivanje	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	neob. E2 (visoki)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	neob. E2 (visoki)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	neob. E2 (visoki)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	neob. E2 (visoki)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

S	D11	5	neob. E2 (visoki)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D12	6	neob. E2 (visoki)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	kontr. s puferom	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	kontr. s puferom	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	kontr. s puferom	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	kontr. s puferom	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	kontr. s puferom	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	kontr. s puferom	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*17)	1	sl. proba (za rad.)	radioakt.	H1	—	90	—	10	—	100	—

S	G11 (*17)	2	sl. proba (za rad.)	radioakt.	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12	3	sl. proba (za rad.)	radioakt.	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10	4	sl. proba (za rad.)	radioakt.	H4	—	90	—	10	—	100	—
S	H11	5	sl. proba (za rad.)	radioakt.	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	sl. proba (za rad.)	radioakt.	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	nepoznato 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	nepoznato 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	nepoznato 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	nepoznato 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	nepoznato 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	nepoznato 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	nepoz	U1	3	1,00E	30	50	10	10	100	1,0E-

			nato 1			-07						08
P1	C2	2	nepoz nato 1	U1	3	1,00E -07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	nepoz nato 1	U1	3	1,00E -07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D1	1	nepoz nato 1	U1	4	1,00E -06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	nepoz nato 1	U1	4	1,00E -06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	nepoz nato 1	U1	4	1,00E -06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	nepoz nato 1	U1	5	1,00E -05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	nepoz nato 1	U1	5	1,00E -05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	nepoz nato 1	U1	5	1,00E -05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	nepoz nato 1	U1	6	1,00E -04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	nepoz nato 1	U1	6	1,00E -04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	nepoz nato 1	U1	6	1,00E -04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	nepoz nato 1	U1	7	1,00E -03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	nepoz nato 1	U1	7	1,00E -03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	nepoz nato 1	U1	7	1,00E -03	30	50	10	10	100	1,0E-04

P1	H1	1	nepoznato 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	nepoznato 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H3	3	nepoznato 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	nepoznato 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	nepoznato 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	nepoznato 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	nepoznato 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	nepoznato 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	nepoznato 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	nepoznato 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	nepoznato 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	nepoznato 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	nepoznato 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	nepoznato 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07

P1	D6	3	nepoznato 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	nepoznato 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E5	2	nepoznato 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	nepoznato 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	nepoznato 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	nepoznato 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	nepoznato 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	nepoznato 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	nepoznato 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	nepoznato 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	nepoznato 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	nepoznato 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	nepoznato 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A7	1	nepoznato 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

P1	A8	2	nepoznato 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A9	3	nepoznato 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B7	1	nepoznato 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	nepoznato 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	nepoznato 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	nepoznato 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	nepoznato 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	nepoznato 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	nepoznato 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	nepoznato 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	nepoznato 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	nepoznato 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	nepoznato 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	nepoznato 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

P1	F7	1	nepoznato 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	nepoznato 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F9	3	nepoznato 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	nepoznato 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	nepoznato 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	nepoznato 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	nepoznato 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	nepoznato 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	nepoznato 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	kontr. E2 (max)	S	E2max1	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	kontr. E2 (max)	S	E2max2	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	kontr. E2 (max)	S	E2max3	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	kontr. E2 (IC_{50})	S	E2IC501	$E2IC_{50}$x10	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$

P1	B11	2	kontr. E2 (IC_{50})	S	E2IC502	$E2IC_{50}$x10	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	B12	3	kontr. E2 (IC_{50})	S	E2IC503	$E2IC_{50}$x10	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	C10	1	kontr. NE (max)	S	Nemax1	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	kontr. NE (max)	S	Nemax2	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	kontr. NE (max)	S	Nemax3	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	kontr. NE (IC_{50})	S	NEIC501	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	D11	2	kontr. NE (IC_{50})	S	NEIC502	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	D12	3	kontr. NE (IC_{50})	S	NEIC503	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	E10	1	neob. E2 (visoki)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	neob. E2 (visoki)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	neob. E2 (visoki	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

			)									
P1	F10	4	neob. E2 (visoki)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	neob. E2 (visoki)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	neob. E2 (visoki)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	G10	1	ukupno vezivanje	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	ukupno vezivanje	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	ukupno vezivanje	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
P1	H10	4	ukupno vezivanje	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	ukupno vezivanje	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	ukupno veziva	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—

			nje									

Dodatak 4.

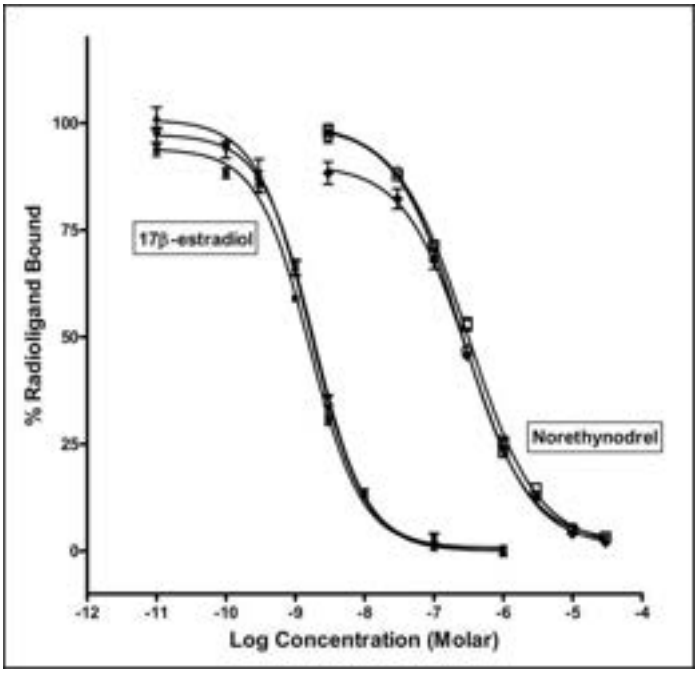
RAZMATRANJA ZA ANALIZU PODATAKA IZ TESTA KONKURENTSKOG VEZIVANJA NA hrER

Testom konkurentskog vezivanja na hrERα mjeri se vezivanje jedne koncentracije [^{3}H]-17β-estradiola u prisutnosti povećavajućih koncentracija ispitivane hemikalije. Kriva konkurentskog vezivanja grafički se prikazuje kao specifično vezivanje [^{3}H]-17β-estradiola u odnosu na koncentraciju (log10 jedinice) konkurenta. Koncentracija ispitivane hemikalije koja inhibira 50 % najvećeg specifičnog vezivanja [^{3}H]-17β-estradiola čini IC_{50}.

Analiza podataka za referentni estrogen i hemikaliju koja se slabo veže (1.)

Podaci iz kontrolnih ciklusa transformiraju se (tj. postotak specifičnog vezivanja [^{3}H]-17β-estradiola i log koncentracija kontrolne hemikalije) radi dalje analize. Procjene za vrijednosti log(IC_{50}) za pozitivne kontrole (npr. referentni estrogen i hemikalija koja se slabo veže) treba utvrditi upotrebom primjerenog softvera za nelinearno prilagođavanje krive kako bi se prilagodila Hillova jednačina s četiri parametra (npr. BioSoft; GraphPad Prism) (2.). Vrh, dno, nagib i log(IC_{50}) obično se mogu ostaviti neograničenima pri prilagođavanju tih kriva. Pri utvrđivanju najbolje prilagođavanja treba upotrijebiti zasnivatu regresiju osim ako se obrazloži drugačiji izbor. Treba navesti metodu odabranu za zasnivatu regresiju. Za FW i CERI-jev test nije bio potreban ispravak za potrošnju liganada, ali po potrebi može se razmotriti njegova upotreba. Nakon početne analize svaku krivu vezivanja treba pregledati kako bi se osigurala odgovarajuća prilagođavanje modelu. Relativni afinitet vezivanja (RBA) za hemikaliju koja se slabo veže može se izračunati kao postotak log (IC_{50}) za hemikaliju koja se slabo veže u odnosu na log (IC_{50}) za 17β-estradiol. Rezultate za pozitivne kontrole i kontrolu s hemikalijom koja se ne veže treba procijeniti upotrebom kriterijuma uspješnosti testa i kriterijuma prihvatljivosti kako je opisano u ovoj ispitnoj metodi, Dodatku 2. (FW test) i Dodatku 3. (CERI-jev test). Primjeri tri ciklusa za referentni estrogen i hemikaliju koja se slabo veže prikazani su na slici 1.

Slika 1. **Primjeri kriva konkurentskog vezivanja za referentni estrogen i kontrolnu hemikaliju koja se slabo veže**



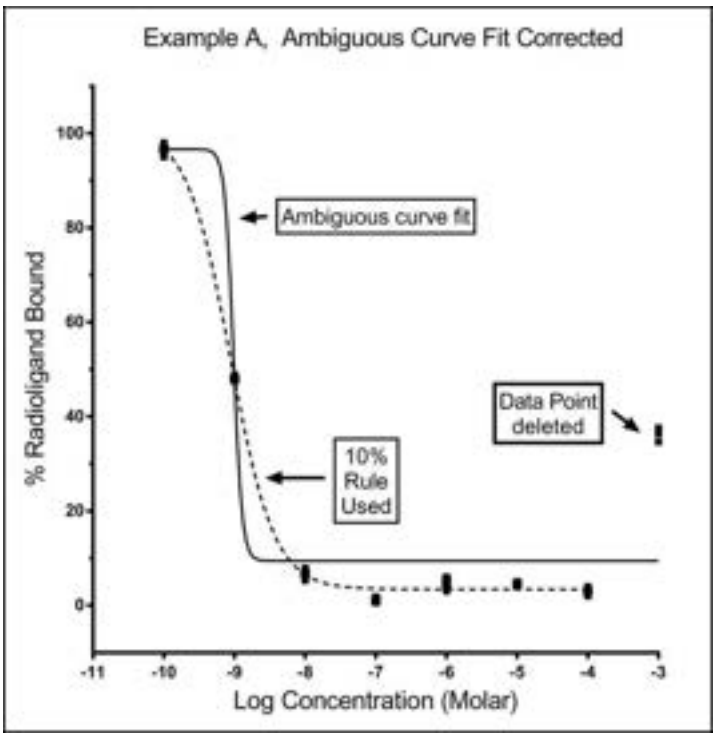
Analiza podataka za ispitivane hemikalije

Podatke za sve ispitivane hemikalije treba analizirati upotrebom stupnjevitog pristupa kako bi se osiguralo da su podaci primjereno analizirani i da je svaka kriva konkurentskog vezivanja pravilno klasifikovana. Svaki ciklus za ispitivanu hemikaliju prvo treba podvrgnuti standardiziranoj analizi podataka koja je identična analizi upotrijebljenoj za referentni estrogen i kontrolne hemikalije koje se slabo vežu. Kada se to dovrši, treba izvršiti tehnički pregled parametara prilagođene krive i vizualni pregled mjere u kojoj podaci odgovaraju izrađenoj krivoj konkurentskog vezivanja za svaki ciklus. Tokom tog tehničkog pregleda dobar pokazatelj toga da su test i analiza podataka pravilno provedeni uključuju uočavanje smanjenja postotka specifično vezanog [^{3}H]-17β-estradiola koje zavisi o koncentraciji, malu varijabilnost među tehničkim ponavljanjima pri svakoj koncentraciji hemikalije i dosljednost u parametrima prilagođavanja među tri ciklusa. Pri pregledu rezultata iz svakog ciklusa za ispitivanu hemikaliju treba primijeniti stručnu prosudbu, a podaci upotrijebljeni za klasifikovanje ispitivane hemikalije kao hemikalije koja se veže ili koja se ne veže trebaju biti naučno opravdani.

Povremeno se mogu pojaviti primjeri podataka za koje je potrebna posebna pažnju kako bi se pravilno analizirali i protumačili podaci o vezivanju na hrER. U prethodnim studijama uočeno je da postoje slučajevi u kojima analiza i tumačenje podataka o konkurentskom vezivanju na receptore mogu biti složeni zbog povećanja postotka specifičnog vezivanja kod ispitivanja hemikalija pri najvišim koncentracijama (slika 2.). To je poznata poteškoća do koje dolazi kod upotrebe protokola za niz testova konkurentskog vezivanja na receptore (3). U tim se slučajevima pri nižim koncentracijama uočava odgovor koji zavisi o koncentraciji, ali kako se koncentracija ispitivane hemikalije približava granici rastvorljivosti prestaje se smanjivati istiskivanje [^{3}H]17β-estradiola. U tim slučajevima podaci za više koncentracije pokazuju da je dosegnuto biološko ograničenje testa. Na primjer, ta je pojava često povezana s netopljivošću hemikalije i taloženjem pri visokim koncentracijama ili može odražavati i prekoračenje sposobnosti ugljenik premazanog dekstranom da veže slobodni radioaktivno obilježeni ligand tokom postupka odvajanja pri najvišim koncentracijama hemikalija. Zadržavanje tih podatkovnih tačaka tokom prilagođavanja podataka o konkurentskom vezivanju u sigmoidnu krivu ponekad može dovesti do pogrešnog klasifikovanja ispitivane hemikalije u pogledu potencijala vezivanja na estrogenski receptor (slika 2.). Kako bi se to izbjeglo, protokol za FW i CERI-jev test

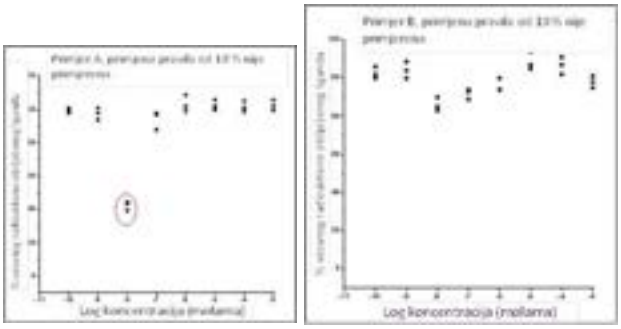
vezivanja na hrER uključuje opciju da se iz analize isključe podatkovne tačke kod kojih je srednja vrijednost ponovljenih uzoraka za postotak specifično vezanog [^{3}H]17β-estradiola za 10 % ili više veća iznad srednje vrijednosti uočene pri nižoj koncentraciji (to se obično naziva pravilo od 10 %). Ovo se pravilo može upotrijebiti samo jednom za određenu krivu i mora ostati dovoljno podataka za najmanje šest koncentracija tako da se krivu može tačno klasifikovati.

***Slika 2.*Primjeri, krive konkurentskog vezivanja s upotrebom pravila od 10 % i bez te upotrebe**



Primjerenu upotrebu pravila od 10 % za ispravak tih kriva treba pažljivo razmotriti i sačuvati za slučajeve u kojima postoji snažna indikacija da je riječ o hemikaliji koja se veže na receptor hrER. Tokom primjene eksperimenta za validacijsku studiju FW testa vezivanja na hrER uočeno je da pravilo od 10 % ponekad ima neplaniranu i nepredviđenu posljedicu. Hemikalije koje nisu bile u interakciji s receptorom (tj. prave hemikalije koje se ne vežu) često su pokazivale varijabilnost u pogledu 100-postotnog vezivanja radioaktivno označenog liganda koja je bila veća od 10 % u cijelom rasponu ispitanih koncentracija. Ako se najniža vrijednost javila pri niskoj koncentraciji, upotrebom pravila od 10 % iz analize bi se potencijalno mogli izbrisati podaci iz svih viših koncentracija iako bi te koncentracije mogle biti korisne u utvrđivanju toga da se hemikalija ne veže. Na slici 3. prikazani su primjeri slučajeva u kojima upotreba pravila od 10 % nije primjerena.

***Slika 3.*Primjeri, podaci o konkurentskom vezivanju gdje nije primjerena upotreba pravila od 10 %**


Log koncentracija (molarna)
Log koncentracija (molarna)

B.71. IN VITRO TESTOVI IZAZIVANJA PREOSJETLJIVOSTI KOZE KOJIMA SE ISPITUJE KLJUČNI DOGAĐAJ AKTIVIRANJA DENDRITIČNIH ĆELIJA U PUTU NASTANKA ŠTETNOG ISHODA (AOP) IZAZIVANJA PREOSJETLJIVOSTI KOŽE

OPŠTI UVOD

Ispitna metoda koja se zasniva na ključnom događaju aktiviranja dendritičnih ćelija

Supstanca koja izaziva preosjetljivost kože je supstanca koja dovodi do alergijske reakcije nakon dodira s kožom, kako je definišena u Globalno usklađenom sistemu klasifikovanja i označivanja hemikalija Ujedinjenih naroda (UN GHS) (1.) te u Uredbi Europske unije (EU) 1272/2008 o klasifikovanju, označavanju i pakovanju supstanci i smješa (Uredba o CLP-u). Postoji opšta suglasnost o ključnim biološkim događajima koji izazivaju preosjetljivost kože. Postojeće spoznaje o hemijskim i biološkim mehanizmima koji su povezani s izazivanjem preosjetljivosti kože sažeto su prikazane u obliku puta nastanka štetnog ishoda (engl. *Adverse Outcome Pathway* – AOP), u okviru OECD-ova programa za AOP (2.), koji se kreće od početnog molekularnog događaja preko međudogađaja do štetnog efekta, tj. alergijskog kontaktnog dermatitisa. U ovom je slučaju početni molekularni događaj (tj. prvi ključni događaj) stvaranje kovalentne veze između elektrofilnih supstanci i nukleofilnih središta u proteinima kože. Drugi se ključni događaj u ovom AOP-u odvija u keratinocitima i uključuje upalne odgovore te promjene u genskoj ekspresiji povezane sa specifičnim ćelijskim signalnim putovima kao što su putovi koji ovise o elementu antioksidacijskog/elektrofilnog odgovora (engl. *antioxidant/electrophile response element*, ARE). Treći je ključni događaj aktiviranje dendritičnih ćelija (DC), koje se obično ocjenjuje prema ekspresiji specifičnih ćelijskih površinskih biljega, kemokina i citokina. Četvrti je ključni događaj aktiviranje i proliferacija T-ćelija, koji se nedirektno ocjenjuju analizom lokalnih limfnih čvorova na miševima (LLNA) (3.).
Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 442E (2017.). U njoj se opisuju *in vitro* analize kojima se ispituju mehanizmi opisani u okviru ključnog događaja aktiviranja dendritičnih ćelija u AOP-u izazivanja preosjetljivosti kože (2.). Ispitna metoda sastoji se od ispitivanja koja treba primijeniti kao pomoć u razlikovanju supstance koje izazivaju preosjetljivost kože od supstance koje ne izazivaju preosjetljivost kože u skladu sa sistemom UN GHS i Uredbom o CLP-u.

U ovoj su ispitnoj metodi opisana sljedeća ispitivanja:

— test aktiviranja ljudske ćelijske linije (h-CLAT),

— test aktiviranja ćelijske linije U937 (U-SENS™),

— test reporterskog gena interleukin 8 (test IL-8 Luc).

Ispitivanja uključena u ovu ispitnu metodu i odgovarajuću smjernicu OECD-a za ispitivanje mogu se razlikovati u odnosu na postupak koji se upotrebljava za dobijanje podataka i izmjerenih očitanja, ali se mogu neselektivno upotrebljavati za ispunjavanje zahtjeva zemalja u pogledu rezultata ispitivanja o ključnom događaju aktiviranja dendritičnih ćelija u AOP-u izazivanja preosjetljivosti kože, uz ostvarivanje koristi od OECD-ova uzajamnog prihvaćanja podataka.

Kontekst i načela ispitivanja uključenih u ispitnu metodu koja se zasniva na ključnom događaju

U procjenama izazivanja preosjetljivosti kože tradicionalno se upotrebljavaju laboratorijske životinje. Klasičnim metodama u kojima se upotrebljavaju zamorci, a to su Magnusson–

Kligmanov maksimizacijski test sa zamorcima (GMPT) i Buehlerov test (ispitna metoda B.6. (4.)), ocjenjuje se i faza indukcije i faza elicitacije izazivanja preosjetljivosti kože. Ispitivanjima na miševima, tj. analizom LLNA (ispitna metoda B.42. (3.)) i njenim dvjema inačicama u kojima se ne upotrebljavaju radioaktivni izrastvori, LLNA: DA (ispitna metoda B.50. (5.)) te LLNA: BrdU-ELISA (ispitna metoda B.51. (6.)), ispituje se isključivo odgovor u fazi indukcije i isto su tako prihvaćene jer omogućuju prednost u odnosu na ispitivanja na zamorcima u smislu dobrobiti životinja s objektivnim mjerenjem faze indukcije izazivanja preosjetljivosti kože.
Nedavno su prihvaćene *in chemico* i *in vitro* ispitne metode koje se baziraju na mehanističkom pristupu kojima se ispituje prvi ključni događaj (ispitna metoda B.59.; test direktne reaktivnosti peptida (7.)) i drugi ključni događaj (ispitna metoda B.60.; test luciferaze ARE-Nrf2 (8.)) u AOP-u izazivanja preosjetljivosti kože kako bi se pridonijelo ocjenjivanju potencijala opasnosti hemikalija da izazovu preosjetljivost kože.
Ispitivanjima opisanima u ovoj ispitnoj metodi kvantificira se promjena u ekspresiji ćelijskih površinskih biljega povezanih s procesom aktiviranja monocita i dendritičnih ćelija nakon izlaganja supstancama koje izazivaju preosjetljivost (npr. CD54, CD86) ili promjene ekspresije IL-8, citokina povezanog s aktiviranjem dendritičnih ćelija. Postoje izvještaja o tome da supstance koje izazivaju preosjetljivost kože indukujeju ekspresiju ćelijskih membranskih biljega, kao što su CD40, CD54, CD80, CD83 i CD86, povrh indukovanja proupalnih citokina, kao što su IL-1β i TNF-α, i nekoliko kemokina, uključujući IL-8 (CXCL8) i CCL3 (9., 10, 11. i 12.), povezanih s aktiviranjem dendritičnih ćelija (2.).
Međutim, budući da je aktiviranje dendritičnih ćelija samo jedan ključni događaj AOP-a izazivanja preosjetljivosti kože (2. i 13.), informacije dobijene ispitivanjima kojima se mjere samo biljezi aktiviranja dendritičnih ćelija možda neće biti dovoljne za donošenje zaključka o prisustvu ili odsustvu potencijala hemikalija da izazovu preosjetljivost kože. Stoga se predlaže da podaci dobijeni ispitivanjima opisanima u ovoj ispitnoj metodi služe kao pomoć u razlikovanju supstance koje izazivaju preosjetljivost kože (kategorija 1. prema sistemu UN GHS/Uredbi o CLP-u) od supstance koje ne izazivaju preosjetljivost kože kada se upotrebljavaju u okviru integriranih pristupa ispitivanju i procjeni (IATA), zajedno s ostalim relevantnim dodatnim informacijama, npr. onima dobijenima *in vitro* analizama kojima se ispituju drugi ključni događaji AOP-a izazivanja preosjetljivosti kože te metodama koje ne uključuju ispitivanje, kao i primjenom analogije s hemijski analognim supstancama (13.). Primjeri upotrebe podataka dobijanje ovim ispitivanjima u okviru utvrđenih pristupa, tj. pristupa standardiziranih i u pogledu skupa korištenih izvora informacija i postupka primijenjenog na podatke kako bi se dobila predviđanja, objavljeni su (13.) i mogu se upotrebljavati kao korisni elementi u okviru IATA-e.
Ispitivanja opisana u ovoj ispitnoj metodi ne mogu se upotrijebiti kao jedina metoda za klasifikovanje supstance koje izazivaju preosjetljivost kože u potkategorije 1.A i 1.B kako su definisane u sistemu UN GHS/Uredbi o CLP-u (u slučaju tijela koja primjenjuju te dvije neobavezne potkategorije) ni za predviđanje njihove jakosti pri donošenju odluka o ocjeni sigurnosti. Međutim, u zavisnosti o regulatornom okviru pozitivni rezultati dobijeni ovim metodama mogu se samostalno upotrijebiti za klasifikovanje hemikalije u kategoriju 1. prema sistemu UN GHS/Uredbi o CLP-u.
U ovoj se ispitnoj metodi izraz „ispitivana hemikalija” upotrebljava za označivanje onoga što se ispituje te se ne odnosi na primjenjivost ispitivanja na ispitivanje supstance s jednim sastojkom, supstance s više sastojaka i/ili smjesa. Trenutno su dostupne ograničene informacije o primjenjivosti ispitivanja na supstance s više sastojaka/smješe (14. i 15.). Uprkos tome, ispitivanja su tehnički primjenjiva i za ispitivanje supstance s više sastojaka i smjesa. Međutim, prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smješi radi dobijanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smješe. Osim toga, kada se ispituju supstance s više sastojaka ili smješe, trebalo bi razmotriti

moguću interferenciju citotoksične komponente s uočenim odgovorima.

Dodatak 1. IZAZIVANJE PREOSJETLJIVOSTI KOŽE IN VITRO: TEST AKTIVIRANJA LJUDSKE ĆELIJSKE LINIJE (H-CLAT)

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

Testom h-CLAT kvantificiraju se promjene u ekspresiji ćelijskih površinskih biljega povezanih s procesom aktiviranja monocita i dendritičnih ćelija (DC) (tj. CD86 i CD54) kod ljudske ćelijske linije monocitne leuhemije THP-1 nakon izlaganja supstancama koje izazivaju preosjetljivost (1. i 2.). Izmjerene nivoa ekspresije ćelijskih površinskih biljega CD86 i CD54 zatim se upotrebljavaju kao pomoć u razlikovanju supstance koje izazivaju preosjetljivost kože od supstance koje ne izazivaju preosjetljivost kože.

Test h-CLAT ocijenjen je u validacionoj studiji kojom je koordinirao Referentni laboratorij Europske unije za alternative ispitivanju na životinjama (EURL ECVAM) i kasnijem neu zavisnostim stručnom pregledu koji je sproveo EURL ECVAM-ov Naučni savjetodavni odbor (ESAC). Uzimajući u obzir sve dostupne dokaze i informacije regulatornih tijela i dionika, EURL ECVAM preporučio je da se test h-CLAT (3.) primjenjuje u okviru IATA-e kao pomoć u razlikovanju supstance koje izazivaju preosjetljivost od supstance koje ne izazivaju preosjetljivost u svrhu klasifikovanja i označivanja prema opasnosti. U literaturi su navedeni primjeri upotrebe podataka dobijanje testom h-CLAT u kombinaciji s ostalim informacijama (4., 5., 6., 7., 8., 9., 10. i 11.).

Pokazalo se da se test h-CLAT može prenijeti u laboratorije koji imaju iskustva s tehnikama ćelijskih kultura i analizom protačnom citometrijom. Može se očekivati da će za predviđanja donesena s pomoću ovog testa nivoa obnovljivosti unutar jedne laboratorije i između više laboratorija biti reda veličine 80 % (3. i 12.). Rezultati dobijeni u validacionoj studiji (13.) i drugim objavljenim studijama (14.) ukupno pokazuju da, u u poređenju s rezultatima analize LLNA, tačnost u razlikovanju supstance koje izazivaju preosjetljivost kože (tj. kategorija 1. prema sistemu UN GHS/Uredbi o CLP-u) od supstance koje ne izazivaju preosjetljivost iznosi 85 % (N = 142), uz osjetljivost od 93 % (94/101) i specifičnost od 66 % (27/41) (na osnovu ponovne analize EURL ECVAM-a (12.), uzimajući u obzir sve postojeće podatke i ne uzimajući u obzir negativne rezultate za hemikalije čiji je Log Kow veći od 3,5,. Veća je vjerovatnost da će se testom h-CLAT dobiti lažno negativna predviđanja za hemikalije koje pokazuju nisku do umjerenu jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (tj. potkategorija 1.B prema sistemu UN GHS/Uredbi o CLP-u) nego za hemikalije koje pokazuju visoku jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (tj. potkategorija 1.A prema sistemu UN GHS/Uredbi o CLP-u) (4., 13. i 15.). Prethodno navedene informacije upućuju na korisnost metode h-CLAT kao elementa koji pridonosi identifikaciji opasnosti od izazivanja preosjetljivosti kože. Međutim, navedene vrijednosti koje se odnose na tačnost metode h-CLAT kao samostalnog testa samo su okvirne jer je tu metodu potrebno kombinujeti s drugim izvorima informacija u kontekstu IATA-e Nadalje, pri ocjenjivanju metoda ispitivanja preosjetljivosti kože koje ne uključuju eksperimente na životinjama potrebno je imati na umu da ispitivanje LLNA i druga ispitivanja na životinjama možda neće u potpunosti odražavati situaciju kod ljudi.

Trenutno dostupni podaci pokazuju da se metoda h-CLAT može primijeniti za ispitivanje hemikalija koje obuhvataju različite organske funkcionalne grupe, mehanizme reakcije, jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (kako je utvrđena istraživanjima *in vivo*) te fizičko-hemijska svojstva. Metoda h-CLAT primjenjiva je na ispitivane hemikalije koje su rastvorive ili tvore stabilnu disperziju (tj. koloid ili suspenziju u kojoj se ispitivana hemikalija ne taloži ili ne odvaja od rastvarača/nosača stvarajući različite faze) u odgovarajućem rastvraču/nosač Ispitivane hemikalije čiji je Log Kow veći od 3,5 obično daju lažno negativne rezultate. Stoga negativne rezultate s ispitivanim hemikalijama čiji je Log Kow veći od 3,5 ne treba razmatrati. Međutim,

pozitivni rezultati dobijeni s ispitivanim hemikalijama čiji je Log Kow veći od 3,5 ipak se mogu upotrijebiti kao pomoć u identifikaciji ispitivane hemikalije kao supstanci koja izaziva preosjetljivost kože. Nadalje, zbog ograničene metaboličke sposobnosti upotrijebljene ćelijske linije (16.) i uslova eksperimenta prohapteni (tj. supstance koje zahtijevaju enzimsku aktivaciju, na primjer enzimima P450) i prehapteni (tj. supstance koje se aktiviraju oksidacijom), posebno oni sa sporom stopom oksidacije, isto tako mogu dati negativne rezultate u testu h-CLAT (15.). Testom h-CLAT mogu se ocijeniti fluorescentne ispitivane hemikalije (17.), ali snažne fluorescentne ispitivane hemikalije koje emitiraju na istoj valnoj dužini kao i fluorescein izotiocijanat (FITC) ili propidijev jodid (PI) ometat će otkrivanje protačnom citometrijom i stoga se ne mogu tačno ocijeniti upotrebom protutijela konjugiranih FITC-om ili propidijeva jodida. U tom se slučaju mogu upotrijebiti druga protutijela označena fluorokromom ili drugi biljezi citotoksičnosti pod uslovom da se može dokazati da daju slične rezultate kao i protutijela označena FITC-om ili propidijev jodid, npr. ispitivanjem supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti u Dodatku 1.2. S obzirom na navedeno, negativne rezultate trebalo bi tumačiti u kontekstu navedenih ograničenja i zajedno s drugim izvorima informacija u okviru IATA-e. U slučajevima u kojima postoje dokazi da se metoda h-CLAT ne može primijeniti za ispitivanje drugih specifičnih kategorija ispitivanih hemikalija, tu metodu ne bi trebalo upotrebljavati za te specifične kategorije.

Kao što je opisano, metoda h-CLAT pomaže u razlikovanju supstance koje izazivaju preosjetljivost kože od supstance koje ne izazivaju preosjetljivost. Međutim, ako se upotrebljava u okviru integriranih pristupa kao što je IATA, mogla bi pridonijeti i procjeni jačine izazivanja preosjetljivosti (4., 5. i 9.). Ipak, kako bi se moglo utvrditi na koji bi način rezultati dobijeni metodom h-CLAT mogli pomoći u toj procjeni, potreban je dodatan rad koji će se po mogućnosti bazirati na podacima dobijenima na ljudima.

NAČELO ISPITIVANJA

Metoda h-CLAT je *in vitro* analiza kojom se kvantificiraju promjene u ekspresiji ćelijskih površinskih biljega (tj. CD86 i CD54) na ljudskoj staničnoj liniji monocitne leuhemije, ćelijama THP-1, nakon 24-satnog izlaganja ispitivanoj hemikaliji. Te površinske molekule tipični su biljezi aktiviranja monocitnog THP-1 i mogu oponašati aktiviranje dendritičnih ćelija, koje ima ključnu ulogu u stimulaciji T-ćelija. Promjene u ekspresiji površinskih biljega mjere se protačnom citometrijom nakon bojenja ćelija protutijelima označenima fluorokromom. Istovremeno se sprovodi i mjerenje citotoksičnosti kako bi se procijenilo dolazi li do povećanja ekspresije površinskih biljega pri subcitotoksičnim koncentracijama. Računa se relativni intenzitet fluorescencije površinskih biljega u u poređenju s kontrolom s rastvaračem/nosačem te se on upotrebljava u modelu predviđanja kao pomoć u razlikovanju supstance koje izazivaju preosjetljivost od supstance koje ne izazivaju preosjetljivost.

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

Prije rutinske primjene ispitivanja opisanog u ovom Dodatku ispitnoj metodi B.71. laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost upotrebom deset supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti navedenih u Dodatku 1.2. Osim toga, korisnici ispitivanja trebaju održavati bazu prošlih podataka dobijanje provjerama reaktivnosti te s pozitivnim kontrolama i kontrolama s rastvaračem/nosačem i trebaju se koristiti tim podacima kako bi potvrdili da je njihov laboratorij održao obnovljivost ispitivanja tokom vremena.

POSTUPAK

Ovaj se test zasniva na protokolu h-CLAT DB-ALM (usluga baze podataka o alternativnim metodama eksperimentima na životinjama) br. 158 (18.), koji je upotrijebljen u validacionoj

studiji kojom je koordinirao EURL ECVAM. Preporučuje se primjena tog protokola pri sprovođenju i primjeni metode h-CLAT u laboratoriju. U nastavku su opisane glavne sastojci i postupci za metodu h-CLAT, koja se sastoji od dva koraka: *testa za utvrđivanje doze* i *mjerenja ekspresije CD86/CD54*.

Priprema ćelija

Za sprovođenje metode h-CLAT treba upotrebljavati THP-1, ljudsku ćelijsku liniju monocitne leuhemije. Preporučuje se da se ćelije (TIB-202™) nabave iz kompetentne banke ćelija kao što je American Type Culture Collection.
Ćelije THP-1 uzgajaju se na 37°C s 5 % CO_2 i u vlažnim atmosferskim uslovima u medijumu RPMI-1640 obogaćenom s 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS), 0,05 mM 2-merkaptoetanola, 100 jedinica/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina. Može se izbjeći upotreba penicilina i streptomicina u medijumu za uzgoj kulture. Međutim, korisnici u tim slučajevima trebaju potvrditi da izostanak antibiotika u medijumu za uzgoj kulture ne utiče na rezultate, na primjer, ispitivanjem supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti navedenih u Dodatku 1.2. U svakom slučaju, dobru praksu za održavanje ćelijskih kultura treba poštovati neu zavisnosti o prisustvu ili odsustvu antibiotika u medijumu za uzgoj kultura kako bi se smanjio rizik od kontaminacije. Ćelije THP-1 rutinski se nasađuju svaka 2–3 dana pri gustine od 0,1 do 0,2 × 10^6 ćelija/ml. Trebaju se održavati pri gustine od 0,1 do 1,0 × 10^6 ćelija/ml. Prije njihove upotrebe za ispitivanje treba provjeriti ispunjavaju li ćelije zadane kriterijume provjerom reaktivnosti. Reaktivnost ćelija treba provjeriti upotrebom pozitivnih kontrola, 2,4-dinitrohlorbenzena (DNCB) (CAS br. 97-00-7, čistoće ≥ 99 %) i niklova sulfata ($NiSO_4$) (CAS br. 10101-97-0, čistoće ≥ 99 %) te negativne kontrole, mliječne kiseline (LA) (CAS br. 50-21-5, čistoće ≥ 85 %), dvije nedelje nakon odmrzavanja. I DNCB i $NiSO_4$ trebaju dati pozitivan odgovor za ćelijske površinske biljege CD86 i CD54, a LA treba dati negativan odgovor za ćelijske površinske biljege CD86 i CD54. Za test se upotrebljavaju samo ćelije koje su prošle provjeru reaktivnosti. Ćelije se mogu razmnožavati do dva mjeseca nakon odmrzavanja. Broj pasaža ne bi trebao biti veći od 30. Reaktivnost treba provjeriti u skladu s pokolonama.
Za ispitivanje se ćelije THP-1 nasađuju pri gustine od 0,1 × 10^6 ćelija/ml ili 0,2 × 10^6 ćelija/ml te se prethodno uzgajaju u tikvicama s kulturom 72 sata ili 48 sati. Važno je da gustina ćelija u tikvici s kulturom neposredno nakon perioda pretkulture bude što dosljednija u svim eksperimentima (upotrebom jednog od dva prethodno opisana uslova za pretkulturu) jer bi gustina ćelija u tikvici s kulturom neposredno nakon pretkulture mogla uticati na ekspresiju CD86/CD54 koju indukujeju alergeni (19.). Na dan ispitivanja ćelije izdvojene iz tikvice s kulturom ponovno se suspendujeju svježim medijem za uzgoj kultura pri gustine od 2 × 10^6 ćelija/ml. Ćelije se zatim distribuiraju na ploču s 24 posude sa udubljenjima s ravnim dnom (500 µl, 1 × 10^6 ćelija/jažici) ili ploču s 96 udubljenja s ravnim dnom (80 µl, 1,6 × 10^5 ćelija/jažici).

Test za utvrđivanje doze

Test za utvrđivanje doze sprovodi se kako bi se utvrdio CV75, odnosno koncentracija ispitivane hemikalije koja dovodi do vijabilnosti ćelija od 75 % (CV) u u poređenju s kontrolom s rastvaračem/nosačem. Vrijednost CV75 upotrebljava se za utvrđivanje koncentracije ispitivane hemikalije za mjerenje ekspresije *CD86/CD54*.

Priprema ispitivanih hemikalija i kontrolnih supstanci

Ispitivane hemikalije i kontrolne supstance pripremaju se na dan ispitivanja. Za metodu h-CLAT ispitivane hemikalije rastvaraju se ili se stabilno dispergiraju u fiziološkoj rastvorini ili medijumu

kao prvoj opciji za rastvarač/nosač ili dimetil sulfoksidu (DMSO, čistoće ≥ 99 %) kao drugoj opciji za rastvarač/nosač ako ispitivana hemikalija nije rastvorljiva ili ne tvori stabilnu disperziju u prethodna dva rastvarača/nosača, tako da se dobije konačna koncentracija od 100 mg/ml (u fiziološkoj rastvorini ili medijumu) ili 500 mg/ml (u DMSO-u). Mogu se upotrebljavati i druga rastvarača/nosači ako se navede dovoljno dobro naučno obrazloženje. Treba uzeti u obzir stabilnost ispitivane hemikalije u konačnom rastvraču/nosaču.
Počevši od 100 mg/ml (u fiziološkoj rastvorini ili medijumu) ili 500 mg/ml (u DMSO-u) glavnih RASTVORA ispitivanih hemikalija, treba sprovesti sljedeće korake razrjeđivanja:

—ako se kao rastvarač/nosač upotrebljava fiziološki rastvor ili medij: priprema se osam glavnih RASTVORA (osam koncentracija) upotrebom odgovarajućeg rastvarača/nosača u dvostrukim serijskim razrjeđivanjima. Te glavne rastvora zatim se dodatno razrjeđuju 50 puta u medijumu za uzgoj kulture (radne rastvora). Ako najveća konačna koncentracija na ploči od 1 000 µg/ml nije toksična, najveću koncentraciju treba ponovno utvrditi sprovođenjem novog ispitivanja citotoksičnosti. Konačna koncentracija na ploči ne bi trebala biti veća od 5 000 µg/ml za ispitivane hemikalije otopljene ili stabilno dispergirane u fiziološkoj rastvorini ili medijumu,

—ako se kao rastvarač/nosač upotrebljava DMSO: priprema se osam glavnih RASTVORA (osam koncentracija) upotrebom odgovarajućeg rastvarača/nosača u dvostrukim serijskim razrjeđivanjima. Te glavne rastvora zatim se dodatno razrjeđuju 250 puta u medijumu za uzgoj kulture (radne rastvora). Konačna koncentracija na ploči ne bi trebala biti veća od 1 000 µg/ml čak i ako ta koncentracija nije toksična.

Radne rastvora naposljetku se koriste za izlaganje dodavanjem volumena radne rastvora koji je jednak volumenu suspenzije ćelija THP-1 na ploči) kako bi se dobilo dodatno dvostruko razrjeđenje (konačni raspon koncentracija na ploči obično iznosi 7,81–1 000 µg/ml).
Kao kontrola s rastvaračem/nosačem u metodi h-CLAT upotrebljava se medij za uzgoj kulture (za ispitivane hemikalije otopljene ili stabilno dispergirane u medijumu ili fiziološkoj rastvorini) ili DMSO (za ispitivane hemikalije otopljene ili stabilno dispergirane u DMSO-u) ispitani pri jednoj konačnoj koncentraciji na ploči od 0,2 %. Kontrola se podvrgava istom razrjeđivanju kao što je ono opisano za radne rastvora.

Primjena ispitivanih hemikalija i kontrolnih supstanci

Medij za uzgoj kulture ili radne rastvora miješaju se u odnosu 1: 1 (v/v) sa suspenzijama ćelija pripremljenima na ploči s 24 posude sa udubljenjima ili s 96 udubljenja s ravnim dnom. Tretirane se ploče potom inkubiraju 24 ± 0,5 h na temperaturi od 37°C s 5 % CO_2. Treba paziti da ne dođe do isparavanja isparljivih ispitivanih hemikalija te unakrsne kontaminacije udubljenja ispitivanim hemikalijama, npr. zatvaranjem ploče prije inkubacije s ispitivanim hemikalijama (20.).

Bojenje propidijevim jodidom (PI)

Nakon izlaganja od 24 ± 0,5 h ćelije se prenose u epruvete za uzorke i prikupljaju centrifugiranjem. Supernatanti se odbacuju, a preostale ćelije ponovno se suspendujeju s 200 µl (u slučaju upotrebe 96 udubljenja) ili 600 µl (u slučaju upotrebe 24 posude sa udubljenjima) fiziološke rastvora puferirane fosfatnim puferom koja sadrži 0,1 % goveđeg serumskog albumina (pufer za bojenje). 200 µl suspenzije ćelija prenosi se na ploču s 96 udubljenja s okruglim dnom (u slučaju upotrebe 96 udubljenja) ili mikroepruvetu (u slučaju upotrebe 24 posude sa udubljenjima) te se dvaput ispire s 200 µl (u slučaju upotrebe 96 udubljenja) ili 600 µl (u slučaju upotrebe 24 posude sa udubljenjima) pufera za bojenje. Ćelije se naposljetku ponovno suspendujeju u puferu za bojenje (npr. 400 µl) i dodaje se RASTVORA propidijeva

jodida (npr. 20 µl) (na primjer, konačna koncentracija propidijeva jodida iznosi 0,625 µg/ml). Mogu se koristiti i drugi biljezi citotoksičnosti, kao što su 7-aminoaktinomicin D (7-AAD), tripansko modrilo ili drugi, ako se može pokazati da alternativna bojila daju slične rezultate kao i propidijev jodid, na primjer, ispitivanjem supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 1.2.

Mjerenje citotoksičnosti protačnom citometrijom i procjena vrijednosti CV75

Apsorbancija propidijeva jodida analizira se upotrebom protačne citometrije s kanalom očitanja FL-3. Očitava se ukupno 10 000 živih ćelija (negativnih na PI). Vijabilnost ćelija može se izračunati tako da se u programu za analizu citometra upotrijebi sljedeća jednačina. Ako je vijabilnost ćelija niska, treba se očitati do 30 000 ćelija, uključujući mrtve ćelije. Umjesto toga, podaci se mogu očitavati jednu minutu nakon početka analize.

$$\text{vijabilnost stanica} = \frac{\text{broj živih stanica}}{\text{ukupan broj očitanih stanica}} \times 100$$

Vrijednost CV75 , tj. koncentracija koja pokazuje preživljavanje ćelija THP-1 od 75 % (citotoksičnost od 25 %), računa se log-linearnom interpolacijom, upotrebom sljedeće jednačine:

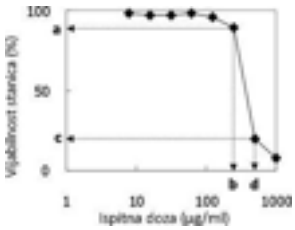
$$\text{Log CV75} = \frac{(75 - \text{c}) \times \text{Log}(\text{b}) - (75 - \text{a}) \times \text{Log}(\text{d})}{\text{a} - \text{c}}$$

pri čemu je:

a najmanja vrijednost vijabilnosti ćelija koja je veća od 75 %;

c najveća vrijednost vijabilnosti ćelija koja je manja od 75 %;

b i d su koncentracije koje pokazuju vrijednost vijabilnosti ćelija a odnosno c.



Mogu se upotrebljavati i drugi pristupi za izvođenje vrijednosti CV75 pod uslovom da se dokaže da to ne utiče na rezultate (npr. ispitivanjem supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti).

Mjerenje ekspresije CD86/CD54

Priprema ispitivanih hemikalija i kontrolnih supstanci

Za rastvaranje ili stabilno dispergiranje ispitivanih hemikalija upotrebljava se odgovarajuće rastvarač/nosač (fiziološki rastvor, medij ili DMSO;. Ispitivane hemikalije prvo se razrjeđuju na koncentraciju koja odgovara vrijednosti koja je 100 puta (za fiziološku rastvor ili medij) ili 500 puta (za DMSO) veća od 1,2 × CV75 utvrđenom u *testu za utvrđivanje doze*. Ako se CV75 ne može utvrditi (tj. u *testu za utvrđivanje doze* nije uočena dovoljna citotoksičnost), kao početnu koncentraciju treba upotrijebiti najvišu koncentraciju ispitivane hemikalije pripremljenu sa svakim rastvaračem/nosačem koja se može rastvoriti ili stabilno dispergirati. Napominje se da

konačna koncentracija na ploči ne bi trebala biti veća od 5 000 µg/ml (u slučaju fiziološke rastvora ili medija) ili 1 000 µg/ml (u slučaju DMSO-a). Zatim se prave serijska razrjeđivanja s faktorom razrjeđivanja od 1,2 upotrebom odgovarajućeg rastvarača/nosača kako bi se dobile glavne rastvora (osam koncentracija u rasponu od 100 × 1,2 × CV75 do 100 × 0,335 × CV75 (za fiziološku rastvor ili medij) ili od 500 × 1,2 × CV75 do 500 × 0,335 × CV75 (za DMSO)) koje se ispituju metodom h-CLAT (primjer plana doziranja vidjeti u protokolu DB-ALM br. 158). Glavne rastvora zatim se dodatno razrjeđuju 50 puta (za fiziološku rastvor ili medij) ili 250 puta (za DMSO) u medijumu za uzgoj kulture (radne rastvora). Te radne rastvora naposljetku se upotrebljavaju za izlaganje uz dodatni faktor dvostrukog konačnog razrjeđivanja na ploči. Ako rezultati ne ispunjavaju kriterijume prihvatljivosti u pogledu vijabilnosti ćelija, *test za utvrđivanje doze* može se ponoviti kako bi se utvrdila preciznija vrijednost CV75. Napominje se da se za mjerenje ekspresije CD86/CD54 mogu upotrebljavati samo ploče s 24 posude sa udubljenjima.
Kontrola s rastvaračem/nosačem se priprema. U metodi h-CLAT kao pozitivna kontrola upotrebljava se DNCB za koji se glavne rastvora pripremaju u DMSO-u i razrjeđuju se. DNCB treba upotrebljavati kao pozitivnu kontrolu za *mjerenje ekspresije CD86/CD54* pri jednoj konačnoj koncentraciji na ploči (obično 4,0 µg/ml). Kako bi se na ploči dobila koncentracija DNCB-a od 4,0 µg/ml, priprema se glavna RASTVORA DNCB-a u DMSO-u od 2 mg/ml, koja se dodatno razrjeđuje 250 puta medijem za uzgoj kulture kako bi se dobila radna RASTVORA od 8 µg/ml. Umjesto toga, kao koncentracija pozitivne kontrole može se upotrebljavati i CV75 DNCB-a, koji se utvrđuje u svakoj ustanovi koja sprovodi ispitivanje. Mogu se upotrijebiti druge prikladne pozitivne kontrole, pod uslovom da su dostupni prošli podaci na osnovu kojih se mogu odrediti uporedivi kriterijumi prihvatljivosti ciklusa. Kod pozitivnih kontrola jedna konačna koncentracija na ploči ne bi trebala biti veća od 5 000 µg/ml (u slučaju fiziološke rastvora ili medija) ili 1 000 µg/ml (u slučaju DMSO-a). Kriterijumi prihvatljivosti ciklusa isti su kao i oni opisani za ispitivanu hemikaliju, osim u slučaju posljednjeg kriterijuma prihvatljivosti jer se pozitivna kontrola ispituje u samo jednoj koncentraciji.

Primjena ispitivanih hemikalija i kontrolnih supstanci

Za svaku ispitivanu hemikaliju i kontrolnu supstancu potreban je jedan eksperiment kako bi se dobilo predviđanje. Svaki se eksperiment sastoji od najmanje dva nezavisna ciklusa za *mjerenje ekspresije CD86/CD54* . Svaki se neovisni ciklus sprovodi na različite dane ili na isti dan ako su za svaki ciklus ispunjeni sljedeći uslovi: a) pripremljene su svježe glavne i radne rastvora ispitivane hemikalije i rastvora s protutijelima i b) upotrebljavaju se neu zavisnosti izdvojene ćelije (tj. ćelije su prikupljene iz različitih tikvica s kulturom); međutim, ćelije mogu biti iz iste pasaže. Ispitivane hemikalije i kontrolne supstance pripremljene kao radne rastvora (500 µl) miješaju se s 500 µl suspendujenih ćelija (1 x 10^6 ćelija) u odnosu 1: 1 te se ćelije inkubiraju 24 ± 0,5 h. U svakom je ciklusu dovoljno jedno ponavljanje za svaku koncentraciju ispitivane hemikalije i kontrolne supstance jer se predviđanje izvodi na osnovu najmanje dva nezavisna ciklusa.

Bojenje i analiza ćelija

Nakon 24 ± 0,5 h izlaganja ćelije se prenose s ploče s 24 posude sa udubljenjima u epruvete za uzorke, prikupljaju se centrifugiranjem i zatim dvaput ispiru s 1 ml pufera za bojenje (ako je potrebno, mogu se sprovesti dodatni koraci ispiranja). Nakon ispiranja ćelije se blokiraju sa 600 µl rastvora za blokiranje (pufer za bojenje koji sadrži 0,01 % (w/v) globulina (Cohnova frakcija II, III, humana; SIGMA, #G2388-10G ili ekvivalentno)) i inkubiraju 15 minuta na 4°C. Nakon blokiranja ćelije se podijele u tri alikvota od 180 µl na ploču s 96 udubljenja s okruglim dnom ili u mikroepruvetu.
Nakon centrifugiranja ćelije se boje s 50 µl protutijela anti-CD86, anti-CD54 ili mišjih protutijela IgG1 (izotip) označenih FITC-om na 4°C u trajanju od 30 minuta. Trebaju se upotrebljavati

protutijela opisana u protokolu h-CLAT DB-ALM br. 158 (18.) razrjeđivanjem u odnosu 3: 25 v/v (za CD86 (BD-PharMingen, #555657; klon: Fun-1)) ili 3: 50 v/v (za CD54 (DAKO, #F7143; klon: 6.5B5) i IgG1 (DAKO, #X0927)) puferom za bojenje. Subjekti koji su razvili ispitivanje utvrdili su da ti faktori razrjeđenja protutijela daju najbolji odnos signala i šuma. Na osnovu iskustva subjekata koji su razvili ispitivanje intenzitet fluorescencije protutijela obično je dosljedan među različitim serijama. Međutim, korisnici mogu razmotriti titraciju protutijela u uslovima svojeg laboratorija kako bi utvrdili koje je koncentracije najbolje upotrebljavati. Mogu se koristiti i druga protutijela anti-CD86 i/ili anti-CD54 označena fluorokromom ako se može pokazati da ona daju slične rezultate kao i protutijela konjugirana FITC-om, na primjer, ispitivanjem supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 1.2. Treba napomenuti da promjena klona ili dobavljača protutijela, kako je opisano u protokolu h-CLAT DB-ALM br. 158 (18.), može uticati na rezultate. Nakon ispiranja sa 150 µl pufera za bojenje dva ili više puta ćelije se ponovno suspendujeju u puferu za bojenje (npr. 400 µl) i dodaje se RASTVORA propidijeva jodida (npr. 20 µl kako bi se dobila konačna koncentracija od 0,625 µg/ml) ili RASTVORA drugog biljega citotoksičnosti. Nivoa ekspresije CD86 i CD54 te vijabilnost ćelija analiziraju se upotrebom protačne citometrije.

PODACI I IZVJEŠTAVANJE

Procjena podataka

Ekspresija CD86 i CD54 analiza se protačnom citometrijom s kanalom očitanja FL-1. Na osnovu geometrijske sredine intenziteta fluorescencije (MFI) relativni intenzitet fluorescencije (RFI) za CD86 i CD54 za ćelije pozitivne kontrole (ctrl) i ćelije tretirane hemikalijama računa se u skladu sa sljedećom jednačinom:

$$\mathrm{RFI} = \frac{\mathrm{MFI}\,\textit{stanica}\,\mathrm{tretiranih\,kemikalijom} - \mathrm{MFI}\,\textit{stanica}}{\mathrm{MFI}\,\textit{stanica}\,\mathrm{kontrole\,tretiranih\,otapalom/nosačem} - \mathrm{MFI}\,\textit{st}}$$

Vijabilnost ćelija iz ćelija kontrole izotipa (ctrl) (koje se boje mišjim protutijelima IgG1 (izotip)) isto se računa prema jednačini.

Model predviđanja

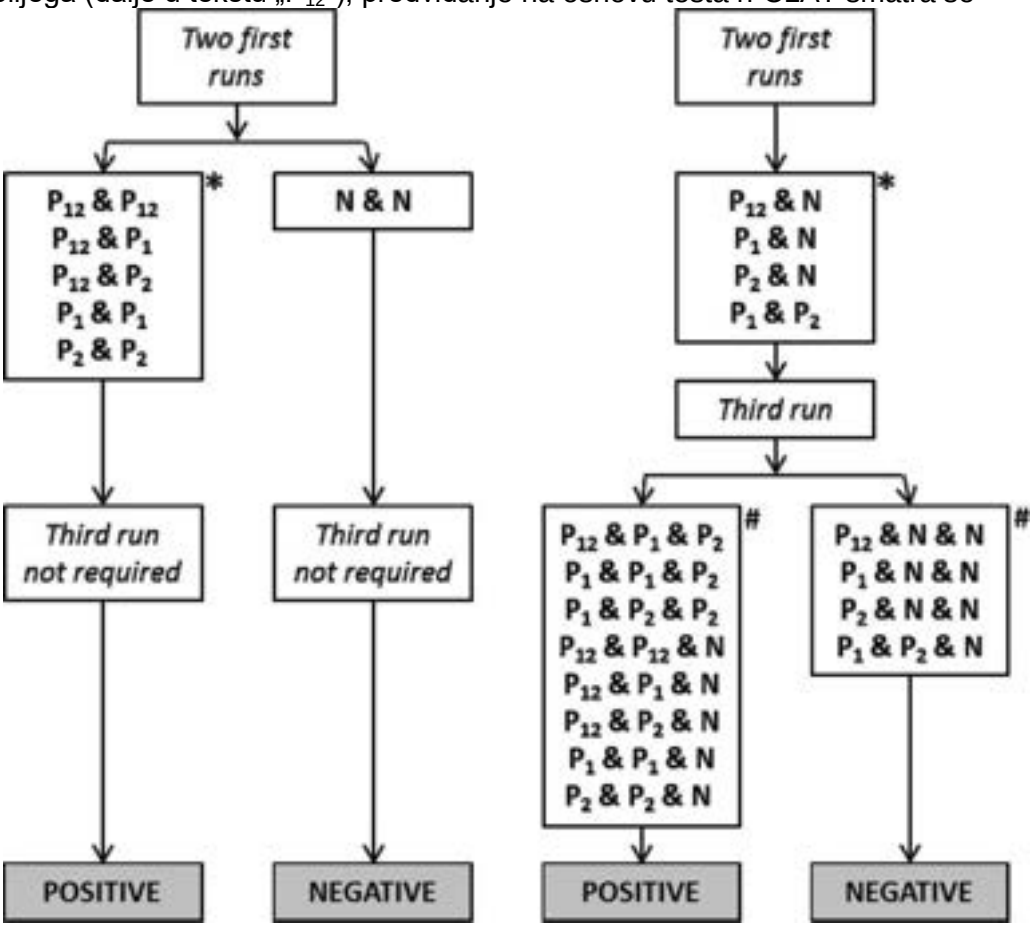
Kod mjerenja ekspresije *CD86/CD54* svaka ispitivana hemikalija ispituje se u najmanje dva nezavisna ciklusa kako bi se izvelo jedno predviđanje (POZITIVNO ili NEGATIVNO). Predviđanje na osnovu testa h-CLAT smatra se POZITIVNIM ako je ispunjen barem jedan od sljedećih uslova u dva od dva nezavisna ciklusa ili u barem dva od tri nezavisna ciklusa; u protivnom se predviđanje na osnovu testa h-CLAT smatra NEGATIVNIM (slika 1.):

—RFI za CD86 jednak je ili veći od 150 % pri svim ispitanim koncentracijama (uz vijabilnost ćelija ≥ 50 %),

—RFI za CD54 jednak je ili veći od 200 % pri svim ispitanim koncentracijama (uz vijabilnost ćelija ≥ 50 %).

Na osnovu prethodno navedenoga, ako su prva dva ciklusa pozitivna za CD86 i/ili su oba pozitivna za CD54, predviđanje na osnovu testa h-CLAT smatra se POZITIVNIM i ne mora se sprovoditi treći ciklus. Slično tomu, ako su prva dva ciklusa negativna za oba biljega, predviđanje na osnovu testa h-CLAT smatra se NEGATIVNIM i nije potreban treći ciklus. Međutim, ako prva dva ciklusa nisu usklađena za barem jedan od biljega (CD54 ili CD86), potreban je treći ciklus i konačno predviđanje zasnivat će se na većinskom rezultatu triju nezavisnih ciklusa (tj. na dva ciklusa od tri provedena). Kad je riječ o tome, treba napomenuti

da je potreban treći ciklus ako se provode dva nezavisna ciklusa i jedan je pozitivan samo za CD86 (dalje u tekstu „P_1"), a drugi je pozitivan samo za CD54 (dalje u tekstu „P_2"). Ako je treći ciklus negativan za oba biljega (dalje u tekstu „N"), predviđanje na osnovu testa h-CLAT smatra se NEGATIVNIM. S druge strane, ako je treći ciklus pozitivan za bilo koji biljeg (P_1 ili P_2) ili za oba biljega (dalje u tekstu „P_{12}"), predviđanje na osnovu testa h-CLAT smatra se POZITIVNIM.



Slika 1.: Model predviđanja koji se upotrebljava u metodi h-CLAT. Predviđanje na osnovu testa h-CLAT trebalo bi razmatrati u okviru IATA-e.

P_1: ciklus u kojem je samo CD86 pozitivan; P_2: ciklus u kojem je samo CD54 pozitivan; P_{12}: ciklus u kojem su i CD86 i CD54 pozitivni; N: ciklus u kojem ni CD86 ni CD54 nisu pozitivni.

* U okvirima su prikazane relevantne kombinacije rezultata iz prva dva ciklusa, neu zavisnosti o redoslijedu kojim se mogu dobiti.

U okvirima su prikazane relevantne kombinacije rezultata iz tri ciklusa na osnovu rezultata dobijanje u prva dva ciklusa prikazana u prethodnom okviru, ali ne odražavaju redoslijed kojim se mogu dobiti.

Za ispitivane hemikalije koje se testom h-CLAT predvide kao POZITIVNE mogu se utvrditi dvije vrijednosti efikasne koncentracije (EC), EC150 za CD86 i EC200 za CD54, tj. koncentracije pri kojima su ispitivane hemikalije indukujele RFI od 150 ili 200. Te bi vrijednosti EC potencijalno mogle pridonijeti procjeni jačine izazivanja preosjetljivosti (9.) ako se upotrebljavaju u okviru integriranih pristupa kao što je IATA (4., 5., 6., 7. i 8.). Mogu se izračunati prema sljedećim jednačinama:

$$EC\ 150\ (za\ CD86) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

EC 200 ($za\ CD$54) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) × (A_{conc} - B_{conc})]

pri čemu je:

A_{conc} = najniža koncentracija u µg/ml kod koje je RFI > 150 (CD86) ili 200 (CD54)

B_{conc} = najviša koncentracija u µg/ml kod koje je RFI < 150 (CD86) ili 200 (CD54)

A_{RFI} = RFI pri najnižoj koncentraciji kod koje je RFI > 150 (CD86) ili 200 (CD54)

B_{RFI} = RFI pri najvišoj koncentraciji kod koje je RFI< 150 (CD86) ili 200 (CD54)

Radi preciznijeg izvođenja vrijednosti EC150 i EC200 možda će biti potrebna tri nezavisna ciklusa za *mjerenje ekspresije CD86/CD54*. Konačne vrijednosti EC150 i EC200 zatim se određuju kao srednja vrijednost EC-ova izračunanih iz tri nezavisna ciklusa. Ako samo dva od tri nezavisna ciklusa ispunjavaju kriterijume za pozitivan rezultata, prihvaća se viša vrijednost od dviju izračunanih vrijednosti EC150 ili EC200.

Kriterijumi prihvatljivosti

Sljedeći bi kriterijumi prihvatljivosti trebali biti ispunjeni kada se primjenjuje metoda h-CLAT (22. i 27.).

—Vijabilnost ćelija u kontroli s medijem i kontrolama s rastvaračem/nosačem trebala bi biti veća od 90 %.

—Kod kontrole s rastvaračem/nosačem, vrijednosti RFI i za CD86 i za CD54 ne bi trebale biti veće od pozitivnog kriterijuma (RFI za CD86 ≥ 150 % i RFI za CD54 ≥ 200 %). Vrijednosti RFI kontrole s rastvaračem/nosačem računaju se upotrebom formula („MFI hemikalije” treba zamijeniti „MFI-jem rastvarača/nosača”, a „MFI rastvarača/nosača” treba zamijeniti „MFI-jem kontrole (s medijem)”).

—I za kontrole s medijem i kontrole s rastvaračem/nosačem odnos MFI-ja i za CD86 i za CD54 u odnosu na kontrolu izotipa treba biti > 105 %.

—Kod pozitivne kontrole (DNCB), vrijednosti RFI i za CD86 i za CD54 trebaju ispuniti pozitivne kriterijume (RFI za CD86 ≥ 150 i RFI za CD54 ≥ 200), a vijabilnost ćelija treba biti veća od 50 %.

—Kod ispitivane hemikalije vijabilnost ćelija treba biti veća od 50 % u najmanje četiri ispitane koncentracije u svakom ciklusu.

Negativni rezultati prihvatljivi su samo za ispitivane hemikalije koje pokazuju vijabilnost ćelija manju od 90 % pri najvišoj ispitanoj koncentraciji (tj. 1,2 × CV75 u skladu s planom razrjeđivanja). Ako vijabilnost ćelija pri koncentraciji od 1,2 × CV75 iznosi 90 % ili više, negativan rezultat treba odbaciti. U tom se slučaju preporučuje da se pokuša preciznije odrediti izbor doze ponovnim utvrđivanjem vrijednosti CV75. Treba napomenuti da je negativan rezultat prihvatljiv čak i ako je vijabilnost ćelija veća od 90 % ako se kao najveća ispitivana koncentracija ispitivane hemikalije upotrebljava 5 000 µg/ml u fiziološkoj rastvorini (ili medijumu ili drugim rastvaračima/nosačima), 1 000 µg/ml u DMSO-u ili najviša rastvorljiva koncentracija.

Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju trebalo bi da sadrži sljedeće informacije:

Ispitivana hemikalija

Supstanca s jednim sastojkom:

hemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili

InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

fizički izgled, Log Kow, rastvorljivost u vodi, rastvorljivost u DMSO-u, molekularna masa te dodatna relevantna fizičko-hemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.,

obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),

uslovi skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

obrazloženje za izbor rastvarača/nosača za svaku ispitivanu hemikaliju.

Supstanca s više sastojaka, UVCB supstanca i smješa:

opisane koliko god je to moguće npr. hemijskim identitetom (vidjeti prethodno), čistoćom, količinskom zastupljenošću i relevantnim fizičko-hemijskim svojstvima sastojaka (vidjeti prethodno), u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

fizički izgled, rastvorljivost u vodi, rastvorljivost u DMSO-u te dodatna relevantna fizičko-hemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

molekularna masa ili prividna molekularna masa u slučaju smjesa/polimera poznatog sastava ili druge informacije koje su relevantne za sprovođenje studije,

obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),

uslovi skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

obrazloženje za izbor rastvarača/nosača za svaku ispitivanu hemikaliju.

Kontrole

Pozitivna kontrola:

hemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

fizički izgled, Log K_{ow}, rastvorljivost u vodi, rastvorljivost u DMSO-u, molekularna masa te dodatna relevantna fizičko-hemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni i ako je primjenjivo,

čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.,

obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),

uslovi skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

upućivanje na rezultate koji se odnose na prošle pozitivne kontrole i pokazuju primjerenost kriterijuma prihvatljivosti ciklusa, ako je primjenjivo.

Negativna kontrola i kontrola s rastvaračem/nosačem:

hemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.,

fizički izgled, molekularna masa te dodatna relevantna fizičko-hemijska svojstva u slučaju da

su upotrijebljene kontrole s rastvaračem/nosačem koje nisu navedene u smjernici za ispitivanje, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

uslovi skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

obrazloženje za izbor rastvarača/nosača za svaku ispitivanu hemikaliju.

Ispitni uslovi:

naziv i adresa naručitelja, ustanove koja sprovodi ispitivanje i voditelja istraživanja,

opis upotrijebljenog ispitivanja,

upotrijebljena ćelijska linija, uslovi njena skladištenja i izvor (npr. objekt iz kojeg su dobijeni),

upotrijebljena protočna citometrija (npr. model), uključujući upotrijebljene postavke instrumenta, globulin, protutijela i biljege citotoksičnosti,

postupak koji je primijenjen za dokazivanje osposobljenosti laboratorija za izvođenje ispitivanja ispitivanjem supstance koje služe za dokazivanje osposobljenosti te postupak koji je primijenjen za dokazivanje obnovljive primjene ispitivanja tokom vremena, npr. podaci o prošlim kontrolama i/ili prošlim provjerama reaktivnosti.

Kriterijumi prihvatljivosti ispitivanja:

vijabilnost ćelija, vrijednosti MFI i RFI dobijene kontrolom s rastvaračem/nosačem u u poređenju s rasponima prihvatljivosti,

vijabilnost ćelija i vrijednosti RFI dobijene pozitivnom kontrolom u u poređenju s rasponima prihvatljivosti,

vijabilnost ćelija svih ispitanih koncentracija ispitane hemikalije.

Ispitni postupak:

broj upotrijebljenih ciklusa,

koncentracije ispitivane hemikalije, primjena i vrijeme izloženosti (ako je drukčije od preporučenog),

opis primijenjenih kriterijuma ocjenjivanja i odlučivanja,

opis mogućih izmjena ispitnog postupka.

Rezultati:

tablični prikaz podataka, uključujući CV75 (ako je primjenjivo), geometrijski MFI, RFI, vrijednosti vijabilnosti ćelija, vrijednosti EC150/EC200 (ako je primjenjivo) dobijene za ispitivanu hemikaliju i za pozitivnu kontrolu u svakom ciklusu te klasifikacija ispitivane hemikalije prema modelu predviđanja,

opis svih drugih relevantnih zapažanja, ako je primjenjivo.

Rasprava o rezultatima:

rasprava o rezultatima dobijenima metodom h-CLAT,

rasprava o rezultatima ispitivanja u kontekstu IATA-e ako su dostupni drugi relevantni podaci.

Zaključci

Dodatak 1.2. supstance za DOKAZIVANJE TEHNIČKE OSPOSOBLJENOSTI

Prije rutinske primjene ispitivanja opisanog u ovom Dodatku ispitnoj metodi B.71. laboratoriji bi

trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost tako što će za deset supstanci preporučenih u tabeli 1. dobiti očekivano predviđanje na osnovu testa h-CLAT te za najmanje osam od deset supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti dobiti vrijednosti CV75, EC150 i EC200 koje su unutar odgovarajućeg referentnog raspona. Supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti izabrane su tako da predstavljaju niz odgovora povezanih s opasnostima od izazivanja preosjetljivosti kože. Ostali kriterijumi za izbor uključivali su komercijalnu dostupnost supstance te dostupnost visokokvalitetnih *in vivo* referentnih podataka i visokokvalitetnih *in vitro* podataka dobijanje metodom h-CLAT. Isto tako, za metodu h-CLAT dostupni su objavljeni referentni podaci (3. i 14.).

Tabela 1.

Preporučene supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti za primjenu metode h-CLAT

Supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti	**CAS br.**	**Agregatno stanje**	**Predviđanje *in vivo***	**Referentni raspon za CV75 u µg/ml**	**Rezultati testa h-CLAT za CD86 (referentni raspon za EC150 u µg/ml)**	**Rezultati testa h-CLAT za CD54 (referentni raspon za EC200 u µg/ml)**
2,4-dinitrohlorbenzen	97-00-7	Čvrsta supstanca	Supstanca koja izaziva preosjetljivost (ekstremno jaka)	2–12	Pozitivno (0,5–10)	Pozitivno (0,5–15)
4-fenilendiamin	106-50-3	Čvrsta supstanca	Supstanca koja izaziva preosjetljivost (jaka)	5–95	Pozitivno (< 40)	Negativno (> 1,5)
Niklov sulfat	10101-97-0	Čvrsta supstanca	Supstanca koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	30–500	Pozitivno (< 100)	Pozitivno (10–100)
2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	Čvrsta supstanca	Supstanca koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	30–400	Negativno (> 10)	Pozitivno (10–140)
R(+)-limonen	5989-	Tečnosti	Supstanca koja izaziva	> 20	Negativn	Pozitivno

	27-5		preosjetljivost (slaba)		o (> 5)	(< 250)
Imidazolidinil urea	39236-46-9	Čvrsta supstanca	Supstanca koja izaziva preosjetljivost (slaba)	25–100	Pozitivno (20–90)	Pozitivno (20–75)
Izopropanol	67-63-0	Tečnosti	Supstanca koja ne izaziva preosjetljivost	> 5 000	Negativno (> 5 000)	Negativno (> 5 000)
Glicerol	56-81-5	Tečnosti	Supstanca koja ne izaziva preosjetljivost	> 5 000	Negativno (> 5 000)	Negativno (> 5 000)
Mliječna kiselina	50-21-5	Tečnosti	Supstanca koja ne izaziva preosjetljivost	1500-5 000	Negativno (> 5 000)	Negativno (> 5 000)
4-aminobenzojeva kiselina	150-13-0	Čvrsta supstanca	Supstanca koja ne izaziva preosjetljivost	> 1 000	Negativno (> 1 000)	Negativno (> 1 000)
Skraćenice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o hemijskim supstancama.						

Dodatak 2. IZAZIVANJE PREOSJETLJIVOSTI KOŽE *IN VITRO*: TEST AKTIVIRANJA ĆELIJSKE LINIJE U937 (U-SENS™)

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

Testom U-SENS™ kvantificiraju se promjene u ekspresiji ćelijskih površinskih biljega povezanih s procesom aktiviranja monocita i dendritičnih ćelija (DC) (tj. CD86) kod ljudske ćelijske linije histiocitnog limfoma U937, nakon izlaganja supstancama koje izazivaju preosjetljivost (1.). Izmjerene nivoa ekspresije ćelijskih površinskih biljega CD86 kod ćelijske linije U937 zatim se upotrebljavaju kao pomoć u razlikovanju supstance koje izazivaju preosjetljivost kože od supstance koje ne izazivaju preosjetljivost.

Test U-SENS™ ocijenjen je u validacionoj studiji (2.) kojom je koordinirao L'Oreal te ga je kasnije neu zavisnosti stručno pregledao Naučni savjetodavni odbor (ESAC) Referentnog

laboratorija Europske unije za alternative ispitivanju na životinjama (EURL ECVAM) (3.). Uzimajući u obzir sve dostupne dokaze i informacije regulatornih tijela i dionika, EURL ECVAM je preporučio da se test U-SENS™ (4.) primjenjuje u okviru IATA-e kao pomoć u razlikovanju supstance koje izazivaju preosjetljivost od supstance koje ne izazivaju preosjetljivost u svrhu klasifikovanja i označivanja prema opasnosti. U smjernicama za izvještavanje o strukturiranim pristupima integraciji podataka i pojedinačnim izvorima informacija koji se upotrebljavaju u okviru IATA-e za preosjetljivost kože OECD trenutno raspravlja o nizu studija slučaja u kojima se opisuju različite strategije ispitivanja i modeli predviđanja. Jedan od različitih utvrđenih pristupa zasniva se na testu U-SENS (5.). Primjeri upotrebe podataka dobijanje testom U-SENS™ u kombinaciji s ostalim informacijama, uključujući prošle podatke i postojeće valjane podatke dobijene na ljudima (6.) navode se i u drugoj literaturi (4., 5. i 7.).
Pokazalo se da se test U-SENS™ može prenijeti u laboratorije koji imaju iskustva s tehnikama ćelijskih kultura i analizom protačnom citometrijom. Može se očekivati da će za predviđanja donesena s pomoću ovog testa nivoa obnovljivosti unutar jedne laboratorije biti reda veličine 90 %, a između više laboratorija 84 % (8.). Rezultati dobijeni u validacionoj studiji (8.) i drugim objavljenim studijama (1.) ukupno pokazuju da, u u poređenju s rezultatima analize LLNA, tačnost u razlikovanju supstance koje izazivaju preosjetljivost kože (tj. kategorija 1. prema sistemu UN GHS/Uredbi o CLP-u) od supstance koje ne izazivaju preosjetljivost iznosi 86 % (N = 166), uz osjetljivost od 91 % (118/129) i specifičnost od 65 % (24/37). U u poređenju s podacima dobijenima na ljudima, tačnost u razlikovanju supstance koje izazivaju preosjetljivost (tj. kategorija 1. prema sistemu UN GHS/Uredbi o CLP-u) od supstance koje ne izazivaju preosjetljivost iznosi 77 % (N = 101) uz osjetljivost od 100 % (58/58) i specifičnost od 47 % (20/43). U u poređenju s analizom LLNA, veća je vjerovatnost da će se metodom U-SENS™ dobiti lažno negativna predviđanja kod hemikalija koje pokazuju nisku do umjerenu jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (tj. potkategorija 1.B prema sistemu UN GHS/Uredbi o CLP-u) nego kod hemikalija koje pokazuju veliki potencijal izazivanja preosjetljivosti kože (tj. potkategorija 1.A prema sistemu UN GHS/Uredbi o CLP-u). Prethodno navedene informacije upućuju na korisnost testa U-SENS™ kao elementa koji pridonosi identifikaciji opasnosti od izazivanja preosjetljivosti kože. Međutim, navedene vrijednosti koje se odnose na tačnost metode U-SENS™ kao samostalnog testa samo su okvirne jer je taj test potrebno kombinujeti s drugim izvorima informacija u kontekstu IATA-e. Nadalje, pri ocjenjivanju metoda ispitivanja preosjetljivosti kože koje ne uključuju eksperimente na životinjama potrebno je imati na umu da ispitivanje LLNA i druga ispitivanja na životinjama možda neće u potpunosti odražavati situaciju kod ljudi.
Na osnovu podataka koji su trenutno dostupni pokazalo se da je test U-SENS™ primjenjiv na ispitivane hemikalije (uključujući kozmetičke sastojke, npr. konzervanse, površinski aktivne supstance, aktivne supstance, boje) koje obuhvataju različite organske funkcionalne grupe, fizičko-hemijska svojstva, jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (kako je utvrđena u istraživanjima *in vivo*) i spektar mehanizama reakcije za koje je poznato da su povezani s preosjetljivošću kože (tj. Michaelov akceptor, nastanak Schiffovih baza, agens za prijenos acila, bimolekulska nukleofilna supstitucija [SN2] ili nukleofilna aromatska supstitucija [SNAr]). Test U-SENS™ primjenjiv je na ispitivane hemikalije koje su rastvorive ili tvore stabilnu disperziju (tj. koloid ili suspenziju u kojoj se ispitivana hemikalija ne taloži ili ne odvaja od rastvarača/nosača stvarajući različite faze) u odgovarajućem rastvraču/nosaču. Za hemikalije u skupu podataka za koje je navedeno da su prehapteni (tj. supstance koje se aktiviraju oksidacijom) ili prohapteni (tj. supstance koje zahtijevaju enzimsku aktivaciju, na primjer enzimima P450) testom U-SENS™ dobijena su točna predviđanja. Supstance koje djeluju disruptivno na membranu mogu dovesti do lažno pozitivnih rezultata zbog nespecifičnog povećanja ekspresije CD86, s obzirom na to da su tri lažno pozitivna rezultata od njih sedam, u odnosu na referentno klasifikovanje *in vivo*, dale površinski aktivne supstance. Stoga bi pozitivne rezultate dobijene s površinski aktivnim supstancama trebalo uzeti u obzir s oprezom,

dok bi se negativni rezultati i dalje mogli upotrebljavati kao pomoć u identifikaciji ispitivane hemikalije kao supstanca koja ne izaziva preosjetljivost. Testom U-SENS™ mogu se ocijeniti fluorescentne ispitivane hemikalije, ali snažne fluorescentne ispitivane hemikalije koje emitiraju na istoj valnoj dužini kao i fluorescein izotiocijanat (FITC) ili propidijev jodid (PI) ometat će otkrivanje protačnom citometrijom i stoga se ne mogu tačno ocijeniti upotrebom protutijela konjugiranih FITC-om (potencijalni lažno negativni rezultati) ili propidijevim jodidom (ne može se izmjeriti vijabilnost). U tom se slučaju mogu upotrijebiti druga protutijela označena fluorokromom ili drugi biljezi citotoksičnosti pod uslovom da se može dokazati da daju slične rezultate kao i protutijela označena FITC-om ili propidijev jodid npr. ispitivanjem supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 2.2. S obzirom na navedeno, pozitivne rezultate s površinski aktivnim supstancama i negativne rezultate s jako fluorescentnim ispitivanim hemikalijama trebalo bi tumačiti u kontekstu navedenih ograničenja i zajedno s drugim izvorima informacija u okviru IATA-e. U slučajevima u kojima postoje dokazi da se test U-SENS™ ne može primijeniti za ispitivanje drugih specifičnih kategorija ispitivanih hemikalija, taj test ne bi trebalo upotrebljavati za te specifične kategorije.
Kao što je opisano, test U-SENS™ pomaže u razlikovanju supstance koje izazivaju preosjetljivost kože od supstance koje ne izazivaju preosjetljivost. Međutim, ako se upotrebljava u okviru integriranih pristupa kao što je IATA, mogao bi pridonijeti i procjeni jačine izazivanja preosjetljivosti. Ipak, kako bi se moglo utvrditi na koji bi način rezultati dobijeni testom U-SENS™ mogli pomoći u toj procjeni, potreban je dodatan rad, koji će se po mogućnosti bazirati na podacima dobijenima na ljudima.

NAČELO ISPITIVANJA

Test U-SENS™ je analiza *in vitro* kojom se kvantificiraju promjene u ekspresiji ćelijskih površinskih biljega CD86 na ljudskoj staničnoj liniji histiocitnog limfoma, ćelijama U937, nakon izlaganja ispitivanoj hemikaliji 45 ± 3 h. Površinski biljeg CD86 jedan je tipični biljeg aktivacije ćelija U937. Poznato je da je CD86 kostimulacijska molekula koja može oponašati aktiviranje monocita, koje ima ključnu ulogu u stimulaciji T-ćelija. Promjene u ekspresiji ćelijskih površinskih biljega CD86 mjere se protačnom citometrijom nakon bojenja ćelija, obično protutijelima označenima fluorescein izotiocijanatom (FITC). Istovremeno se sprovodi i mjerenje citotoksičnosti (npr. upotrebom propidijeva jodida) kako bi se procijenilo dolazi li do povećanja ekspresije ćelijskih površinskih biljega CD86 pri subcitotoksičnim koncentracijama. Računa se indeks stimulacije (S.I.) ćelijskih površinskih biljega CD86 u u poređenju s kontrolom s rastvaračem/nosačem te se on upotrebljava u modelu predviđanja kao pomoć u razlikovanju supstance koje izazivaju preosjetljivost od supstance koje ne izazivaju preosjetljivost.

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

Prije rutinske primjene ispitivanja opisanog u ovom Dodatku ispitnoj metodi B.71. laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost upotrebom deset supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti navedenih u Dodatku 2.2. u skladu s dobrom praksom za metode *in vitro*. Osim toga, korisnici ispitivanja trebaju održavati bazu prošlih podataka dobijanje provjerama reaktivnosti te s pozitivnim kontrolama i kontrolama s rastvaračem/nosačem i trebaju se koristiti tim podacima kako bi potvrdili da je njihov laboratorij održao obnovljivost ispitivanja tokom vremena.

POSTUPAK

Ovaj se test zasniva na protokolu U-SENS™ DB-ALM (usluga baze podataka o alternativnim metodama eksperimentima na životinjama) br. 183. Pri sprovođenju i primjeni testa U-SENS™

u laboratoriju treba primjenjivati standardne operativne postupke (SOP). Za primjenu testa U-SENS™ može se koristiti i automatizirani sistem ako se može pokazati da on daje slične rezultate, na primjer, ispitivanjem supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 2.2. U nastavku su opisane glavne komponente i postupci za test U-SENS™.

Priprema ćelija

Za primjenu testa U-SENS™ treba upotrebljavati U937, ljudsku ćelijsku liniju histiocitnog limfoma (13.). Ćelije (klon CRL1593.2) treba nabaviti iz kompetentne banke ćelija kao što je American Type Culture Collection.

Ćelije U937 uzgajaju se na 37 °C s 5 % CO_2 i u vlažnim atmosferskim uslovima u medijumu RPMI-1640 obogaćenom s 10 % fetalnog telećeg seruma (FCS), 2 mM L-glutamina, 100 jedinica/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina (potpuni medij). Ćelije U937 rutinski se pasažiraju svaka 2–3 dana pri gustine od 1,5 ili 3 × 10^5 ćelija/ml. Gustina ćelija ne bi trebala biti veća od 2 × 10^6 ćelija/ml, a vijabilnost ćelija izmjerena izbacivanjem tripanskog modrila treba biti ≥ 90 % (ne primjenjuje se kod prve pasaže nakon odmrzavanja). Prije njihove upotrebe za ispitivanje treba provjeriti ispunjava li svaka šarža ćelija, FCS-a ili protutijela zadane kriterijume provjerom reaktivnosti. Provjeru reaktivnosti ćelija treba sprovesti upotrebom pozitivne kontrole, 2,4,6-trinitrobenzensulfonske kiseline (TNBS) (CAS br. 2508-19-2, čistoće ≥ 99 %) i negativne kontrole, mliječne kiseline (LA) (CAS br. 50-21-5, čistoće ≥ 85 %), barem jedan nedelja nakon odmrzavanja. U provjeri reaktivnosti treba ispitati šest konačnih koncentracija za svaku od dviju kontrola (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 µg/ml te LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml). TNBS otopljen u potpunom medijumu treba dati pozitivan odgovor za CD86 koji je povezan s koncentracijom (npr. kada pozitivnu koncentraciju, indeks stimulacije za CD86 ≥ 150, prati koncentracija s rastućim indeksom stimulacije za CD86), a mliječna kiselina otopljena u potpunom medijumu treba dati negativan odgovor za CD86. Za test treba upotrebljavati samo šaržu ćelija koja je dvaput prošla provjeru reaktivnosti. Ćelije se mogu razmnožavati do sedam nedelja nakon odmrzavanja. Broj pasaža ne bi trebao biti veći od 21. Reaktivnost treba provjeriti u skladu s pokolonama.

Za ispitivanje se ćelije U937 nasađuju pri gustine od 3 × 10^5 ćelija/ml ili 6 × 10^5 ćelija/ml te se prethodno uzgajaju u tikvicama s kulturom dva dana ili jedan dan. Mogu se upotrebljavati drugačiji uslovi za prethodni uzgoj od prethodno opisanih ako se navede dovoljno dobro naučno obrazloženje i ako se može pokazati da oni daju slične rezultate, na primjer, ispitivanjem supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 2.2. Na dan ispitivanja ćelije izdvojene iz tikvice s kulturom ponovno se suspendujeju svježim medijem za uzgoj kultura pri gustine od 5 × 10^5 ćelija/ml. Ćelije se zatim distribuiraju na ploču s 96 udubljenja s ravnim dnom sa 100 µl (konačna gustina ćelija od 0,5 × 10^5 ćelija/jažici).

Priprema ispitivanih hemikalija i kontrolnih supstanci

Prije ispitivanja procjenjuje se rastvorljivost. U tu se svrhu ispitivane hemikalije rastvaraju ili stabilno dispergiraju pri koncentraciji od 50 mg/ml u potpunom medijumu kao prvoj opciji za rastvarač ili dimetil sulfoksidu (DMSO, čistoće ≥ 99 %) kao drugoj opciji za rastvarač/nosač ako ispitivana hemikalija nije rastvorljiva u potpunom medijumu kao rastvraču/nosaču. Za ispitivanje se ispitivana hemikalija rastvara do konačne koncentracije od 0,4 mg/ml u potpunom medijumu ako je hemikalija rastvorljiva u tom rastvraču/nosaču. Ako je hemikalija rastvorljiva samo u DMSO-u, hemikalija se rastvara do koncentracije od 50 mg/ml. Mogu se upotrebljavati i druga rastvarača/nosači ako se navede dovoljno dobro naučno obrazloženje. Treba uzeti u obzir stabilnost ispitivane hemikalije u konačnom rastvraču/nosaču.

Ispitivane hemikalije i kontrolne supstance pripremaju se na dan ispitivanja. Budući da se ne sprovodi test za utvrđivanje doze, u prvom ciklusu treba ispitati šest konačnih koncentracija (1, 10, 20, 50, 100 i 200 µg/ml) u odgovarajućem rastvraču/nosaču, odnosno potpunom medijumu

ili 0,4-postotnom DMSO-u u medijumu. U naknadnim se ciklusima pripremaju barem četiri radne rastvora ispitivane hemikalije (tj. barem četiri koncentracije) upotrebom odgovarajućeg rastvarača/nosača, počevši od 0,4 mg/ml u potpunom medijumu ili 50 mg/ml u DMSO-u. Radne rastvora naposljetku se koriste za tretiranje dodavanjem volumena suspenzije ćelija U937 koji je jednak volumenu radne rastvora na ploči kako bi se dobilo dodatno dvostruko razrjeđenje. Koncentracije (najmanje četiri koncentracije) za dalje cikluse izboru se na osnovu pojedinačnih rezultata svih prethodnih ciklusa (8.). Mogu se upotrebljavati konačne koncentracije od 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 i 200 µg/ml. Najveća konačna koncentracija iznosi 200 µg/ml. Ako se pri koncentraciji od 1 µg/ml uoči pozitivna vrijednost za CD86, ocjenjuje se 0,1 µg/ml kako bi se pronašla koncentracija ispitivane hemikalije koja ne indukuje CD86 veći od pozitivnog praga. Za svaki se ciklus računa EC150 (koncentracija pri kojoj hemikalija dosegne pozitivni prag za CD86 od 150 %,) ako se uoči pozitivan odgovor na koncentraciju za CD86. Ako ispitivana hemikalija indukuje pozitivan odgovor za CD86 koji nije povezan s koncentracijom, izračun vrijednosti EC150 možda neće biti relevantan, kako je opisano u protokolu U-SENS™ DB-ALM br. 183 (12.). Za svaki se ciklus računa CV70 (koncentracija pri kojoj hemikalija dosegne prag citotoksičnosti od 70 %) kad god je to moguće. Kako bi se istražio efekat odgovora na koncentraciju kod povećanja CD86, treba odabrati bilo koje koncentracije od upotrebljivih koncentracija koje su ravnodnosno raspoređene od EC150 (ili najveće koncentracije kod koje je CD86 negativan i koja nije citotoksična) do CV70 (ili najveće dopuštene koncentracije, tj. 200 µg/ml). Treba ispitati najmanje četiri koncentracije po ciklusu pri čemu barem dvije koncentracije trebaju biti iste kao i u prethodnom ciklusu radi poređenje.
Kao kontrola s rastvaračem/nosačem u testu U-SENS™ upotrebljava se potpuni medij (za ispitivane hemikalije otopljene ili stabilno dispergirane u potpunom medijumu) ili 0,4-postotni DMSO u potpunom medijumu (za ispitivane hemikalije otopljene ili stabilno dispergirane u DMSO-u).
Kao pozitivna kontrola u testu U-SENS™ upotrebljava se TNBS pripremljen u potpunom medijumu. TNBS treba upotrebljavati kao pozitivnu kontrolu za mjerenje ekspresije CD86 pri jednoj konačnoj koncentraciji na ploči (50 µg/ml) koja daje vijabilnost ćelija > 70 %. Kako bi se na ploči dobila koncentracija TNBS-a od 50 µg/ml, priprema se glavna RASTVORA TNBS-a od 1 M (tj. 293 mg/ml) u potpunom medijumu, koja se dodatno razrjeđuje 2 930 puta potpunim medijem kako bi se dobila radna RASTVORA od 100 µg/ml. Kao negativnu kontrolu treba upotrebljavati mliječnu kiselinu (LA, CAS 50-21-5) koncentracije 200 µg/ml, otopljenu u potpunom medijumu (iz glavne rastvora od 0,4 mg/ml). Na svakoj ploči svakog ciklusa pripremaju se tri ponavljanja netretirane kontrole s potpunim medijem, kontrole s rastvaračem/nosačem, negativne i pozitivne kontrole. Mogu se upotrijebiti druge prikladne pozitivne kontrole, pod uslovom da su dostupni prošli podaci na osnovu kojih se mogu odrediti uporedivi kriterijumi prihvatljivosti ciklusa. Kriterijumi prihvatljivosti ciklusa isti su kao i oni opisani za ispitivanu hemikaliju.

Primjena ispitivanih hemikalija i kontrolnih supstanci

Kontrola s rastvaračem/nosačem ili radne rastvora miješaju se u odnosu 1: 1 (v/v) sa suspenzijama ćelija pripremljenima na ploči s 96 udubljenja s ravnim dnom. Tretirane se ploče potom inkubiraju 45 ± 3 h na temperaturi od 37 °C s 5 % CO_2. Ploče se prije inkubacije zatvaraju polupropusnom membranom kako bi se spriječilo isparavanje isparljivih ispitivanih hemikalija i unakrsna kontaminacija ćelija tretiranih ispitivanim hemikalijama (12.).

Bojenje ćelija

Nakon izlaganja od 45 ± 3 h ćelije se prenose u mikrotitracijsku ploču u obliku slova „v” i prikupljaju centrifugiranjem. Interferencija s topljivošću definiše se kao uočavanje kristala ili

kapljica upotrebom mikroskopa 45 ± 3 h nakon tretiranja (prije bojenja ćelija). Supernatanti se odbacuju, a preostale ćelije ispiru se jednom sa 100 µl vrlo hladne fiziološke rastvora puferirane fosfatnim puferom (PBS) koja sadrži 5 % fetalnog telećeg seruma (pufer za bojenje). Nakon centrifugiranja ćelije se ponovno suspendujeju sa 100 µl pufera za bojenje i boje s 5 µl (npr. 0,25 µg) protutijela anti-CD86 ili mišjih protutijela IgG1 (izotip) označenih FITC-om na 4 °C u trajanju od 30 minuta, zaštićeno od svjetla. Treba upotrebljavati protutijela opisana u protokolu U-SENS™ DB-ALM br. 183 (12.) (za CD86: BD-PharMingen #5556 57 klon: Fun-1, ili Caltag/Invitrogen # MHCD8601 klon: BU63; a za IgG1: BD-PharMingen #5557 48 ili Caltag/Invitrogen # GM4992). Na osnovu iskustva subjekata koji su razvili ispitivanje intenzitet fluorescencije protutijela obično je dosljedan među različitim serijama. Za test se mogu upotrebljavati i drugi klonovi ili dobavljači protutijela koji su prošli provjeru reaktivnosti. Međutim, korisnici mogu razmotriti titraciju protutijela u uslovima svojeg laboratorija kako bi utvrdili koju je koncentraciju najbolje upotrebljavati. Mogu se koristiti i drugi detekcioni sistemi, npr. protutijela anti-CD86 označena fluorokromom, ako se može pokazati da daju slične rezultate kao i protutijela konjugirana FITC-om, na primjer, ispitivanjem supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 2.2. Nakon ispiranja sa 100 µl pufera za bojenje dva puta i jednom sa 100 µl vrlo hladnog PBS-a, ćelije se ponovno suspendujeju u vrlo hladnom PBS-u (npr. 125 µl za uzorke koji se analiziraju ručno u pojedinačnim epruvetama ili 50 µl ako se upotrebljava ploča za automatsko uzorkovanje) i dodaje se RASTVORA propidijeva jodida (konačna koncentracija od 3 µg/ml). Mogu se koristiti i drugi biljezi citotoksičnosti, kao što su 7-aminoaktinomicin D (7-AAD) ili tripansko modrilo, ako se može pokazati da alternativna bojila daju slične rezultate kao i propidijev jodid, na primjer, ispitivanjem supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 2.2.

Analiza protačnom citometrijom

Nivoa ekspresije CD86 i vijabilnost ćelija analiziraju se upotrebom protačne citometrije. Ćelije se prikazuju u tačkastom dijagramu s veličinom (FSC) i granularnošću (SSC) na logaritamskoj skali kako bi se jasno identificirala populacija u prvim vratima R1 i uklonili ostaci. Za svaku se kadicu nastoji očitati ukupno 10 000 ćelija u vratima R1. Ćelije iz istih vrata R1 prikazuju se u FL3 ili FL4/SSC tačkastom dijagramu. Žive ćelije ograničavaju se postavljanjem drugih vrata R2 kojima se izbore populacija ćelija negativnih na propidijev jodid (kanal FL3 ili FL4). Vijabilnost ćelija može se izračunati tako da se u programu za analizu citometra upotrijebi sljedeća jednačina. Ako je vijabilnost ćelija niska, može se očitati do 20 000 ćelija, uključujući mrtve ćelije. Umjesto toga, podaci se mogu očitavati jednu minutu nakon početka analize.

$$vijabilnost\ ćelija\ = \frac{\text{broj živih ćelija}}{\text{ukupan broj očitanih ćelija}} X100$$

Zatim se među tim živim ćelijama ograničenima na vratima R2 (unutar R1) mjeri postotak pozitivnih ćelija u kanalu FL1. Ćelijska površinska ekspresija za CD86 analizira se u FL1/SSC tačkastom dijagramu ograničenom na žive ćelije (R2).

Za posude sa udubljenjima koje sadržiju potpuni medij/IgG1 marker za analizu postavlja se blizu glavne populacije tako da je IgG1 kontrola s potpunim medijem unutar ciljanog područja od 0,6 do 0,9 %.

Interferencija s bojom definiše se kao pomak u tačkastom dijagramu za IgG1 označen FITC-om (IgG1 FL1 Geo srednja vrijednost S.I. ≥ 150 %).

Indeks stimulacije (S.I.) za CD86 za kontrolne ćelije (netretirane ili u 0,4-postotnom DMSO-u) i ćelije tretirane hemikalijama računa se u skladu sa sljedećom jednačinom

$$S.I. = \frac{\%\ \text{CD86} + \text{tretiranih ćelija} - \%\text{IgG1} + \text{tretiranih ćelija}}{\%\text{CD86} + \text{kontrolnih ćelija} - \text{IgG1} + \text{kontrolnih ćelija}}$$

% $IgG1^+$ netretiranih kontrolnih ćelija: odnosi se na postotak pozitivnih ćelija IgG1 u kanalu FL1 koje se definišeju markerom za analizu (prihvaćeni raspon od ≥ 0,6 % do < 1,5 %,) među živim netretiranim ćelijama.

% $IgG1^+/CD86^+$ kontrolnih/tretiranih ćelija: odnosi se na postotak pozitivnih ćelija IgG1/CD86 u kanalu FL1 koji se mjeri bez pomicanja markera za analizu među živim kontrolnim/tretiranim ćelijama.

PODACI I IZVJEŠTAVANJE

Procjena podataka

U testu U-SENS™ računaju se sljedeći parametri: vrijednost CV70, tj. koncentracija koja pokazuje preživljavanje ćelija U937 od 70 % (citotoksičnost od 30 %), i vrijednost EC150, tj. koncentracija pri kojoj su ispitivane hemikalije indukujele indeks stimulacije (S.I.) za CD86 od 150 %.

CV70 se računa log-linearnom interpolacijom, upotrebom sljedeće jednačine:

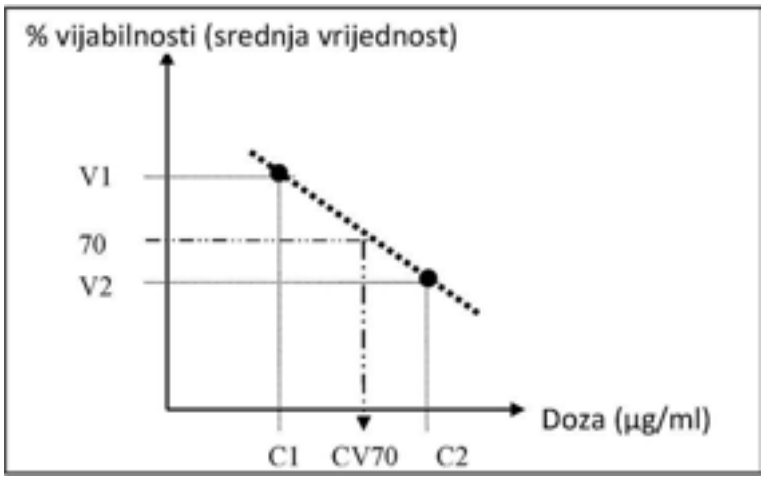
CV70 = C1 + [(V1 – 70) / (V1 – V2) * (C2 – C1)]

pri čemu je:

V1 najmanja vrijednost vijabilnosti ćelija koja je veća od 70 %;

V2 najveća vrijednost vijabilnosti ćelija koja je manja od 70 %;

C1 i C2 su koncentracije koje pokazuju vrijednost vijabilnosti ćelija V1 odnosno V2.



Mogu se upotrebljavati i drugi pristupi za izvođenje vrijednosti CV70 pod uslovom da se dokaže da to ne utiče na rezultate (npr. ispitivanjem supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti).

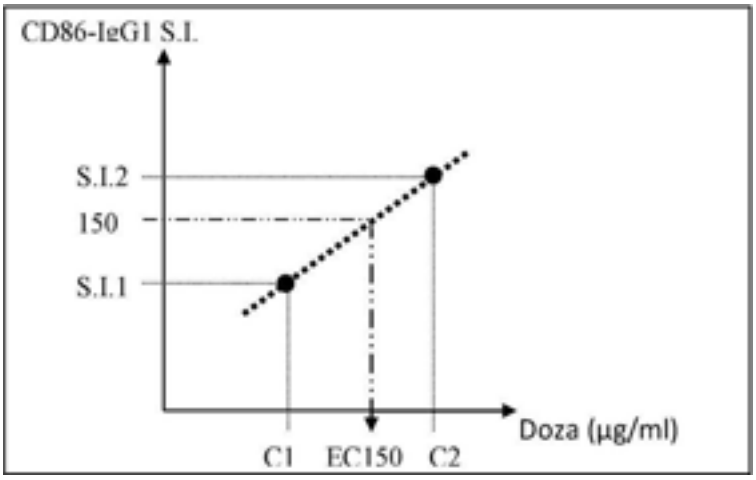
EC150 se računa log-linearnom interpolacijom, upotrebom sljedeće jednačine:

EC150 = C1 + [(150 – S.I.1) / (S.I.2 – S.I.1) * (C2 – C1)]

pri čemu je:

C1 = najviša koncentracija u µg/ml kod koje je S.I. za CD86 < 150 % (S.I. 1)

C2 = najniža koncentracija u µg/ml kod koje je S.I. za CD86 ≥ 150 % (S.I. 2).



Vrijednosti EC150 i CV70 računaju se:

—za svaki ciklus: pojedinačne vrijednosti EC150 i CV70 upotrebljavaju se kao alati za ispitivanje efekta odgovora na koncentraciju kod povećanja CD86

— na osnovu prosječnih vijabilnosti utvrđuje se ukupni CV70,

—na osnovu prosječnog indeksa stimulacije vrijednosti CD86 utvrđuje se ukupni EC150 za ispitivanu hemikaliju za koju se testom U-SENS™ predvidi da je POZITIVNA

Model predviđanja

Kod mjerenja ekspresije CD86 svaka ispitivana hemikalija ispituje se primjenom najmanje četiri koncentracije i u najmanje dva nezavisna ciklusa (koji se provode na različite dane) kako bi se izvelo jedno predviđanje (NEGATIVNO ili POZITIVNO).

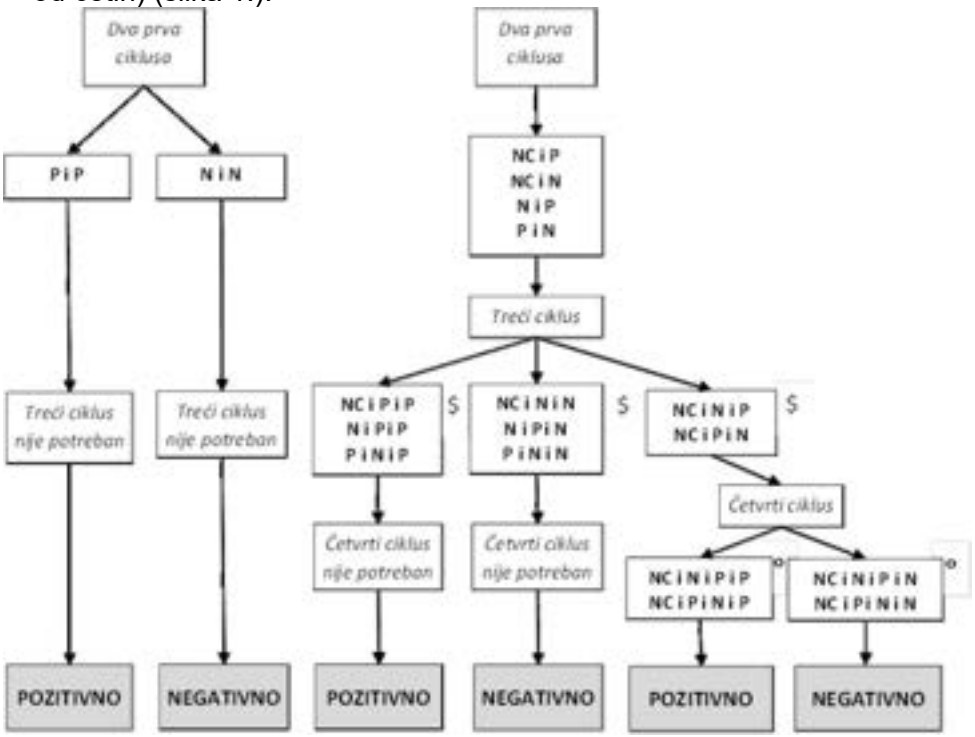
—Pojedinačni zaključak ciklusa U-SENS™ smatra se negativnim (dalje u tekstu „N") ako je indeks stimulacije za CD86 manji od 150 % pri svim koncentracijama koje nisu citotoksične (vijabilnost ćelija ≥ 70 %) i ako se ne uoči nikakva interferencija (citotoksičnost, rastvorljivost: ili boja: ne u zavisnosti o necitotoksičnim koncentracijama pri kojima se uoči interferencija). U svim ostalim slučajevima: pojedinačni zaključak ciklusa U-SENS™ smatra se pozitivnim (dalje u tekstu „P") ako je indeks stimulacije za CD86 jednak ili veći od 150 % i/ili ako se uoče interferencije.

—Predviđanje na osnovu testa U-SENS™ smatra se NEGATIVNIM ako su negativna (N) barem dva nezavisna ciklusa (slika 1.). Ako su prva dva ciklusa negativna (N), predviđanje na osnovu testa U-SENS™ smatra se NEGATIVNIM i ne mora se sprovoditi treći ciklus.

—Predviđanje na osnovu testa U-SENS™ smatra se POZITIVNIM ako su pozitivna (P) barem dva nezavisna ciklusa (slika 1.). Ako su prva dva ciklusa pozitivna (P), predviđanje na osnovu testa U-SENS™ smatra se POZITIVNIM i ne mora se sprovoditi treći ciklus.

—Budući da se ne sprovodi test za utvrđivanje doze primjenjuje se iznimka ako je u prvom ciklusu indeks stimulacije za CD86 jednak ili veći od 150 % samo pri najvišoj necitotoksičnoj koncentraciji. Smatra se da ciklus tada NIJE JEDNOZNAČAN (NC) i u dodatnim ciklusima treba ispitati dodatne koncentracije (između najviše koncentracije koja ne uzrokuje citotoksičnost i najniže koncentracije koja uzrokuje citotoksičnost). Ako se ciklus identificira kao NC, treba sprovesti barem dva dodatna ciklusa, a i četvrti ciklus ako drugi i treći nisu usklađeni (neu zavisnosti N i/ili P). Naknadni ciklusi smatrat će se pozitivnima čak i ako

samo jedna necitotoksična koncentracija pokaže CD86 jednak ili veći od 150 % jer je postavka koncentracije prilagođena za specifičnu ispitivanu hemikaliju. Konačno predviđanje zasnivat će se na većinskom rezultatu iz tri ili četiri pojedinačna ciklusa (tj. dva od tri ili dva od četiri) (slika 1.).



Slika 1.: Model predviđanja koji se upotrebljava u testu U-SENS™. Predviđanje na osnovu testa U-SENS™ trebalo bi razmatrati u okviru IATA-e

N: ciklus u kojem nije uočen pozitivan CD86 ili interferencija.

P: ciklus u kojem je uočen pozitivan CD86 i/ili interferencija.

NC: nije jednoznačno. Nije jednoznačno u prvom ciklusu ako je CD86 pozitivan samo pri najvišoj koncentraciji koja nije citotoksična.

#: pojedinačni zaključak koji nije jednoznačan (NC) koji se pripiše samo prvom ciklusu automatski podrazumijeva da je potreban treći ciklus kako bi se dobio većinski pozitivan (P) ili negativan (N) zaključak u barem dva od tri nezavisna ciklusa.

$: u okvirima su prikazane relevantne kombinacije rezultata iz tri ciklusa na osnovu rezultata dobijanje u prva dva ciklusa prikazana u prethodnom okviru.

°: u okvirima su prikazane relevantne kombinacije rezultata iz četiri ciklusa na osnovu rezultata dobijanje u prva tri ciklusa prikazana u prethodnom okviru.

Kriterijumi prihvatljivosti

Sljedeći bi kriterijumi prihvatljivosti trebali biti ispunjeni kada se primjenjuje test U-SENS™ (12.).

—Na kraju perioda izlaganja od 45 ± 3 h srednja vijabilnost kod tri ponavljanja netretiranih ćelija U937 morala je biti > 90 % i bez uočenog pomaka u ekspresiji CD86. Bazalna ekspresija CD86 kod netretiranih ćelija U937 morala je biti u rasponu od ≥ 2 % do ≤ 25 %.

—Ako se kao rastvarač upotrebljava DMSO, valjanost kontrole s nosačem DMSO procjenjuje se računanjem indeksa stimulacije za DMSO u u poređenju s netretiranim ćelijama i srednja vijabilnost u tri ponavljanja ćelija morala je biti > 90 %. Kontrola s nosačem DMSO valjana je ako je srednja vrijednost S.I. za CD86 u tri ponavljanja bila manja od 250 % srednje vrijednosti S.I. u tri ponavljanja za CD86 netretiranih ćelija U937.

—Ciklusi se smatraju valjanima ako su barem dvije od tri vrijednosti IgG1 netretiranih ćelija U937 bile u rasponu od ≥ 0,6 % do< 1,5 %.

—Istovremeno ispitana negativna kontrola (mliječna kiselina) smatra se valjanom ako su barem dva od tri ponavljanja bila negativna (S.I. za CD86 < 150 %) i necitotoksična (vijabilnost ćelija ≥ 70 %).

—Pozitivna kontrola (TNBS) smatrala se valjanom ako su barem dva od tri ponavljanja bila pozitivna (S.I. za CD86 ≥ 150 %) i necitotoksična (vijabilnost ćelija ≥ 70 %).

Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju trebalo bi da sadrži sljedeće informacije:

Ispitivana hemikalija

Supstanca s jednim sastojkom:

hemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

fizički izgled, rastvorljivost u potpunom medijumu, rastvorljivost u DMSO-u, molekularna masa te dodatna relevantna fizičko-hemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.,

obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),

uslovi skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

obrazloženje za izbor rastvarača/nosača za svaku ispitivanu hemikaliju.

Supstanca s više sastojaka, UVCB supstanca i smješa:

opisane koliko god je to moguće npr. hemijskim identitetom (vidjeti prethodno), čistoćom, količinskom zastupljenošću i relevantnim fizičko-hemijskim svojstvima sastojaka (vidjeti prethodno), u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

fizički izgled, rastvorljivost u potpunom medijumu, rastvorljivost u DMSO-u te dodatna relevantna fizičko-hemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

molekularna masa ili prividna molekularna masa u slučaju smjesa/polimera poznatog sastava ili druge informacije koje su relevantne za sprovođenje studije,

obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),

uslovi skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

obrazloženje za izbor rastvarača/nosača za svaku ispitivanu hemikaliju.

Kontrole

Pozitivna kontrola:

hemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

fizički izgled, rastvorljivost u DMSO-u, molekularna masa te dodatna relevantna fizičko-hemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni i ako je primjenjivo,

čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.,

obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),

uslovi skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

upućivanje na rezultate koji se odnose na prošle pozitivne kontrole i pokazuju primjerenost kriterijuma prihvatljivosti ciklusa, ako je primjenjivo.

Negativna kontrola i kontrola s rastvaračem/nosačem:

hemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.,

fizički izgled, molekularna masa te dodatna relevantna fizičko-hemijska svojstva u slučaju da su upotrijebljene kontrole s rastvaračem/nosačem koje nisu navedene u smjernici za ispitivanje, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

uslovi skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

obrazloženje za izbor rastvarača/nosača za svaku ispitivanu hemikaliju.

Ispitni uslovi:

naziv i adresa naručitelja, ustanove koja sprovodi ispitivanje i voditelja istraživanja,

opis upotrijebljenog ispitivanja,

upotrijebljena ćelijska linija, uslovi njena skladištenja i izvor (npr. objekt iz kojeg su dobijeni),

upotrijebljena protočna citometrija (npr. model), uključujući upotrijebljene postavke instrumenta, protutijela i biljege citotoksičnosti,

postupak koji je primijenjen za dokazivanje osposobljenosti laboratorija za izvođenje ispitivanja ispitivanjem supstance koje služe za dokazivanje osposobljenosti te postupak koji je primijenjen za dokazivanje obnovljive primjene ispitivanja tokom vremena, npr. podaci o prošlim kontrolama i/ili prošlim provjerama reaktivnosti.

Kriterijumi prihvatljivosti ispitivanja:

vijabilnost ćelija i vrijednosti indeksa stimulacije za CD86 dobijene kontrolom s rastvaračem/nosačem u u poređenju s rasponima prihvatljivosti,

vijabilnost ćelija i vrijednosti indeksa stimulacije dobijene pozitivnom kontrolom u u poređenju s rasponima prihvatljivosti,

vijabilnost ćelija svih ispitanih koncentracija ispitane hemikalije.

Ispitni postupak:

broj upotrijebljenih ciklusa,

koncentracije ispitivane hemikalije, primjena i vrijeme izloženosti (ako je drukčije od preporučenog),

trajanje izlaganja,

opis primijenjenih kriterijuma ocjenjivanja i odlučivanja,

opis mogućih izmjena ispitnog postupka.

Rezultati:

tablični prikaz podataka, uključujući CV70 (ako je primjenjivo), indeks stimulacije, vrijednosti vijabilnosti ćelija, vrijednosti EC150 (ako je primjenjivo) dobijene za ispitivanu hemikaliju i za pozitivnu kontrolu u svakom ciklusu te klasifikacija ispitivane hemikalije prema modelu predviđanja,

opis svih drugih relevantnih zapažanja, ako je primjenjivo.

Rasprava o rezultatima:

rasprava o rezultatima dobijenima testom U-SENS™,

rasprava o rezultatima ispitivanja u kontekstu IATA-e ako su dostupni drugi relevantni podaci.

Zaključci

*Dodatak 2.2. Supstance z*A DOKAZIVANJE TEHNIČKE OSPOSOBLJENOSTI

Prije rutinske primjene ispitivanja opisanog u ovom Dodatku ispitnoj metodi B.71. laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost tako što će za deset supstanci preporučenih u tabeli 1. dobiti očekivano predviđanje na osnovu testa U-SENS™ te za najmanje osam od deset supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti dobiti vrijednosti CV70 i EC150 koje su unutar odgovarajućeg referentnog raspona. Supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti izabrane su tako da predstavljaju niz odgovora povezanih s opasnostima od izazivanja preosjetljivosti kože. Ostali kriterijumi za izbor uključivali su to da je supstanca komercijalno dostupna te da su dostupni visokokvalitetni *in vivo* referentni podaci i visokokvalitetni *in vitro* podaci dobijeni testom U-SENS™. Isto tako, za test U-SENS™ dostupni su objavljeni referentni podaci (1. i 8.).

Tabela 1. 1 **Preporučene supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti za izvođenje testa U-SENS™**

Supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti	**CAS br.**	**Agregatno stanje**	**Predviđanje *in vivo***	**U-SENS Rastvarač/nosač**	**U-SENS Referentni raspon za CV70 u µg/ml**	**U-SENS Referentni raspon za EC150 u µg/ml**
4-fenilendiamin	106-50-3	Čvrsta supstanca	Supstanca koja izaziva preosjetljivost (jaka)	Potpuni mediji	< 30	Pozitivno (≤ 10)

2,4,6-trinitrobenzensulfonska kiselina	2508-19-2	Tečnosti	Supstanca koja izaziva preosjetljivost (jaka)	Potpuni medij	> 50	Pozitivno (≤ 50)
Dietil-maleat	141-05-9	Tečnosti	Supstanca koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	DMSO	10–100	Pozitivno (≤ 20)
Rezorcinol	108-46-3	Čvrsta supstanca	Supstanca koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	Potpuni medij	> 100	Pozitivno (≤ 50)
Cinaminski alkohol	104-54-1	Čvrsta supstanca	Supstanca koja izaziva preosjetljivost (slaba)	DMSO	> 100	Pozitivno (10–100)
4-alilanisol	140-67-0	Tečnosti	Supstanca koja izaziva preosjetljivost (slaba)	DMSO	> 100	Pozitivno (< 200)
Saharin	81-07-2	Čvrsta supstanca	Supstanca koja ne izaziva preosjetljivost	DMSO	> 200	Negativno (> 200)
Glicerol	56-81-5	Tečnosti	Supstanca koja ne izaziva preosjetljivost	Potpuni medij	> 200	Negativno (> 200)
Mliječna kiselina	50-21-5	Tečnosti	Supstanca koja ne izaziva preosjetljivost	Potpuni medij	> 200	Negativno (> 200)

Salicilna kiselina	69-72-7	Čvrsta supstanca	Supstanca koja ne izaziva preosjetljivost	DMSO	> 200	Negativno (> 200)
Skraćenice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o hemijskim supstancama						

Dodatak 3. IZAZIVANJE PREOSJETLJIVOSTI KOŽE *IN VITRO*: TEST IL-8 LUC

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

Za razliku od testova u kojima se analizira ekspresija ćelijskih površinskih biljega, testom IL8-Luc kvantificiraju se promjene u ekspresiji IL-8, citokina povezanog s aktiviranjem dendritičnih ćelija (DC). Kod IL-8 reporterske ćelijske linije dobijene iz THP-1 (THP-G8, dobijena iz ljudske ćelijske linije akutne monocitne leuhemije THP-1) ekspresija IL-8 mjeri se nakon izlaganja supstancama koje izazivaju preosjetljivost. Ekspresija luciferaze zatim se upotrebljava kao pomoć u razlikovanju supstance koje izazivaju preosjetljivost kože od supstance koje ne izazivaju preosjetljivost.

Uzimajući u obzir sve dostupne dokaze i informacije regulatornih tijela i dionika, test IL-8 Luc smatra se korisnim kao dio IATA-e kao pomoć u razlikovanju supstance koje izazivaju preosjetljivost od supstance koje ne izazivaju preosjetljivost u svrhu klasifikovanja i označivanja prema opasnosti. U literaturi su navedeni primjeri upotrebe podataka dobijanje testom IL-8 Luc u kombinaciji s ostalim informacijama.

Pokazalo se da se test IL-8 Luc može prenijeti u laboratorije koji imaju iskustva sa ćelijskim kulturama i mjerenjem luciferaze. Obnovljivost unutar jedne laboratorije iznosila je 87,7 %, a između laboratorija 87,5 %. Podaci dobijeni u validacionoj studiji i drugim objavljenim radovima pokazuju da je testom IL-8 Luc, u u poređenju s analizom LLNA, 118 hemikalija od njih 143 procijenjeno kao pozitivno ili negativno, a 25 hemikalija kao nejednoznačno te tačnost testa IL-8 Luc u razlikovanju supstance koje izazivaju preosjetljivost kože (kategorija 1. prema sistemu UN GHS/Uredbi o CLP-u) od supstance koje ne izazivaju preosjetljivost (bez kategorije prema sistemu UN GHS/Uredbi o CLP-u) iznosi 86 % (101/118), uz osjetljivost od 96 % (92/96) i specifičnost od 41 % (9/22). Isključujući supstance van područja primjene opisane u nastavku, testom IL-8 Luc 113 hemikalija od njih 136 procijenjeno je kao pozitivno ili negativno, a 23 hemikalije kao nejednoznačno te tačnost testa IL-8 Luc iznosi 89 % (101/113), uz osjetljivost od 96 % (92/96) i specifičnost od 53 % (9/17). Upotrebom podataka dobijanje na ljudima koji su navedeni u Urbisch i dr, testom IL-8 Luc 76 hemikalija od njih 90 procijenjeno je kao pozitivno ili negativno, a 14 hemikalija kao nejednoznačno te tačnost testa iznosi 80 % (61/76), osjetljivost 93 % (54/58), a specifičnost 39 % (7/18). Isključujući supstance van područja primjene, testom IL-8 Luc 71 hemikalija od njih 84 procijenjeno je kao pozitivno ili negativno, a 13 hemikalija kao nejednoznačno te tačnost testa iznosi 86 % (61/71), uz osjetljivost od 93 % (54/58) i specifičnost od 54 % (7/13). Veća je vjerovatnost da će se testom IL-8 Luc dobiti lažno negativna predviđanja za hemikalije koje pokazuju nisku/umjerenu jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (potkategorija 1.B prema sistemu UN GHS/Uredbi o CLP-u) nego za hemikalije koje pokazuju visoku jakost (potkategorija 1.A prema sistemu UN GHS/Uredbi o CLP-u) (6.). Navedene informacije idu u prilog upotrebi testa IL-8 Luc kao elementa koji pridonosi identifikaciji opasnosti od izazivanja preosjetljivosti kože. Tačnost navedena za test IL-8 Luc kao samostalno ispitivanje služi samo kao smjernica jer je ispitivanje potrebno kombinujeti s drugim izvorima informacija u kontekstu IATA-e. Nadalje, pri ocjenjivanju

ispitivanja izazivanja preosjetljivosti kože koje ne uključuju eksperimente na životinjama potrebno je imati na umu da analiza LLNA i druga ispitivanja na životinjama možda neće u potpunosti odražavati situaciju kod ljudi.
Trenutno dostupni podaci pokazuju da se test IL-8 Luc može primijeniti za ispitivanje hemikalija koje obuhvataju različite organske funkcionalne grupe, mehanizme reakcije, jakosti u izazivanju preosjetljivosti kože (kako su utvrđene istraživanjima *in vivo*) te fizičko-hemijska svojstva
Iako se u testu IL-8 Luc kao rastvarač upotrebljava X-VIVO^{TM} 15, njime su tačno ocijenjene hemikalije čija je vrijednost Log K_{ow} > 3,5 i čija je rastvorljivost u vodi približno 100 µg/ ml, kako je izračunano programom EPI Suite^{TM}, te je njegova uspješnost u otkrivanju supstance koje izazivaju preosjetljivost kože i koje su slabo rastvorive u vodi bolja nego kod testa IL-8 Luc u kojem se kao rastvarač upotrebljava dimetil sulfoksid (DMSO) (2.). Međutim, negativni rezultati za ispitivane hemikalije koje se ne rastvaraju pri koncentraciji od 20 mg/ml mogu dati lažno negativne rezultate jer se one ne mogu rastvoriti u rastvraču X-VIVO^{TM} . Stoga negativne rezultate za te ispitivane hemikalije ne treba razmatrati. U validacionoj studiji uočen je visok udio lažno negativnih rezultata za anhidride. Nadalje, zbog ograničene metaboličke sposobnosti ćelijske linije (8.) i uslova eksperimenta prohapteni (tj. supstance koje zahtijevaju metaboličku aktivaciju) i prehapteni (tj. supstance koje se aktiviraju zračnom oksidacijom) mogu dati negativne rezultate u testu. Međutim, iako negativne rezultate za supstance za koje se sumnja da su prehapteni ili prohapteni treba tumačiti s oprezom, testom IL-8 Luc tačno je procijenjeno 11 prehaptena od njih 11, šest od šest prohaptena te šest od osam prehaptena i prohaptena u podatkovnom skupu testa IL-8 Luc. Na osnovu nedavnog sveobuhvatnog pregleda triju ispitivanja koja ne uključuju eksperimente na životinjama (DPRA, KeratinoSens™ i h-CLAT) za otkrivanje prehaptena i prohaptena te na osnovu činjenice da su ćelije THP-G8 koje se upotrebljavaju u testu IL-8 Luc ćelijska linija izvedena iz ćelijske linije THP-1 koja se upotrebljava u testu h-CLAT, test IL-8 Luc može pridonijeti i povećanju osjetljivosti ispitivanja koja ne uključuju eksperimente na životinjama za otkrivanje prehaptena i prohaptena u kombinaciji s drugim ispitivanjima. Površinski aktivne supstance koje su dosad ispitane dale su (lažno) pozitivne rezultate neu zavisnosti o njihovoj vrsti (npr. kationske, anionske ili neionske). Naposljetku, hemikalije koje ometaju luciferazu mogu poremetiti njenu aktivnost/mjerenje tako da uzrokuju prividnu inhibiciju ili povećanu luminiscenciju. Na primjer, postoje izvještaja o tome da su koncentracije fitoestrogena veće od 1 µM u drugim luciferaznim testovima ometale signale luminiscencije zbog pretjerane aktivacije reporterskog gena za luciferazu. Stoga je potrebno pažljivo ispitati ekspresiju luciferaze dobijenu pri visokim koncentracijama fitoestrogena ili jedinjenjeeva za koje se pretpostavlja da dovode do aktivacije reporterskog gena za luciferazu slične aktivaciji fitoestrogenom. Na osnovu prethodno navedenog, površinski aktivne supstance, anhidridi i hemikalije koje ometaju luciferazu izvan su područja primjene ovog testa. U slučajevima u kojima se može dokazati da se test IL-8 Luc ne može primijeniti za ispitivanje drugih specifičnih kategorija hemikalija, taj test ne bi trebalo upotrebljavati za te specifične kategorije.
Kao što je opisano, test IL-8 Luc pomaže u razlikovanju supstance koje izazivaju preosjetljivost kože od supstance koje ne izazivaju preosjetljivost. Potreban je dodatan rad, po mogućnosti na osnovu podataka dobijanje na ljudima, da bi se moglo utvrditi mogu li rezultati dobijeni testom IL-8 Luc pridonijeti procjeni jakosti ako se kombinujeju s drugim izvorima informacija.

NAČELO ISPITIVANJA

U testu IL-8 Luc upotrebljava se ljudska ćelijska linija monocitne leuhemije THP-1, koja se nabavlja iz banke ćelija American Type Culture Collection (Manassas, VA, SAD). Upotrebom te ćelijske linije na Odjelu za dermatologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Tohokuu (*Dept. of Dermatology, Tohoku University School of Medicine*) stvorena je ćelijska linija THP-G8, IL-8

reporterska ćelijska linija izvedena iz THP-1, koja nosi gene za stabilnu narančastu luciferazu (*Stable Luciferase Orange*; SLO) i stabilnu crvenu luciferazu (*Stable Luciferase Red*; SLR) koji su pod kontrolom promotera gena za IL-8 odnosno za gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenazu (GAPDH) (1.). To omogućuje kvantitativno mjerenje indukcije gena za luciferazu određivanjem luminiscencije iz supstrata luciferaze za koje je poznato da stvaraju svjetlost, kao pokazatelja aktivnosti IL-8 i GAPDH-a u ćelijama nakon izlaganja hemikalijama koje izazivaju preosjetljivost.

Ispitni sistem s dvije boje sastoji se od luciferaze koja emitira narančastu boju (SLO; λmax = 580 nm) (12.) za gensku ekspresiju s promotera gena za IL-8 te luciferaze koja emitira crvenu boju (SLR; λmax = 630 nm) (13.) za gensku ekspresiju s promotera gena za GAPDH kao interne kontrole. Dvije luciferaze emitiraju različite boje nakon reakcije s d-luciferinom svitaca i njihova se luminiscencija mjeri istovremeno u reakciji u jednom koraku tako da se emisija iz smješe za testiranje podijeli upotrebom optičkog filtra (14.) (Dodatak 3.2.).

Ćelije THP-G8 tretiraju se ispitivanom hemikalijom 16 sati, nakon čega se mjeri aktivnost SLO luciferaze (SLO-LA), koja odražava aktivnost promotera gena za IL-8, te aktivnost SLR luciferaze (SLR-LA), koja odražava aktivnost promotera gena za GAPDH. Kako bi se skraćenice lakše razumjele, SLO-LA i SLR-LA određuju se kao IL8LA odnosno GAPLA. U tabeli 1. naveden je opis termina povezanih s aktivnošću luciferaze u testu IL-8 Luc. Izmjerene vrijednosti upotrebljavaju se za izračun normalizovane IL8LA (nIL8LA), odnosno odnosa IL8LA i GAPLA, indukcije nIL8LA (Ind-IL8LA), odnosno odnosa aritmetičke sredine četvorostruko izmjerenih vrijednosti nIL8LA ćelija THP-G8 tretiranih ispitivanom hemikalijom i vrijednosti nIL8LA netretiranih ćelija THP-G8, te inhibicije GAPLA (Inh-GAPLA), odnosno odnosa aritmetičke sredine četvorostruko izmjerenih vrijednosti GAPLA ćelija THP-G8 tretiranih ispitivanom hemikalijom i vrijednosti GAPLA netretiranih ćelija THP-G8 te se upotrebljavaju kao pokazatelj citotoksičnosti.

***Tabela 1.*Opis termina povezanih s aktivnošću luciferaze u testu IL-8 Luc**

Skraćenice	**Definicija**
GAPLA	aktivnost SLR luciferaze koja odražava aktivnost promotera gena za GAPDH
IL8LA	aktivnost SLO luciferaze koja odražava aktivnost promotera gena za IL-8
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA ćelija THP-G8 tretiranih hemikalijama / nIL8LA netretiranih ćelija
Inh-GAPLA	GAPLA ćelija THP-G8 tretiranih hemikalijama / GAPLA netretiranih ćelija
CV05	najniža koncentracija hemikalije pri kojoj Inh-GAPLA postaje < 0,05

Dostupni su zahtjevi izvođenja radi olakšavanja validacije izmijenjenih *in vitro* testova IL-8 s

luciferazom sličnih testu IL-8 Luc te omogućivanja pravovremene izmjene Smjernice OECD-a za ispitivanje 442E radi njihova uključivanja. OECD-ovo uzajamno prihvatanje podataka jamči se samo za ispitivanja koja su validirana u skladu sa zahtjevima izvođenja ako je OECD pregledao ta ispitivanja i uključio ih u Smjernicu OECD-a za ispitivanje 442E.

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

Prije rutinske primjene ispitivanja opisanog u ovom Dodatku ispitnoj metodi B.71. laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost upotrebom deset supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti navedenih u Dodatku 3.3. u skladu s dobrom praksom za *in vitro* metode. Osim toga, korisnici ispitivanja trebaju održavati bazu prošlih podataka dobijanje provjerama reaktivnosti te s pozitivnim kontrolama i kontrolama s rastvaračem/nosačem trebaju se koristiti tim podacima kako bi potvrdili da je njihov laboratorij održao obnovljivost ispitivanja tokom vremena.

POSTUPAK

Dostupni su standardni operativni postupci (SOP) za test IL-8 Luc te bi ih trebalo primjenjivati pri sprovođenju ispitivanja. Laboratoriji koji su spremni sprovoditi ispitivanje mogu nabaviti rekombinantnu ćelijsku liniju THP-G8 od laboratorija GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan, nakon što potpišu sporazum o prenosu materijala (MTA) u skladu s uslovima iz OECD-ova predloška. U sljedećim stavovima opisuju se glavne sastojci i postupci testa.

Priprema ćelija

Za primjenu testa IL-8 Luc treba upotrebljavati ćelijsku liniju THP-G8 iz laboratorija GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan. Nakon primitka ćelije se razmnožavaju (od dvije do četiri pasaže) te čuvaju zamrznute kao homogena zaliha. Ćelije iz te zalihe mogu se razmnožavati do najviše 12 pasaža ili najduže šest nedelja. Za razmnožavanje se kao medij upotrebljava RPMI-1640, medij za uzgoj kulture koji sadrži 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS), rastvor antibiotika/antimikotika (100 jedinica/ml penicilina G, 100 µg/ml streptomicina i 0,25 µg/ml amfotericina B u 0,85-postotnoj fiziološkoj rastvorini) (npr. GIBCO Cat#15240-062), 0,15 µg/ml puromicina (npr. CAS: 58-58-2) i 300 µg/ml G418 (npr. CAS: 108321-42-2).

Prije upotrebe za ispitivanje treba provjeriti ispunjavaju li ćelije zadane kriterijume provjerom reaktivnosti. Tu provjeru treba sprovesti od jedan do dvije nedelje ili od dvije do četiri pasaže nakon odmrzavanja, upotrebom pozitivne kontrole, 4-nitrobenzil bromida (4-NBB) (CAS: 100-11-8, čistoća ≥ 99 %) i negativne kontrole, mliječne kiseline (LA) (CAS: 50-21-5, čistoća ≥ 85 %). 4-NBB trebao bi dati pozitivan odgovor na Ind-IL8LA (≥ 1,4), dok bi LA trebao dati negativan odgovor na Ind-IL8LA (< 1,4). Za test se upotrebljavaju samo ćelije koje su prošle provjeru reaktivnosti. Provjeru treba sprovesti u skladu s pokolonama.

Za ispitivanje se ćelije THP-G8 nasađuju pri gustine od 2 do 5 × 105 ćelija/ml te se prethodno uzgajaju u tikvicama s kulturom od 48 do 96 sati. Na dan ispitivanja ćelije izdvojene iz tikvice s kulturom ispiru se medijem RPMI-1640 koji sadrži 10 % FBS-a bez antibiotika, a zatim se ponovno suspendujeju medijem RPMI-1640 koji sadrži 10 % FBS-a bez antibiotika pri gustine od 1 × 106 ćelija/ml. Ćelije se zatim distribuiraju na crnu ploču s 96 udubljenja s ravnim dnom (npr. Costar Cat#3603) s 50 µl (5 × 104 ćelija/jažici).

Priprema ispitivane hemikalije i kontrolnih supstanci

Ispitivana hemikalija i kontrolne supstance pripremaju se na dan ispitivanja. Za test IL-8 Luc

ispitivane hemikalije rastvaraju se u medijumu X-VIVO™ 15, komercijalno dostupnom medijumu bez seruma (Lonza, 04-418Q), tako da se dobije konačna koncentracija od 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 dodaje se u 20 mg ispitivane hemikalije (neu zavisnosti o rastvorljivosti hemikalije) u epruvetu za mikrocentrifugu i dovodi do volumena od 1 ml, a zatim se snažno vrtložno protresa i trese u rotoru pri najvećoj brzini od 8 o/min 30 minuta na sobnoj temperaturi od približno 20 °C. Nadalje, ako su hemikalije u čvrstom stanju i dalje nerastvorive, epruveta se ultrazvučno obrađuje dok se hemikalija potpuno ne rastvori ili stabilno dispergira. Ako su ispitivane hemikalije rastvorive u medijumu X-VIVO™ 15, RASTVORA se razrjeđuje medijem X-VIVO™ 15 primjenom faktora razrjeđivanja od pet te se upotrebljava kao glavna RASTVORA X-VIVO™ 15 ispitivane hemikalije (4 mg/ml). Ako ispitivana hemikalija nije rastvorljiva u medijumu X-VIVO™ 15, smjesa se ponovno protresa najmanje 30 minuta, a zatim se centrifugira pri 15000 o/min (≈ 20 000*g*) u trajanju od pet minuta; supernatant koji nastane upotrebljava se kao glavna RASTVORA X-VIVO™ 15 ispitivane hemikalije. Upotrebu drugih rastvarača, kao što su DMSO, voda ili medij za uzgoj kulture, treba naučno obrazložiti. Detaljan postupak za rastvaranje hemikalija prikazan je u Dodatku 3.5. Rastvora medija X-VIVO™ 15 miješaju se u odnosu 1: 1 (v/v) sa suspenzijama ćelija pripremljenima na crnoj ploči s 96 udubljenja s ravnim dnom.

Prvi ciklus ispitivanja usmjeren je na utvrđivanje citotoksične koncentracije i ispitivanje potencijala hemikalija da izazovu preosjetljivost kože. Upotrebom medija X-VIVO™ 15, serijska razrjeđivanja glavne rastvora X-VIVO™ 15 ispitivanih hemikalija prave se s faktorom razrjeđivanja od dva (vidjeti Dodatak 3.5.) upotrebom ploče za test s 96 udubljenja (npr. Costar Cat#EW-01729-03). Zatim se 50 µl/jažici razrijeđene rastvora dodaje u 50 µl suspenzije ćelija na crnoj ploči s 96 udubljenja s ravnim dnom. Stoga su konačne koncentracije ispitivanih hemikalija koje su rastvorive u medijumu X-VIVO ™ 15 u rasponu od 0,002 do 2 mg/ml (Dodatak 3.5.). U slučaju ispitivanih hemikalija koje nisu rastvorive u medijumu X-VIVO ™ 15 pri 20 mg/ml utvrđuju se samo faktori razrjeđivanja u rasponu od 2 do 2^{10}, iako stvarne konačne koncentracije ispitivanih hemikalija ostaju nesigurne i ovise o zasićenoj koncentraciji ispitivane hemikalije u glavnoj rastvorini medija X-VIVO ™ 15.

U kasnijim ciklusima ispitivanja (tj. drugom, trećem i četvrtom ponavljanju), glavna RASTVORA medija X-VIVO™ 15 pravi se pri koncentraciji koja je četiri puta viša od koncentracije vijabilnosti ćelija 05 (CV05; najniža koncentracija pri kojoj Inh-GAPLA postaje < 0,05) u prvom eksperimentu. Ako Inh-GAPLA ne postane manji od 0,05 pri najvišoj koncentraciji u prvom ciklusu, glavna RASTVORA medija X-VIVO™ 15 pravi se upotrebom najviše koncentracije prvog ciklusa. Koncentracija CV05 računa se tako da se koncentracija glavne rastvora u prvom ciklusu podijeli faktorom razrjeđivanja za CV05 (X) (faktor razrjeđivanja CV05 (X); faktor razrjeđivanja potreban za razrjeđivanje glavne rastvora na CV05) (vidjeti Dodatak 3.5.). Za ispitivane supstance koje nisu rastvorive u medijumu X-VIVO pri 20 mg/ml, CV05 se utvrđuje koncentracijom glavne rastvora × 1/X. Za cikluse od drugog do četvrtog priprema se druga glavna RASTVORA kao 4 × CV05 (Dodatak 3.5.).

Serijska razrjeđivanja drugih glavnih RASTVORA X-VIVO™ 15 prave se upotrebom faktora razrjeđivanja od 1,5 upotrebom ploče za test s 96 udubljenja. Zatim se 50 µl/jažici razrijeđene rastvora dodaje u 50 µl suspenzije ćelija u porculanskim tanjirima sa udubljenjima crne ploče s 96 udubljenja s ravnim dnom. Svaku koncentraciju svake ispitivane hemikalije treba ispitati u četiri posude sa udubljenjima. Uzorci se zatim miješaju u jedinici za miješanje za ploče i inkubiraju 16 sati na 37 °C i s 5 % CO_2, nakon čega se mjeri aktivnost luciferaze kako je opisano u nastavku.

Kontrolu s rastvaračem čini smjesa 50 µl/jažici medija X-VIVO™ 15 i 50 µl/jažici suspenzije ćelija u medijumu RPMI-1640 koji sadrži 10 % FBS-a.

Kao pozitivna kontrola preporučuje se 4-NBB. Priprema se 20 mg 4-NBB-a u epruveti za mikrocentrifugu od 1,5 ml, u koju se dodaje medij X-VIVO™ 15 do volumena od 1 ml. Epruveta se snažno vrtložno protresa i trese u rotoru pri najvećoj brzini od 8 o/min najmanje 30 minuta.

Nakon centrifugiranja pri 20 000 g tokom pet minuta supernatant se razrjeđuje faktorom od 4 medijem X-VIVO^{TM} 15 i 500 µl razrijeđenog supernatanta prenosi se u kadicu na ploči za test s 96 udubljenja. Razrijeđeni supernatant dodatno se razrjeđuje medijem X-VIVO^{TM} 15 s faktorima razrjeđivanja od 2 i 4 te se 50 µl rastvora dodaje u 50 µl suspenzije ćelija THP-G8 u porculanskim tanjirima sa udubljenjima crne ploče s 96 udubljenja s ravnim dnom (Dodatak 3.6.). Svaku koncentraciju pozitivne kontrole treba ispitati u četiri posude sa udubljenjima. Ploča se trese u jedinici za miješanje za ploče i inkubira 16 sati u inkubatoru CO_2 (37 ^{o}C, 5 % CO_2), nakon čega se mjeri aktivnost luciferaze.
Kao negativna kontrola preporučuje se mliječna kiselina. Priprema se 20 mg mliječne kiseline u epruveti za mikrocentrifugu od 1,5 ml, u koju se dodaje medij X-VIVO^{TM} 15 do volumena od 1 ml (20 mg/ml). Dvadeset mg/ml rastvora mliječne kiseline razrjeđuje se medijem X-VIVO^{TM} 15 primjenom faktora od 5 (4 mg/ml); 500 µl od tih 4 mg/ml rastvora mliječne kiseline prenosi se u kadicu ploče za test s 96 udubljenja. Ta se RASTVORA razrjeđuje medijem X-VIVO^{TM} 15 primjenom faktora od 2 te se ponovno razrjeđuje primjenom faktora od 2 kako bi se dobile rastvora od 2 mg/ml i 1 mg/ml. 50 µl tih triju RASTVORA i kontrole s nosačem (X-VIVO^{TM} 15) dodaje se u 50 µl suspenzije ćelija THP-G8 u porculanskim tanjirima sa udubljenjima crne ploče s 96 udubljenja s ravnim dnom. Svaka koncentracija negativne kontrole ispituje se u četiri posude sa udubljenjima. Ploča se trese u jedinici za miješanje za ploče i inkubira 16 sati u inkubatoru s CO_2 (37 ^{o}C, 5 % CO_2), nakon čega se mjeri aktivnost luciferaze.
Mogu se upotrijebiti druge prikladne pozitivne ili negativne kontrole pod uslovom da su dostupni prošli podaci na osnovu kojih se mogu odrediti uporedivi kriterijumi prihvatljivosti ciklusa.
Treba paziti da ne dođe do isparavanja isparljivih ispitivanih hemikalija te unakrsne kontaminacije udubljenja ispitivanim hemikalijama, npr. zatvaranjem ploče prije inkubacije s ispitivanim hemikalijama.
Za ispitivane hemikalije i kontrolu s rastvaračem potrebna su od dva do četiri ciklusa kako bi se došlo do pozitivnog ili negativnog predviđanja (vidjeti tabelu 2.). Svaki ciklus sprovodi se na različite dane sa svježom glavnom rastvorinom medija X-VIVO^{TM} 15 ispitivanih hemikalija i neu zavisnosti izdvojenim ćelijama. Ćelije mogu biti iz iste pasaže.

Mjerenja aktivnosti luciferaze

Luminiscencija se mjeri luminometrom za mikrotitracijsku ploču s 96 udubljenja s optičkim filtrima, npr. Phelios (ATTO, Tokio, Japan), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Njemačka) i serijom ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD). Luminometar se mora kalibrirati za svako ispitivanje kako bi se osigurala obnovljivost (19.). Za tu su kalibraciju dostupne rekombinantne luciferaze koje emitiraju narančastu i crvenu svjetlost.
U svaku kadicu ploče na kojoj se nalazi suspenzija ćelija tretirana hemikalijama ili bez hemikalija prenosi se 100 µl prethodno zagrijanog reagensa za test luciferaze Tripluc® (Tripluc). Ploča se protresa deset minuta na sobnoj temperaturi od približno 20 ^{o}C. Ploča se stavlja u luminometar kako bi se izmjerila aktivnost luciferaze. Bioluminiscencija se mjeri tri sekunde bez optičkog filtra (F0) i tri sekunde s optičkim filtrom (F1). Treba pružiti obrazloženje za upotrebu drugačijih postavki, npr. u zavisnosti o modelu luminometra koji se upotrebljava.
Parametri za svaku koncentraciju računaju se iz izmjerenih vrijednosti, npr. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, srednja vrijednost ± SD za IL8LA, srednja vrijednost ± SD za GAPLA, srednja vrijednost ± SD za nIL8LA, srednja vrijednost ± SD za Ind-IL8LA, srednja vrijednost ± SD za Inh-GAPLA i interval pouzdanosti od 95 % za Ind-IL8LA.
Prije mjerenja razlikovanje boja u reporterskim testovima s više boja obično se postiže upotrebom detektora (luminometar i čitač ploča) koji imaju optičke filtre, kao što su filtri s oštrom graničnom crtom valne dužine (dugo ili kratko prolazni) ili pojasno propusni filtri. Koeficijente prijenosa filtara za svaku signalnu boju bioluminiscencije treba kalibrirati prije

ispitivanja, u skladu s Dodatkom 3.2.

PODACI I IZVJEŠTAVANJE

Procjena podataka

Sljedeći kriterijumi moraju se ispuniti u svakom ciklusu da bi se donijela pozitivna/negativna odluka:

—predviđanje na osnovu testa IL-8 Luc smatra se pozitivnim ako je Ind-IL8LA ispitivane hemikalije ≥ 1,4 i donja granica intervala pouzdanosti od 95 % za Ind-IL8LA ≥ 1,0,

—predviđanje na osnovu testa IL-8 Luc smatra se negativnim ako je Ind-IL8LA ispitivane hemikalije < 1,4 i/ili donja granica intervala pouzdanosti od 95 % za Ind-IL8LA < 1,0.

Model predviđanja

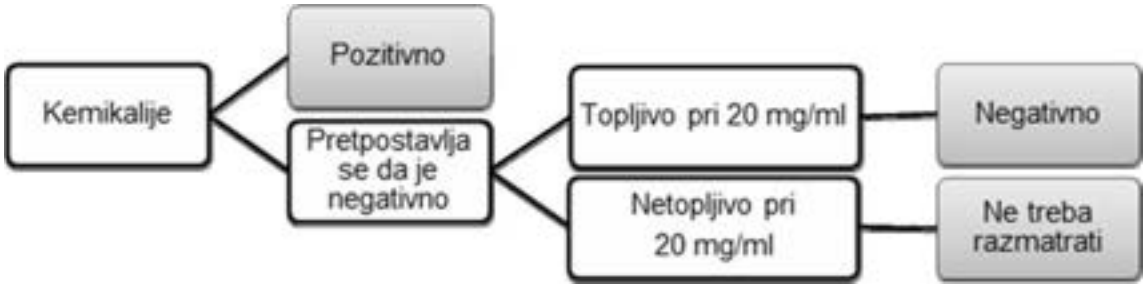
Ispitivane hemikalije koje daju dva pozitivna rezultata u 1., 2., 3. i 4. ciklusu identificiraju se kao pozitivne, dok se one koje daju tri negativna rezultata u 1., 2., 3. i 4. ciklusu identificiraju kao hemikalije za koje se pretpostavlja da su negativne (tabela 2.). Među hemikalijama za koje se pretpostavlja da su negativne, hemikalije koje se rastvaraju pri 20 mg/ml medija X-VIVO™ 15 procjenjuju se kao negativne, dok hemikalije koje se ne rastvaraju pri 20 mg/ml medija X-VIVO™ 15 ne treba razmatrati (slika 1.).

Tabela 2. **Kriterijumi za identifikaciju pozitivnih i pretpostavljenih negativnih rezultata**

1. ciklus	2. ciklus	3. ciklus	4. ciklus	Konačno predviđanje
Pozitivno	Pozitivno	–	–	Pozitivno
	Negativno	Pozitivno	–	Pozitivno
		Negativno	Pozitivno	Pozitivno
			Negativno	Pretpostavlja se da je negativno
Negativno	Pozitivno	Pozitivno	–	Pozitivno
		Negativno	Pozitivno	Pozitivno
			Negativno	Pretpostavlja se da je negativno
	Negativno	Pozitivno	Pozitivno	Pozitivno

			Negativno	Pretpostavlja se da je negativno
		Negativno	–	Pretpostavlja se da je negativno

Slika 1. **Model predviđanja za konačnu odluku**



Kriterijumi prihvatljivosti

Sljedeći bi kriterijumi prihvatljivosti trebali biti ispunjeni kada se primjenjuje test IL-8 Luc:

—Ind-IL8LA treba biti veći od 5,0 pri barem jednoj koncentraciji pozitivne kontrole, 4-NBB-a, u svakom ciklusu,

—Ind-IL8LA treba biti manji od 1,4 pri bilo kojoj koncentraciji negativne kontrole, mliječne kiseline, u svakom ciklusu,

—treba odbaciti podatke s ploča za koje je GAPLA kontrolnih udubljenja sa ćelijama i Triplucom, ali bez hemikalija, za manje od pet puta veća od GAPLA udubljenja koje sadržiju samo ispitni medij (50 µl/jažici medija RPMI-1640 koji sadrži 10 % FBS-a i 50 µl/jažici medija X-VIVO^{TM} 15),

—treba odbaciti podatke s ploča za koje je Inh-GAPLA svih koncentracija ispitivanih ili kontrolnih hemikalija manja od 0,05. U tom slučaju treba ponoviti prvo ispitivanje tako da se kao najviša konačna koncentracija ponovljenog ispitivanja upotrijebi najniža konačna koncentracija prethodnog ispitivanja.

Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju trebalo bi da sadrži sljedeće informacije:

Ispitivane hemikalije

Supstanca s jednim sastojkom:

hemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

fizički izgled, rastvorljivost u vodi, molekularna masa te dodatna relevantna fizičko-hemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.,

obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

rastvorljivost u medijumu X-VIVO^{TM} 15. U slučaju hemikalija koje nisu rastvorive u medijumu X-VIVO^{TM} 15, je li nakon centrifugiranja uočeno taloženje ili plutanje,

ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),

uslovi skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

obrazloženje za izbor rastvarača/nosača za svaku ispitivanu hemikaliju ako nije upotrijebljen X-VIVO^{TM} 15.

Supstanca s više sastojaka, UVCB supstanca i smješa:

opisane koliko god je to moguće npr. hemijskim identitetom (vidjeti prethodno), čistoćom, količinskom zastupljenošću i relevantnim fizičko-hemijskim svojstvima sastojaka (vidjeti prethodno), u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

fizički izgled, rastvorljivost u vodi te dodatna relevantna fizičko-hemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

molekularna masa ili prividna molekularna masa u slučaju smjesa/polimera poznatog sastava ili druge informacije koje su relevantne za sprovođenje studije,

obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

rastvorljivost u medijumu X-VIVO^{TM} 15. U slučaju hemikalija koje nisu rastvorive u medijumu X-VIVO^{TM} 15, je li nakon centrifugiranja uočeno taloženje ili plutanje,

ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),

uslovi skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

obrazloženje za izbor rastvarača/nosača za svaku ispitivanu hemikaliju ako nije upotrijebljen X-VIVO^{TM} 15.

Kontrole

Pozitivna kontrola:

hemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

fizički izgled, rastvorljivost u vodi, molekularna masa te dodatna relevantna fizičko-hemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni i ako je primjenjivo,

čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.,

obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),

ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),

uslovi skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

upućivanje na rezultate koji se odnose na prošle pozitivne kontrole i pokazuju primjerenost kriterijuma prihvatljivosti, ako je primjenjivo.

Negativna kontrola:

hemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi) i/ili druge identifikacijske oznake,

čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd.,

fizički izgled, molekularna masa te dodatna relevantna fizičko-hemijska svojstva u slučaju da su upotrijebljene negativne kontrole koje nisu navedene u smjernici za ispitivanje, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

uslovi skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

obrazloženje za izbor rastvarača za svaku ispitivanu hemikaliju.

Ispitni uslovi:

naziv i adresa naručitelja, ustanove koja sprovodi ispitivanje i voditelja istraživanja,

opis upotrijebljenog ispitivanja,

upotrijebljena ćelijska linija, uslovi njena skladištenja i izvor (npr. objekt iz kojeg je dobijena),

broj serije i porijeklo FBS-a, naziv dobavljača, broj serije crne ploče s 96 udubljenja s ravnim dnom te broj serije reagensa Tripluc,

broj pasaža i gustina ćelija upotrijebljenih za ispitivanje,

metoda brojenja ćelija koja je upotrijebljena za nasađivanje prije ispitivanja i mjere koje su preduzete kako bi se osigurala ujednačena distribucija broja ćelija,

upotrijebljeni luminometar (npr. model), uključujući postavke instrumenta, upotrijebljeni supstrat luciferaze te dokaz o primjerenom mjerenju luminiscencije na osnovu kontrolnog ispitivanja opisanog u Dodatku 3.2.,

postupak koji je primijenjen za dokazivanje osposobljenosti laboratorija za izvođenje ispitivanja (npr. ispitivanjem supstance koje služe za dokazivanje osposobljenosti) ili za dokazivanje obnovljive primjene ispitivanja tokom vremena.

Ispitni postupak:

broj provedenih ponavljanja i ciklusa,

koncentracije ispitivane hemikalije, postupci primjene i vrijeme izloženosti (ako je drukčije od preporučenog),

opis primijenjenih kriterijuma ocjenjivanja i odlučivanja,

opis primijenjenih kriterijuma prihvatljivosti istraživanja,

opis mogućih izmjena ispitnog postupka.

Rezultati:

mjerenje IL8LA i GAPLA,

izračuni za nIL8LA, Ind-IL8LA i Inh-GAPLA,

interval pouzdanosti od 95 % za Ind-IL8LA,

grafički prikaz kriva doza – odgovor za indukciju aktivnosti luciferaze i vijabilnost,

opis svih drugih relevantnih zapažanja, ako je primjenjivo.

Rasprava o rezultatima:

rasprava o rezultatima dobijenima testom IL-8 Luc,

rasprava o rezultatima testa u kontekstu IATA-e ako su dostupni drugi relevantni podaci.

Zaključak

Dodatak 3.2.

NAČELO MJERENJA AKTIVNOSTI LUCIFERAZE I UTVRĐIVANJE KOEFICIJENATA PRIJENOSA OPTIČKOG FILTRA ZA SLO I SLR

Može se upotrijebiti višereporterski ispitni sistem – Tripluc – s luminometrom za mikrotitracione ploče koji ima višebojni detekcioni sistem na koji se može montirati optički filtar (npr. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Kao optički filtar za mjerenje može se upotrijebiti dugo ili kratko prolazni filtar od 600 do 620 nm ili pojasno propusni filtar od 600 do 700 nm.

Mjerenje dvobojnih luciferaza optičkim filtrom

U ovom se primjeru upotrebljava Phelios AB-2350 (ATTO). Taj je luminometar opremljen dugo prolaznim filtrom od 600 nm (R60 HOYA Co., 600 nm LP, filtar 1) za razdvajanje luminiscencije SLO (λmax = 580 nm) i SLR (λmax = 630 nm).

Kako bi se utvrdili koeficijenti prijenosa kroz dugo prolazni filtar od 600 nm, prvo se upotrebom pročišćenih enzima luciferaze SLO i SLR mjeri: i. intenzitet bioluminiscencije SLO i SLR bez filtra (F0), ii. intenzitet bioluminiscencije SLO i SLR koja je prošla kroz dugo prolazni filtar od 600 nm (filtar 1) te se iii. računaju koeficijenti prijenosa kroz dugo prolazni filtar od 600 nm za SLO i SLR navedeni u nastavku.

Transmission coefficients		**Abbreviation**	**Definition**
SLO	Filter 1 Transmission coefficients	$=\kappa O_{R60}$	The filter's transmission coefficient for the SLO
SLR	Filter 1 Transmission coefficients	κR_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLR

Ako se intenzitet SLO i SLR u ispitnom uzorku definišeju kao O i R: i. intenzitet svjetlosti bez filtra (potpuno optički) F0 i ii. intenzitet svjetlosti koja se emitira kroz dugo prolazni filtar od 600 nm (filtar 1) F1 opisuju se kako je prikazano u nastavku.

$F0 = O + R$

$F1 = \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$

Te se formule mogu preoblikovati na sljedeći način:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Zatim se upotrebom izračunanih faktora propusnosti (κO_{R60} i κR_{R60}) te izmjerenih vrijednosti F0 i F1 mogu izračunati vrijednosti O i R na sljedeći način:

$$\begin{pmatrix} 0 \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Materijali i metode za utvrđivanje faktora propusnosti

1. *Reagensi*

Jedinstveni pročišćeni enzimi luciferaze:

liofilizirani pročišćeni enzim SLO;

liofilizirani pročišćeni enzim SLR;

(koji su za validacijsku studiju dobijeni od laboratorija GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan sa ćelijskom linijom THP-G8).

Reagens za test:

reagens za test luciferaze Tripluc® (na primjer od TOYOBO Cat#MRA-301).

Medij: za test luciferaze (30 ml, pohranjeno na temperaturi od 2 do 8 °C)

Reagens	**Konc.**	**Konačna konc. u medijumu**	**Potrebna količina**
RPMI-1640	–	–	27 ml
FBS	–	10 %	3 ml

2. *Priprema rastvora enzima*

Rastvoriti liofilizirani pročišćeni enzim luciferaze u epruveti dodavanjem 200 µl pufera Tris/HCl od 10 ~ 100 mM ili Hepes/HCl (pH 7,5 ~ 8,0) obogaćenog s 10 % (w/v) glicerola, podijeliti rastvor enzima u alikvote od 10 µl u epruvetama za jednokratnu upotrebu od 1,5 ml i čuvati ih u zamrzivač na temperaturi od – 80 °C. Zamrznuta RASTVORA enzima može se upotrebljavati do najviše šest mjeseci. Pri upotrebi dodati 1 ml medija za test luciferaze (RPMI-1640 s 10 % FBS-a) u sve epruvete u kojima se nalaze rastvora enzima (razrijeđena RASTVORA enzima) i držati ih na ledu kako bi se spriječila deaktivacija.

3. *Mjerenje bioluminiscencije*

Odmrznuti reagens za test luciferaze Tripluc® (Tripluc) i držati ga na sobnoj temperaturi u vodenoj kupelji ili na sobnoj temperaturi. Uključiti luminometar 30 minuta prije početka mjerenja kako bi se omogućila stabilizacija fotomultiplikatora. Prenijeti 100 µl razrijeđene rastvora enzima na crnu ploču s 96 udubljenja (s ravnim dnom) (referentni uzorak SLO u #B1, #B2, #B3, a referentni uzorak SLR u #D1, #D2, #D3). Zatim pipetom prenijeti 100 µl unaprijed zagrijanog Tripluca u svaku kadicu ploče koja sadrži razrijeđenu rastvor enzima. Ploču protresati deset minuta na sobnoj temperaturi (približno 25 °C) u jedinici za miješanje. Ako se u rastvorini u porculanskim tanjirima sa udubljenjima pojave mjehurići, treba ih ukloniti. Ploču staviti u luminometar kako bi se izmjerila aktivnost luciferaze. Bioluminiscencija se mjeri tri sekunde bez optičkog filtra (F0) i tri sekunde s optičkim filtrom (F1).

Koeficijent prijenosa optičkog filtra izračunan je na sljedeći način:

Koeficijent prijenosa (SLO (κO_{R60})) = (#B1 od F1 + #B2 od F1 + #B3 od F1) / (#B1 od F0 + #B2 od F0 + #B3 od F0)

Koeficijent prijenosa (SLR (κR_{R60})) = (#D1 od F1 + #D2 od F1 + #D3 od F1) / (#D1 od F0 + #D2 od F0 + #D3 od F0)

Izračunani faktori propusnosti upotrebljavaju se za sva mjerenja koja se obavljaju istim luminometrom.

Kontrola kvalitete opreme

Treba upotrebljavati postupke opisane u protokolu za IL-8 Luc (18.).

Dodatak 3.3.

SUPSTANCE ZA DOKAZIVANJE TEHNIČKE OSPOSOBLJENOSTI

Prije rutinske primjene ispitivanja opisanog u ovom Dodatku ispitnoj metodi B.71. laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost tako što će za devet supstanci preporučenih u tabeli 1. dobiti očekivano predviđanje na osnovu testa IL-8 Luc te za najmanje osam od devet supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti (izabrane tako da predstavljaju niz odgovora povezanih s opasnostima od izazivanja preosjetljivosti kože) dobiti vrijednosti koje su unutar odgovarajućeg referentnog raspona. Ostali kriterijumi za izbor uključivali su to da je supstanca komercijalno dostupna te da su dostupni visokokvalitetni *in vivo* referentni podaci i visokokvalitetni *in vitro* podaci dobijeni testom IL-8 Luc. Isto tako, za test IL-8 Luc dostupni su objavljeni referentni podaci (6. i 1.).

Tabela 1.:

Preporučene supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti za izvođenje testa IL-8 Luc

Supstance za dokazivanje tehničke osposobljenosti	**CAS br.**	**Agregatno stanje**	**Rastvorljivost u medijumu X-VIVO15 pri 20 mg/ml**	**Predviđanje *in vivo* ([108])**	**Predviđanje testom IL-8 Luc ([109])**	**Referentni raspon (µg/ml) ([110])**	
						CV_{05} ([111])	**MIT u testu IL-8 Luc ([112])**
2,4-dinitrohlorbenzen	97-00-7	Čvrsta supstanca	Netopljivo	Supstanca koja izaziva preosjetljivost (ekstremno jaka)	Pozitivno	2,3–3,9	0,5–2,3

Formaldehid	50-00-0	Tečnosti	Topljivo	Supstanca koja izaziva preosjetljivost (jaka)	Pozitivno	9–30	4–9
2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	Čvrsta supstanca	Netopljivo	Supstanca koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	Pozitivno	250–290	60–250
Etilendiamin	107-15-3	Tečnosti	Topljivo	Supstanca koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	Pozitivno	500–700	0,1–0,4
Etilenglikol-dimetakrilat	97-90-5	Tečnosti	Netopljivo	Supstanca koja izaziva preosjetljivost (slaba)	Pozitivno	> 2000	0,04–0,1
4-alilanisol (estragol)	140-67-0	Tečnosti	Netopljivo	Supstanca koja izaziva preosjetljivost (slaba)	Pozitivno	> 2 000	0,01–0,07
Streptomicin sulfat	3810-74-0	Čvrsta supstanca	Topljivo	Supstanca koja ne izaziva preosjetljivost	Negativno	> 2 000	> 2 000
Glicerol	56-81-5	Tečnosti	Topljivo	Supstanca koja ne izaziva preosjetljivost	Negativno	> 2 000	> 2 000
Izopropanol	67-63-	Tečnosti	Topljivo	Supstanca koja ne	Negativno	> 2 000	> 2 000

	0			izaziva preosjetljivost			
Skraćenice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o hemijskim supstancama							

Dodatak 3.4.

INDEKSI L KRITERIJUMI PROSUDBE

nIL8LA (nSLO-LA)

J-to ponavljanje (j = 1 – 4) i-te koncentracije (i = 0 – 11) mjeri se za IL8LA (SLO-LA) i GAPLA (SLR-LA). Normalizirana IL8LA, koja se naziva nIL8LA (nSLO-LA), definiše se kao:

$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$

To je osnovna mjerna jedinica u ovom testu.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Multiplikacioni faktor povećanja uprosječene nIL8LA (nSLO-LA) za ponavljanje i-te koncentracije u u poređenju s vrijednošću pri koncentraciji od 0, Ind-IL8LA, primarna je mjera ovog testa. Taj se odnos bilježi sljedećom formulom:

$$\mathrm{Ind-IL8LA_i} = \left\{(1/4) \times \sum_{j} \mathrm{nIL8LA_{ij}}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_{j} \mathrm{nIL8LA_{0j}}\right.$$

Glavni laboratorij predložio je da vrijednost od 1,4 odgovara pozitivnom rezultatu za ispitanu hemikaliju. Ta se vrijednost zasniva na istraživanju prošlih podataka glavnog laboratorija. Tim za upravljanje podacima zatim je upotrebljavao tu vrijednost u svim fazama validacione studije. Primarni ishod, Ind-IL8LA, odnos je dvije aritmetičke sredine, kako je prikazano u jednačini.

Interval pouzdanosti od 95 % (95 % CI)

Interval pouzdanosti od 95 % (95 % CI) koji se zasniva na odnosu može se procijeniti kako bi se pokazala preciznost te mjere primarnog ishoda. Donja granica intervala pouzdanosti od 95 % ≥ 1 ukazuje na to da je nIL8LA s i-tom koncentracijom značajno veća od vrijednosti u kontroli s rastvaračem. Interval pouzdanosti od 95 % može se izvesti na nekoliko načina. U ovoj je studiji upotrijebljena metoda poznata kao Fiellerov teorem. Taj se teorem intervala pouzdanosti od 95 % dobija prema sljedećoj formuli:

$$\left[\frac{-\mathrm{B} - \sqrt{\mathrm{B}^2 - 4\mathrm{AC}}}{2\mathrm{A}}, \frac{-\mathrm{B} + \sqrt{\mathrm{B}^2 - 4\mathrm{AC}}}{2\mathrm{A}}\right],$$

pri čemu je.

$$A = \overline{x}_0^2 - t_{0.975(\nu)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \overline{x} \times \overline{y}$$

$$C = \overline{y}_i^2 - t_{0.975(\nu)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{and } n_0 = 4$$

$$\overline{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}$$

$$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \overline{x}_0)^2$$

$$n_{yi} = 4$$

$$\overline{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$$

$$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \overline{y}_i)^2$$

$t_{0.975(v)}$ je percentil od 97,5 centralne t-distribucije s vrijednošću v stupnja slobode, pri čemu je

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / \left\{\left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / (n_{yi} - 1)\right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA je odnos uprosječene GAPLA (SLR-LA) za ponavljanje i-te koncentracije u u poređenju s vrijednošću za kontrolu s rastvaračem, a bilježi se kao:

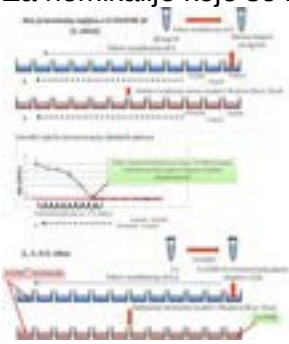
$$Inh - GAPLA_i = \left\{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_j GAPLA\right.$$

Budući da je GAPLA nazivnik vrijednosti nIL8LA, isključivo male vrijednosti uzrokuju velike varijacije vrijednosti nIL8LA. Stoga se vrijednosti Ind-IL8LA s isključivo malom vrijednosti Inh-GAPLA (manja od 0,05) mogu smatrati slabom preciznošću.

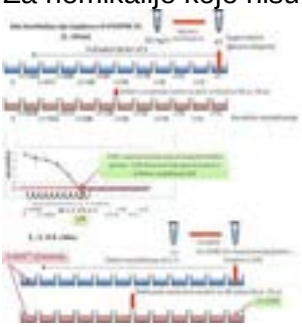
Dodatak 3.5.

PLAN METODA ZA RASTVARANJE HEMIKALIJA ZA TEST IL-8 LUC

(a) Za hemikalije koje se rastvaraju u medijumu X-VIVO™ 15 pri 20 mg/ml

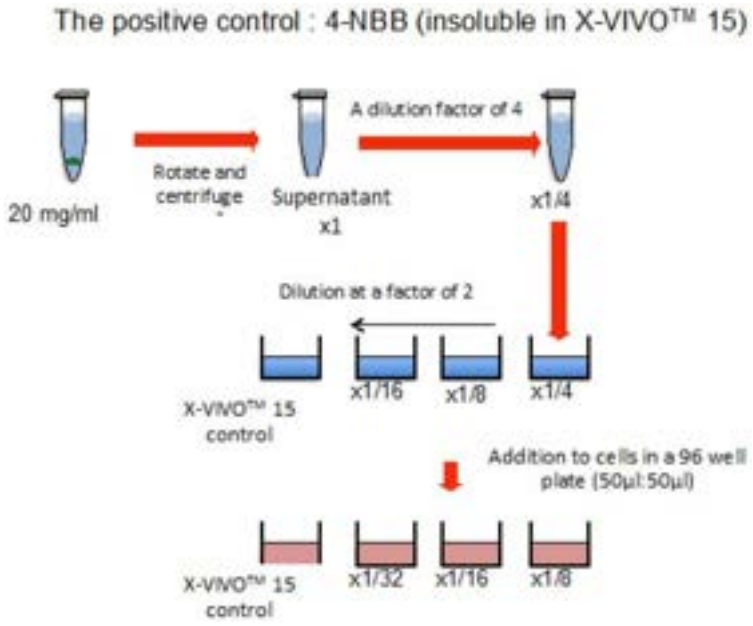


(b) Za hemikalije koje nisu rastvorive u medijumu X-VIVOTM 15 pri 20 mg/ml



Dodatak 3.6.

PLAN METODE ZA RASTVARANJE 4-NBB-A ZA POZITIVNU KONTROLU U TESTU IL-8 LUC;



PRILOG 3

METODE ISPITIVANJA SVOJSTAVA HEMIKALIJA KOJA UTIČU NA ŽIVOTNU SREDINU

C.1. AKUTNA TOKSIČNOST PO RIBE

DIO I

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

Metoda ispitivanja akutne toksičnosti služi da se za ispitivanu supstancu utvrdi letalna akutna toksičnost po slatkovodne ribe. U ispitivanju se koristi sistem (statički, polu-statički ili protočni) koji je najprikladniji za konstantno održavanje ispitivanih koncentracija supstance u vodi. Izbor je olakšan kada se rapolaže podacima o rastvorljivosti u vodi, naponu pare, hemijskoj stabilnosti, konstantama disocijacije i biorazgradljivosti supstance. Dodatne podatke (npr. podaci o strukturnoj formuli, stepenu čistoće, vrsti i procentu značajnih nečistoća, prisustvu i količini aditiva, koeficijent raspodjele u sistemu n-oktanol/voda) uzeti u obzir pri planiranju ispitivanja i pri tumačenju dobijenih rezultata.

1.2. Definicije i mjerne jedinice

Akutna toksičnost je vidljivi štetan efekat koji nastaje u organizmu usled izlaganja supstanci u toku kratkog vremenskog perioda (dani). U ispitivanju, akutna toksičnost izražava se kao srednja letalna koncentracija (u daljem tekstu: LC_{50}), odnosno koncentracija supstance u vodi koja dovodi do smrti 50% jedinki ispitivane grupe riba, koje su neprekidno izložene u toku unaprijed naznačenog vremenskog perioda. Sve koncentracije supstance koje se ispituju su izražene u jedinicama mase po zapremini (mg/l) ili u masenim koncentracijama (mg/kg).

1.3. Referentne supstance

Na osnovu rezultata ispitivanja sa referentnom supstancom utvrđuje se da li je u laboratorijaskim uslovima ispitivanja došlo do značajne promjene osjetljivosti vrste na kojoj se vrši ispitivanje. Za ovu metodu ispitivanja nisu propisane referentne supstance.

1.4. Princip metode

Preliminarno ispitivanje supstance vrši se za koncentraciju od 100 mg/l, kako bi se utvrdilo da je vrijednost LC_{50} viša od ove koncentracije. Ispitivanje traje 96 sati. U toku ovog vremena ribe se izlažu ispitivanoj supstanci koja se dodaje u vodu u opsegu koncentracija. Na najmanje svaka 24 sata, bilježi se smrtnost riba i pritom se, kad god je moguće, iizračunava vrijednost LC_{50}.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Kriterijumi kvaliteta primjenjuju se na čitavu metodu ispitivanja, uključujući i preliminarno ispitivanje. Na kraju ispitivanja smrtnost u kontrolisanim grupama ne prelazi 10% (ili više od jedne ribe u kontrolnoj grupi sa manje od 10 jedinki). U toku čitavog ispitivanja koncentracija rastvorenog kiseonika u vodi je viša od 60% zasićenja. U toku trajanja ispitivanja, koncentracije ispitivane supstance održavati u granicama od 80% od početnih koncentracija.

Za supstance koje se lako rassupstancaaju u ispitivanom medijumumu i obrazuju stabilne rastvore, odnosno rastvore koji u znatnoj mjeri ne isparavaju, ne raspadaju se, ne podliježu hidrolizi ili se ne adsorbuju, uzima se da je početna koncentracija jednaka nominalnoj koncentraciji. Sve vrijeme trajanja ispitivanja zadovoljavaju se kriterijumi kvaliteta i koncentracije supstance održane u okviru propisanih vrijednosti, za šta se prilažu dokazi.

Za supstance koje su slabo rastvorljive u ispitivanom medijumu, ili imaju sposobnost obrazovanja stabilnih emulzija, ili disperzija, ili nisu stabilne u vodenim rastvorima, za početnu koncentraciju uzima se vrijednost koncentracije koja je izmjerena u rastvoru (ili ako ne postoji tehnička mogućnost, koncentracija izmjerena u vodenom stubu) na početku ispitivanja. Koncentracija supstance se određuje nakon perioda stabilizacije i to prije uvođenja riba u sistem za ispitivanje.

U toku samog ispitivanja sprovode se dodatna mjerenja kako bi se potvrdile ssupstancane koncentracije izlaganja, kao i ispunjavanje kriterijuma kvaliteta. Vrijednost pH ne varira za više od 1.

1.6. Opis metode U ispitivanju se koriste tri različita sistema:

1) statičan (u toku ispitivanja nema protoka ispitivanog rastvora (rastvori se ne obnavljaju u komorama za ispitivanje));

1) polu-statičan (ispitivani rastvor ne protiče, ali se u komorama za ispitivanje rastvori redovno obnavljaju u dužim vremenskim intervalima (npr. na svaka 24 sata)).

2) protočni (ispitivani rastvor se stalno obnavlja, čime se obezbjeđuje stalna koncentracija rastvora i sprječava nagomilavanje kontaminenata u komorama za ispitivanje).

1.6.1. Reagensi

1.6.1.1. Rastvori ispitivane supstance

Za pripremu osnovnih rastvora u koncentracijama predviđenim za ispitivanje upotrebljava se dejonizovana voda ili obična voda u skladu sa specifikacijom iz dijela 1.6.1.2. ove metode. Koncentracije koje su određene za ispitivanje pripremaju se razblaživanjem osnovnog rastvora. Ako se ispituju visoke koncentracije, supstanca se odmah rastvora u vodi koja se koristi za razblaživanje.

Supstance se ispituju dok se ne dostigne granica rastvorljivosti. Za neke supstance, npr. one supstance koje imaju nisku rastvorljivost u vodi, ili visoku vrijednost koeficijenta raspodjele u sistemu n-oktanol/voda (u daljem tekstu: P_{ow}), ili one supstance koje prije obrazuju stabilne disperzije nego prave vodene rastvore, prihvatljivo je da se izvrši ispitivanje koncentracije supstance koja je iznad granice rastvorljivosti, kako bi potvrdili da je postignuta koncentracija maksimalne rastvorljivosti, odnosno stabilna koncentracija. Ova koncentracija na neki drugi način ne ometa sistem za ispitivanje (npr. obrazovanjem površinskog sloja koji sprečava oksigenaciju
vode, itd.)

Ultrazvučna disperzija, organski rassupstancaači, emulgatori ili disperziona sredstva upotrijebljavaju se za pripremu osnovnog rastvora supstance čija je rastvorljivost u vodi niska ili da bi se pospešila disperzija u ispitivanom medijumumu. U slučaju da se koriste, sve ispitivane koncentracije sadrže istu količinu pomoćnih supstanci. Istoj koncentraciji pomoćnih supstanci, koja se koristi u serijama ispitivanja, izlažu se i ribe u dodatnoj

kontrolnoj grupi. Koncentraciju pomoćnih supstanci u ispitivanom medijumumu svesti na minimum i ona ni u kom slučaju ne prelazi vrijednost od 100 mg/l.

Ispitivanje se izvodi bez podešavanja pH vrijednosti. Ako se utvrdi da je došlo do značajne promjene pH vrijednosti, prilažu se rezultati dobijeni u ponovljenom ispitivanju za koje je pH vrijednost prethodno bila podešena. pH vrijednost osnovnog rastvora se podešava prema pH vrijednosti vode za razblaživanje, osim ako ne postoji konkretan razlog da se tako ne uradi. U tu svrhu prvenstveno se koriste HCl i NaOH. Podešavanje pH vrijednosti se vrši na način kojim se neće u značajnijoj mjeri promjeniti koncentracija ispitivane supstance. U izvještaju o ispitivanju navesti ukoliko usled podešavanja pH vrijednosti doĐe do bilo kakve hemijske reakcije ili precipitacije ispitivane supstance.

1.6.1.2. Voda za gajenje i razblaživanje

Koristi se pitka voda (iz izvora koji nije zagaĐen potencijalno štetnim koncentracijama hlora, teških metala ili drugih supstanci), kvalitetna prirodna voda ili rekonstituisana voda (Deo II ove metode). Ukupna tvrdoća vode je između 10 mg/l $CaCO_3$ i 250 mg/l $CaCO_3$, a pH vrijednost između 6,0 i
8,5.

1.6.2. Oprema

Oprema za ispitivanje sadrži:
- automatski sistem za razblaživanje (u ispitivanju sa protočnim sistemom);
- oksimetar;
- instrument za određivanje tvrdoće vode;
- odgovarajuću aparaturu za kontrolu temperature; - pH metar.

Sva oprema je izraĐena od hemijski inertnog materijala.

1.6.3. Ribe

Ribe koje se koriste u ispitivanju su zdrave i bez vidljivih deformacija. Vrsta ribe se bira na osnovu praktičnih kriterijuma: dostupnost vrste u toku čitave godine, jednostavnost održavanja, prikladnost za obavljanje ispitivanja, relativna osjetljivost na hemikalije itd. Uzimaju se u obzir ekonomski, biološki i ekološki faktori koji utiču na konačan ishod ispitivanja. Kod izbora prikladne vrste riba uzeti u obzir i mogućnost poreĐenja rezultata i usklaĐenost između različitih laboratorijaa u svijetu[29] . Spisak vrsta riba koje se preporučuju za ispitivanje dat je u Dijelu III ove metode. Najčešće se koriste zebrica i kalifornijska pastrmka.

1.6.3.1. Čuvanje

Ribe su iz istog legla, a jedinke po mogućnosti slične veličine i starosti. Riba se najmanje 12 dana drži pod sljedećim uslovima:
1) uvođenje riba:
- shodno sistemu u kom se vrši ispitivanje (recirkulacijski ili protočni) i vrsti ribe; 2) voda:
- dio 1.6.1.2. ove metode; 3) svijetlost:
- 12 do 16 sati osvjetljenja dnevno; 4) koncentracije rastvorenog kiseonika:

[29] Testing Method B.44. Skin Absorption: In vivo Method

- najmanje 80% zasićenja; 5) ishrana:
- tri puta nedeljno ili jednom dnevno, sa pauzom od 24 sata pre početka ispitivanja.

1.6.3.2. Smrtnost Nakon perioda stabilizacije od 48 sati, bilježi se smrtnost riba primjenom

sljedećih kriterijuma:

1) ako je smrtnost u prvih 7 dana viša od 10% ukupne populacije, čitava populacija se odbacuje; 2) ako je smrtnost između 5% i 10% ukupne populacije, populacija se čuva dodatnih 7 dana. Ako ne dođe do dodatnih uginuća, populacija se prihvata, u suprotnom, ako se zabijleži još koje uginuće, populacija se odbacuje;
3) ako je smrtnost niža od 5% ukupne populacije, populacija se prihvata.

1.6.4. Adaptacija

Voda u kojoj se gaje ribe i voda koja se koristi u ispitivanju imaju isti kvalitet i temperaturni režim i to najmanje sedam dana prije početka ispitivanja.

1.6.5. Postupak ispitivanja

U preliminarnom ispitivanju određuje se tačan opseg koncentracija za ispitivanje. Zajedno sa čitavom serijom ispitivanih koncentracija, koristi se i jedna kontrola u koju se ne dodaje ispitivana supstanca, a po potrebi i jedna kontrola sa pomoćnom supstancom. U zavisnosti od hemijskih i fizičkih svojstava ispitivane supstance, bira se odgovarajući sistem za ispitivanje: statički, polustatički ili protočni, kako bi se zadržali kriterijumi kvaliteta.

Ribe se izlažu ispitivanoj supstanci na sljedeći način:

1) 96 sati traje izlaganje;
2) najmanje po 7 jedinki riba za svaku ispitivanu koncentraciju; 3) komore za ispitivanje su odgovarajuće zapremine za zadati nasad; 4) nasad:
- maksimalni nasad je 1 g/l za statični i polu-statični sistem, a za protočni sistem nasad je veći; 5) ispitivane koncentracije:
- najmanje pet koncentracija koje se razlikuju za faktor ne veći od 2,2 i odabranih tako da pokrivaju čitav opseg smrtnosti od 0% do 100%; 6) voda - dio 1.6.1.2; 7) svijetlost:
- 12 do 16 sati osvjetljenja dnevno; 8) temperatura:
- odgovarajuća za vrstu (Dio III ove metode), ali unutar ±1°C za bilo koji sistem za ispitivanje; 9) koncentracije rastvorenog kiseonika:
- ne manja od 60% zasićenja pri odabranoj temperaturi; 10) ishrana - hrana se ne daje.

Ribe se provjeravaju nakon prva 2 do 4 sata, a kasnije u intervalima od 24 sata. Ribe se smatraju mrtvim, ako dodirivanjem uske površine ispred leĐnog peraja ne dođe do bilo kakve reakcije i ako se ne vide pokreti disanja. Mrtve ribe se uklanjaju odmah po opažanju, a smrtnost se stalno bilježi. Bilježe se i vidljive abnormalnosti (npr. gubitak ravnoteže, promjene u načinu plivanja, poremećaj respiratornih funkcija, pigmentacije i sl.). Svakodnevno se mjeri pH vrijednost, koncentracija rastvorenog kiseonika i temperatura.

Granično ispitivanje

Uz pomoć postupaka opisanih u ovoj metodi, izvodi se granično ispitivanje sa koncentracijom od 100 mg/l, kako bi se pokazalo da je LC_{50} veća od ove koncentracije.

Ako je priroda supstance takva da se ne postiže koncentracija od 100 mg/l, granično ispitivanje se izvodi sa koncentracijom koja je jednaka rastvorljivosti supstance (ili sa maksimalnom koncentracijom koja formira stabilnu disperziju) u medijumumu (dio 1.6.1.1. ove metode).

Granično ispitivanje se izvodi sa 7 do 10 riba i sa istim brojem riba u kontroli. (Na osnovu binomne teoreme u grupi od 10 riba sa nultom stopom smrtnosti, sa 99,9% intervalom povjerenja, vrijednost LC_{50} viša od koncentracije koja se koristila u graničnom ispitivanju. Ako u grupi od 7, 8 ili 9 riba nema smrtnosti, tada je najmanje sa 99% intervalom povjerenja, LC_{50} viša od koncentracije koja se koristila).

Ako doĐe do uginuća, izvodi se potpuno ispitivanje. Bilježe se i subletalni efekti.

2. Podaci i procjena

Za svaki vremenski interval u kom se bilježe opažanja (nakon 24, 48, 72 i 96 sati), na logaritamskom papiru grafički se predstavlja procenat smrtnosti u funkciji koncentracije, za svako preporučeno vrijeme izlaganja.

Primjenom standardnih postupaka, kada je to moguće, za svaki vremenski interval opažanja određuje se vrijednost LC_{50} i interval povjerenja (p=0,05). Ove vrijednosti se zaokružuju na jednu ili najviše dvije decimale.

U slučajevima kada je nagib krive koncentracija/procenat prevelik da bi omogućio tačno iizračunavanje vrijednosti LC_{50}, dovoljno je grafički procjeniti vrijednosti.

Kada dvije uzastopne koncentracije, u opsegu faktora 2,2 daju samo 0% ili 100% smrtnost, ove dvije vijrednosti dovoljne su za određivanje opsega u kom će se naći vrijednosti LC_{50}.

Ako se ustanovi da se stabilnost ili homogenost ispitivane supstance ne odražava, ovo se opažanje zabilježi sa posebnim osvrtom na tu činjenicu kod tumačenja rezultata. **3. Izvještaj**

Izvještaj sadrži sljedeće:
- vrste ribe koja se ispituje (latinski naziv vrste, soj, dobavljač, prethodni tretman, veličina i broj riba za svaku ispitivanu koncentraciju supstance);
- porjeklo vode za razblaživanje i njena osnovna hemijska svojstva (pH, tvrdoća, temperatura); - postupak pripreme osnovnog rastvora i ispitivanih koncentracija (u slučaju supstanci koje imaju nisku rastvorljivost u vodi);
- koncentraciju svake pomoćne supstance;
- spisak svih ispitivanih koncentracija i sve dostupne informacije o stabilnosti ispitivane supstance u rastvoru;
- opis korišćenih metoda i dobijenih rezultata (u slučaju hemijske analize);
- rezultate graničnog ispitivanja (u slučaju da je izvedeno);
- razloge izbora i detalje o korišćenom sistemu za ispitivanje (npr. statični, polu-statični, protočni, da li se vrši aeracija, način uvođenja riba, itd);

- opis opreme korišćene u ispitivanju;
- režim osvjetljenja;
- koncentracije rastvorenog kiseonika, pH vrijednost i temperatura ispitivanih rastvora na svakih 24 sata;
- dokaze da su ispunjeni kriterijumi kvaliteta;
- tabele koje pokazuju ukupnu smrtnost pri svakoj koncentraciji ispitivane supstance i kontrole (zajedno sa kontrolom pomoćne supstance, ako je potrebno) na kraju svakog vremenskog intervala;
- krive dozne zavisnosti procenta smrtnosti od ispitivane koncentracije na kraju ispitivanja; - ako je moguće, vrijednosti LC_{50} na kraju svakog vremenskog intervala (sa 95% intervalom povjerenja);
- statističke metode korišćene za određivanje LC_{50} vrijednosti;
- (u slučaju da je korišćena referentna supstanca) uporedne rezultae ispitivanja;
- najviše ispitivane koncentracije koja nisu dovele do uginuća ribe za vrijeme trajanja ispitivanja; - najniže ispitivana test koncentracija koja je dovela do 100% smrtnosti za vrijeme trajanje ispitivanja.

REKONSTITUISANA VODA
DIO II

Sve hemikalije se analitičke čistoće. Voda je kvalitetna destilovana voda ili dejonizovana voda sa električnom provodljivošću manjom od 5 µS/cm. Oprema za destilaciju vode ne sadrži bakarne djelove.

Osnovni rastvori

Rastvoriti 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (kalcijum-hlorid dihidrat) i dopuniti vodom do zapremine od 1 L. Rastvoriti 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (magnezijum-sulfat heptahidrat) i dopuniti vodom do zapremine od
1 L.
Rastvoriti 2,59 g $NaHCO_3$ (natrijum-hidrogenkarbonat) i dopuniti vodom do zapremine od 1 L. Rastvoriti 0,23 g KCl (kalijum-hlorid) i dopuniti vodom do zapremine od 1 L.
Rekonstituisana voda za razblaživanje
Pomiješati po 25 ml svakog osnovnog rastvora i dopuniti vodom do zapremine od 1 L. Aerisati sve dok se koncentracija rastvorenog kiseonika ne izjednači sa koncentracijom kiseonika u zasićenom vazduhu. Vrijednost pH je 7,8 ± 0,2.

Ph se podešava dodavanjem NaOH (natrijum hidroksida) ili HCl (hlorovodonične kiseline). Pripremljena voda za razblaživanje ostavi se da stoji oko 12 sati i dalje se ne aeriše. Zbir Ca i Mg jona u ovom rastvoru iznosi 2,5 mol/l. Odnos Ca i Mg jona iznosi 4:1, a Na i K jona iznosi 10:1. Ukupan alkalitet rastvora iznosi 0,8 mmol/l.

Izmjene u postupku pripreme vode za razblaživanje ne utiču na sastav ili svojstva vode.

VRSTE RIBA KOJE SE PREPORUČUJU ZA ISPITIVANJE

DIO III

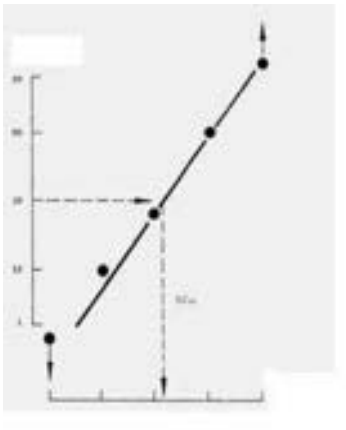
Preporučena vrsta	Preporučeni temperaturni (°C) opseg	Preporučena dužina (cm) test
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (HamiltonBuchanan), zebrica	20 do 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinida (Rafinesque)	20 do 24	5,0 ± 2,5
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758), šaran	20 do 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck and Schlege 1850)	20 do 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859), gupi	20 do 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758)	20 do 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleost Salmonidae)(Walbaum 1988), kalifornijska pastrmka	12 do 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758), jaz	20 do 24	6,0 ± 2,0

Nabavljanje riba

Navedene vrste riba lako se razmnožavaju i uzgajaju. U mnogim djelovima svijeta ove vrste riba nabavljaju se u toku cijele godine. Kako su navedene vrste pogodne i za uzgajanje u laboratorijaskim uslovima, zdravstveno stanje i porijeklo jedinki koje se koriste za ispitivanje je, uz kontrolu prisustva parazita i bolesti, uvjek poznato.

PRIMJER ZAVISNOSTI KONCENTRACIJE OD PROCENTA SMRTNOSTI
DIO IV

Primjer određivanja LC_{50} uz pomoć logaritamskog papira



C.2. METODA ISPITIVANJA AKUTNE TOKSIČNOSTI: IMOBILIZACIJA Daphnia sp.

Dio I

1. Metoda ispitivanja

Metoda ispitivanja akutne toksičnosti se zasniva na OECD TG 202 (2004) uputstvu ispitivanja.

1.1. Uvod

Metoda ispitivanja akutne toksičnosti opisuje ispitivanje akutne toksičnosti koje služi za procjenu efekta supstanci na dafnije.

1.2. Definicije

Efektivna koncentracija (EC_{50}) je koncentracija supstance za koju je procjenjeno da dovodi do imobilizacije 50% jedinki populacije koje su izložene dejstvu supstance u toku unaprijed definisanog perioda. Dozvoljeno je korišćenje druge definicije uz objašnjenje i navoĐenje literaturnog izvora.

Imobilisane životinje su životinje koje ne zaplivaju 15 sekundi nakon što je rastvor u posudi za ispitivanje lagano uzburkan (čak i u slučaju da i dalje pokreću antene).

1.3. Princip metode

Mlade dafnije (neonate), starosti do 24 sata na početku ispitivanja, neprekidno se izlažu ispitivanoj supstanci u seriji koncentracija u toku 48 sati. Broj imobilisanih jedinki bilježi se na svaka 24 i 48 sati, a vrijednosti se porede sa vrijednostima u kontrolnoj grupi. Analizom rezultata iizračunava se EC_{50} nakon 48 sata (definicije iz dijela 1.2. ove metode). Iizračunavanje EC_{50} nakon 24 sata nije obavezno.

1.4. Podaci o ispitivanoj supstanci

Potrebni su podaci o rastvorljivosti u vodi i naponu pare ispitivane supstance, kao i pouzdana analitička metoda za kvantifikaciju supstance u ispitivanom rastvoru sa podacima o efikasnosti i granicama detekcije. Od koristi su i podaci o strukturnoj formuli, čistoći supstance, stabilnosti u vodi i na svijezemljištu, koeficijent raspodjele u sistemun-oktanol/voda (P_{ow}) i rezultati ispitivanja biorazgradljivosti (metoda C.4. koja je data u ovom prilogu).

1.5. Referentne supstance

Efektivna koncentracija (EC_{50}) referentne supstance određuje se da bi se potvrdila pouzdanost uslova ispitivanja. Za ovu namjenu preporučuje se upotreba toksičnih supstanci koje su korišćene u međulaboratorijaskim ispitivanjima. Ispitivanja sa referentnom supstancom izvode se jednom mjesečno, a najmanje dva puta godišnje.

1.6. Kriterijumi kvaliteta

Da bi ispitivanje bilo prihvaćeno, zadovoljavaju se sljedeći kriterijumi kvaliteta:

1) u posudama za ispitivanje u kojima su kontrolne grupe (uključujući i grupe koje sadrže rassupstancaač), procenat imobilisanih dafnija na kraju ispitivanja nije veći od 10%;[30]
2) u posudama za ispitivanje, uključujući i posude u kojima su kontrolne grupe, koncentracija rastvorenog kiseonika na kraju ispitivanja je ≥ 3 mg/l.

1.7. Opis metode

1.7.1. Oprema

Posude za ispitivanje i ostala oprema koja dolazi u dodir sa ispitivanim rastvorom je od stakla ili nekog drugog hemijski inertnog materijala. Kao posude za ispitivanje se koriste epruvete ili čaše. Prije svake upotrebe posude su oprane standardnim postupkom za pranje laboratorijaskog posuđa. Isparavanje vode i upadanje prašine u rastvor tokom ispitivanja, predupreditи poklapanjem posuda, ali tako da poklopac ne prijanja u potpunosti. Lako isparljive supstance ispitivati u dobro zatvorenim posudama, koje su napunjene do vrha ispitivanim rastvorom, dovoljno velike zapremine da se izbjegne da kiseonik nedostaje ili pad koncentracije rastvorenog kiseonika ispod kriterijuma kvaliteta (dio 1.6. i prvi pasus dijela 1.8.3. ove metode).

Koristi se i sljedeća oprema:

- oksimetar (sa mikro-kiseoničnom elektrodom ili neka druga oprema pogodna za mjerenje koncentracije kiseonika u maloj zapremini uzorka);
- pH metar;
- pogodna oprema za kontrolu temperature;
- oprema za određivanje koncentracije ukupnog organskog ugljenika (u daljem tekstu: TOC);
- oprema za određivanje hemijske potrošnje kiseonika (u daljem tekstu: HPK); - oprema za određivanje tvrdoće vode, itd.

1.7.2. Ispitivani organizam

Za ispitivanje se koristi vrsta Daphnia magna Straus, a pogodne su i ostale vrste roda Daphnia
(npr. Daphnia pulex). Na početku ispitivanja, jedinke (neonate) su mlađe od 24 sata, a da bi se smanjila varijabilnost, ne uzimaju se iz prvog legla adulta. Porijeklo jedinki je iz zdravog legla (u kom jedinke ne pokazuju bilo kakve znake stresa poput visoke smrtnosti, prisustva mužjaka, pojave omotača (ephippia), kašnjenja u dobijanju legla, obezbojene jedinke, itd).

[30] Da bi se zadovoljio prvi kriterijum, u kontrolnim grupama procenat imobilisanih dafnija nije veći od 10%. Pored toga, više od 10% jedinki ne pokazuju bilo kakve znake bolesti ili stresa, poput gubljenja boje, ili neko drugo nesvojstveno ponašanje.

Sve jedinke koje se koriste u konkretnom ispitivanju potiču iz legla koje je ustanovljeno iz jednog matičnog legla. Matična legla se gaje u uslovima koji su u pogledu svijetlosnog i temperaturnog režima i medijumuma slični onim u toku ispitivanja. U slučaju da je medijumum za gajenje dafnija drugačiji od onog koji se koristi u ispitivanju, uvodi se aklimatizacioni period. Adultne jedinke, od kojih će se dobiti neonate koje se koriste u ispitivanju, prebacuju se u medijumum za razblaživanje najmanje 48 sati prije početka ispitivanja i drže, do samog početka ispitivanja, na temperaturi na kojoj će se izvoditi ispitivanje.

1.7.3. Voda za gajenje i razblaživanje

Prirodna voda (površinska ili podzemna), rekonstituisana voda ili dehlorisana vodovodna voda predstavljaju pogodnu vodu za gajenje dafnija i vodu za razblaživanje ispitivanog rastvora, pod uslovom da dafnije u njima preživljavaju u toku uzgoja, aklimatizacionog perioda i u toku ispitivanja, ne pokazujući znake stresa. Bilo koja voda koja zadovoljava svojstva prihvatljive vode za razblaživanje (Dio II ove metode) pogodna je za ispitivanje. Kvalitet vode je ujednačen u toku cijelog ispitivanja. Rekonstituisana voda se priprema tako što se u dejonizovanu ili destilovanu vodu dodaje tačna količina potrebnih sastojaka poznate analitičke čistoće. Medijumume koji sadrže helatizirajuće supstance, poput medijumuma M4 i M7 (Dio III ove metode), ne koristiti kada se ispituju supstance koje sadrže metale. Vrijednost pH je u opsegu od 6 do 9. Za ispitivanje sa vrstom Daphnia magna tvrdoća vode je od 140 mg/l $CaCO_3$ do 250 mg/l $CaCO_3$, dok je za druge vrste roda Daphnia pogodnija niža tvrdoća vode. Voda za razblaživanje se aeriše prije korišćenja u ispitivanju, da bi koncentracija rastvorenog kiseonika dostigla zasićenje.

Ako se koristi prirodna voda, parametre kvaliteta mjeriti najmanje dva puta godišnje ili kad god se posumnja da je došlo do značajnih promjena karakteristika (prethodni pasus i Dio II ove metode). Izmjeriti i sadržaj teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). Ako se koristi dehlorisana vodovodna voda, svakodnevno mjeriti sadržaj hlora. Ako se koristi površinska ili podzemna voda, izmjeriti elektroprovodljivost i TOC ili HPK. 1.7.4. Ispitivani rastvori

Ispitivani rastvori izabranih koncentracija najčešće se prave razblaživanjem osnovnog rastvora. Zbog toga se osnovni rastvor dobija direktnim rastvaranjem ispitivane supstance u vodi za razblaživanje. U najvećoj mogućoj mjeri, izbjegavati upotrebu rassupstancaača, emulzifikatora i disperezionih sredstava. U nekim slučajevima ove pomoćne supstance su neophodne kako bi se uspješno napravio koncentrovani osnovni rastvor. Koncentracija ispitivane supstance u rastvoru ne prelazi granicu rastvorljivosti supstance u vodi za razblaživanje.

Ispitivanje izvesti bez podešavanja pH vrijednosti. Ako doĐe da značajnije promjene pH vrijednosti, preporučuje se ponavljanje ispitivanja uz podešavanje pH vrijednosti na vrijednost koju je voda za razblaživanje imala prije rassupstancaanja ispitivane supstance. Podešavanje pH vrijednosti izvodi se tako da se koncentracija ispitivane supstance u osnovnom rastvoru značajnije ne promjeni, kao i da se izbjegne bilo kakva hemijska reakcija ili precipitacija ispitivane supstance. Za podešavanje pH vrijednosti uglavnom se koriste rastvori HCl i NaOH.

1.8. Postupak

1.8.1. Uslovi

1.8.1.1. Ispitivane i kontrolne grupe

Posude za ispitivanje pune se odgovarajućim zapreminama vode za razblaživanje i ispitivanim rastvorima. Zapreminski odnos vazduh/voda je jednak u svim ispitivanim i kontrolisanim grupama. Nakon toga se dafnije unose u posude za ispitivanje. U ispitivanju se za svaku koncentraciju, kao i kontrolnu grupu, koristi se najmanje po 20 jedinki, podijeljenih u 4 grupe (ponavljanja) od po 5 jedinki. Zapremina rastvora je dovoljna da obezbijedi minimum 2 ml rastvora po jedinki, odnosno, minimalna zapremina po posudi za ispitivanje je 10ml. Ispitivanje se odvija u polu-statičnim (uz kompletno periodično obnavljanje ispitivanog rastvora) ili u protočnim sistemima, ako koncentracije ispitivane supstanca nisu stabilne.

Postaviti po jednu kontrolnu grupu (4 posude sa po 5 jedinki) isključivo sa vodom korišćenom za razblaživanje. Ukoliko je korišćena i pomoćna supstanca pri pravljenju rastvora, postavlja se i dodatna kontrolna grupa sa pomoćnom supstancom rastvorenom u vodi za razblaživanje.

1.8.1.2. Određivanje koncentracije

Kada nisu dostupni podaci o toksičnosti ispitivane supstance, a u cilju određivanja opsega ispitivanih koncentracija, izvodi se preliminarno ispitivanje. Preliminarno ispitivanje se izvodi u

širokom opsegu koncentracija ispitivane supstance, pa je dovoljno postaviti po 5 jedinki po kontrolnoj i ispitivanoj grupi (bez ponavljanja). Dužina preliminarnog ispitivanja je 48 sati, ali ako se potrebni podaci dobiju u kraćem roku, ispitivanje se prekida nakon 24 sata.

Preliminarno ispitivanje se postavlja u 5 ispitivanih koncentracija, u geometrijskoj seriji sa faktorom od minimum 2,2. Obrazloženje je neophodno ako se koristi manje od 5 različitih ispitivanih koncentracija. U preliminarnom ogledu, izlaganje dafnija najvišoj primjenjenoj koncentracija dovodi do 100% imobilizacije, dok izlaganje najnižoj izabranoj koncentraciji ne dovodi do značajnijeg odgovora.

1.8.1.3. Uslovi u toku ispitivanja

Temperatura na kojoj se izvode ispitivanja za procjenu akutne toksičnosti je u opsegu od 18 °C do 22 °C, a u toku jednog ispitivanja akutne toksičnosti, izabrana temperatura ne varira više od ± 1 °C. Svijetlosni režim je od 16 sati svijezemljišta i 8 sati mraka, ali je kod fotonestabilnih supstanci dozvoljeno da se cijelo ispitivanje izvede u mraku.

U toku ispitivanja, nije dozvoljena aeracija rastvora u posudama. Ispitivanje izvesti bez podešavanja pH vrijednosti. Životinje se ne hrane u toku trajanja ispitivanja.

1.8.1.4. Dužina ispitivanja Ispitivanje traje 48 sati.

1.8.2. Posmatrani odgovor

Svaka posuda se provjerava nakon 24 i 48 sati od početka ispitivanja (definicije iz dijela 1.2. ove metode). Pored imobilizacije jedinki, prati se i bilježi svako neuobičajeno ponašanje ili pojava.

1.8.3. Mjerenja

Koncentracija rastvorenog kiseonika i pH vrijednost mjere se na početku i na kraju ispitivanja u kontrolnoj i u ispitivanoj grupi u kojoj je primjenjena najviša koncentracija ispitivane supstance. Koncentracija rastvorenog kiseonika u kontrolisanim grupama zadovoljava kriterijume kvaliteta (dio 1.6. ove metode). Ni u jednom ispitivanju pH vrijednost ne varira za više od 1,5. Temperatura se prati u posudama iz kontrolnih grupa ili u prostoriji u kojoj je postavljen ogled. Temperatura se neprekidno prati, a najmanje na početku i na kraju ispitivanja.

Koncentracije supstance izmjeriti u grupama sa najnižom i najvišom koncentracijom, na početku i na kraju ispitivanja. Rezultati se tumače na osnovu izmjerenih koncentracija. Ako se dokaže da se koncentracija ispitivane supstance ne mijenja u odnosu na nominalnu ili početno izmjerenu za više od ± 20%, rezultati se iskazuju na osnovu nominalnih ili početno izmjerenih vrijednosti.

1.9. Granična studija

Uz pomoć postupaka opisanih u ovoj metodi, izvodi se granična studija sa koncentracijom ispitivane supstance od 100 mg/l ili sa vrijednošću koncentracije rastvorljivosti supstance u medijumumu (bira se niža od ove dvije vrijednosti) kako bi se pokazalo da je LC_{50} viša od ove koncentracije. Granična studija se izvodi sa 20 jedinki dafnije, podijeljenih u 4 grupe od po 5 jedinki po posudi i sa istim brojem i rasporedom jedinki u kontrolnoj grupi. Ako dođe do imobilizacije jedinki u ispitivanoj grupi, izvodi se potpuno ispitivanje. Zabilježiti svako neuobičajeno ponašanje jedinki.

2. Podaci

Svi podaci dobijeni ispitivanjem akutne toksičnosti navode se tabelarno. Za svaku ispitivanu i kontrolnu grupu navodi se broj jedinki na početku ispitivanja i broj imobilisanih jedinki za svaki posmatrani interval.

Procenat imobilisanih jedinki nakon 24 i 48 sati grafički se prikazuje u funkciji ispitivanih koncentracija. Podaci se analiziraju primjerenom statističkom metodom (npr. probit analiza), iizračunava se nagib krive i EC_{50} sa 95% intervalima povjerenja (p = 0,05).

Ukoliko za dobijene rezultate standardne metode za iizračunavanje EC_{50} nisu primjenljive, za aproksimaciju EC_{50} uzima se geometrijska sredina između dvije ispitivane koncentracije - najviše ispitivane koncentracije koja nije dovela do imobilizacije i najniže ispitivane koncentracije koja je dovela do imobilizacije 100% jedinki u ispitivanoj grupi.

3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) ispitivanoj supstanci:
   - fizička i najvažnija fizička i hemijska svojstva;
   - podaci o hemijskim svojstvima, uključujući čistoću supstance;
2) ispitivanoj vrsti:
   - podaci o porijeklu i vrsti dafnija, dobavljač (ako je poznat), uslovi laboratorijaskog gajenja kulture (uključujući porijeklo, količine i vrstu hrane, dinamiku ishrane);
3) uslovima u toku ispitivanja:
   - opis posuda: tip posude, zapremina rastvora, broj jedinki po posudi, broj posuda po ispitivanoj koncentraciji (grupi);

- način pripreme osnovnog i ispitivanog rastvor, uključujući i podatke o upotrebi pomoćne supstance (vrsta i koncentracije);
- opis vode korišćene za razblaživanje; porjeklo i osnovne svojstva (pH, tvrdoća, odnos Ca/Mg, odnos Na/K, alkalitet, elektroprovodljivost..), sastav rekonstituisane vode (ako je korišćena);
- uslovi inkubacije: temperatura, intenzitet svijezemljišta i svijetlosni režim, koncentracija kiseonika, pH vrijednost, itd; 4) rezultatima:
- broj i procenat imobilisanih jedinki ili jedinki koje su pokazale znake stresa (uključujući atipično ponašanje) u kontrolisanim i svim ispitivanim grupama, u trenutku posmatranja, kao i opis uočenog odgovora;
- rezultate i datum ispitivanja sa referentom supstancom, ako su dostupni;
- nominalne koncentracije ispitivane supstance i rezultate svih mjerenja koncentracije ispitivane supstance u posudama, efikasnost analitičke metode korišćene za mjerenja i granice detekcije;
- rezultate svih mjerenja osnovnih fizičko-hemijskih parametara u toku ispitivanja (pH, koncentracija rastvorenog kiseonika);
- vrijednost EC_{50} nakon 48 sati za imobilizaciju kao posmatrani parametar sa intervalom povjerenja i grafički prikaz regresionog modela korišćenog za iizračunavanje EC_{50} vrijednosti; nagib krive dozne zavisnosti i standardna greška, statističke metode korišćene za iizračunavanje EC_{50} vrijednosti (ovi podaci se prilažu i ukoliko su izračunati za rezultate dobijene nakon perioda od 24 sata);
- objašnjenje za svako odstepene od metode i da li je odstepene uticalo na rezultate ispitivanja.

HEMIJSKE OSOBINE PRIHVATLJIVE VODE ZA RAZBLAŽIVANJE
DIO II

Supstanca	Koncentracija
Suspendovane materije	< 20 mg/l
Ukupni organski ugljenik	< 2 mg/l
Nejonizovan amonijak	< 1 µg/l
Rezidualni hlor	< 10 µg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
Ukupni organohlorni pesticidi plus polihlorovani bifenili	< 50 ng/l
Ukupni organski hlor	< 25 ng/l

PRIMJERI REKONSTITUISANE VODE ISO VODA ZA ISPITIVANJE[3]
DIO III

Osnovni rastvori (pojedinačne supstance)		Zapremine osnovnih rastvora koje se dodaju i dopuniti do 1 l vode[4] radi pripreme rekonstituisane vode
Supstanca	Konc. supstance u vodi[LV]	
Kalcijum-hlorid	11,76 g/l	25 ml

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$		
Magnezijum-sulfat $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	4,93 g/l	25 ml
Natrijum-bikarbonat $NaHCO_3$	2,59 g/l	25 ml
Kalcijum-hlorid KCl	0,23 g/l	25 ml

ELANDT M4 I M7 MEDIJUMUM
Adaptacija na Elandt M4 i M7 medijumum
Prilikom ispitivanja u laboratorijai otežano je direktno prebacivanje dafnija u Elandt M4 i M7 medijumum, što se olakšava postepenom aklimatizacijom, na primjer premještanjem dafnija iz sopstvenog u 30% Elandt, pa u 60% Elandt, pa tek onda u 100% Elandt. Mjesec dana je aklimatizacioni period.

Priprema

Mikronutrijenti

Posebni osnovni rastvori (I) pojedinih mikronutrijenata pripremaju se korišćenjem vode prihvatljive čistoće, npr. dejonizovane, destilovane ili vode dobijene reverznom osmozom. Od ovako pripremljenih osnovnih rastvora, pravi se sljedeći osnovni rastvor (II), koji sadrži sve potrebne mikroelemente.

Osnovni rastvor (I): mikronutrijenti (pojedinačne supstance)	Količina koja se u vodu dodaje (mg/l)	Koncentracija (u odnosu na M4)	Za pripremu kombinovanog osnovnog rastvora (II), dodati sljedeće zapremine osnovnih rastvora (I) i dopuniti do 1L vode	
			M4	M7
H_3BO_3	57.190	20.000 puta	1	0,25
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	7.210	20.000 puta	1	0,25
LiCl	6.120	20.000 puta	1	0,25
RbCl	1.420	20.000 puta	1	0,25

[3] Testing Method B.44. Skin Absorption: In vivo Method

[4] Voda prihvatljive čistoće npr. Dejonizovana, destilovana ili voda dobijena rezervnom osmozom, sa električnom provodljivošću ispod 10□*S /cm*

$SrCl_2 \cdot 6H_2O$	3.040	20.000 puta	1	0,25
NaBr	320	20.000 puta	1	0,25
$Na_2MoO_2 \cdot 2H_2O$	1.260	20.000 puta	1	0,25
$CuCl_2$	335	20.000 puta	1	0,25
$ZnCl_2$	260	20.000 puta	1	1
$CoCl_2x6H_2O$	200	20.000 puta	1	1
KJ	65	20.000 puta	1	1
Na_2SeO_3	43,8	20.000 puta	1	1
NH_4VO_3	11,5	20.000 puta	1	1

$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	5.000	2.000 puta	-	-
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1.991	2.000 puta	-	-

Na_2EDTA i $FeSO_4$ pripremaju se pojedinačno, pomiješaju i odmah autoklaviraju, što čini:

2 L rastvora Fe - EDTA		1.000 puta	20	5

Priprema Elandt M4 i M7 medijumuma

M4 i M7 medijumumi pripremaju se korišćenjem osnovnog rastvora (II), makronutrijenata i vitamina, na sljedeći način:

	Količina koja sevodu dodaje u (mg/l)	Koncentracija (u odnosu na M4)	Količina osnovnog rastvora (II) koja se dodaje pri pripremi medijumuma (mg/l)	
			M4	M7
Osnovni rastvor (II) (kombinovani mikronutrijenti)		20 puta	50	50
Osnovni rastvori makronutrijenata (pojedinačne supstance)				
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293.800	1.000 puta	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246.600	2.000 puta	0,5	0,5
KCl	58.000	10.000 puta	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64.800	1.000 puta	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	50.000	5.000 puta	0,2	0,2
$NaNO_3$	2.740	10.000 puta	0,1	1,0
KH_2PO_4	1.430	10.000 puta	0,1	1,0
K_2HPO_4	1.840	10.000 puta	0,1	1,0
Kombinovani vitaminski rastvor			0,1	0,1

Kombinovani vitaminski rastvor priprema se tako što se 3 vitamina dodaju u vodu na sljedeći način:

Tiamin-hidrohlorid	750	10.000 puta		
Cianokobalamin (B12)	10	10.000 puta		
Biotin	7,5	10.000 puta		

Kombinovani vitaminski rastvor se čuva u zamrzivaču, u malim porcijama. Vitaminski rastvor se dodaje u medijumum neposredno prije upotrebe. [31]

[31] Da se izbjegne taloţenje soli pri pripremi medijuma, pojedini rastvori se razblaţuju u 500 ml do 800 ml dejonizovane vode i dopune do 1 L.

1. Uvod

Ova metoda ispitivanja ekvivalentna je smjernici OECD-a za ispitivanje (TG) 2011. Prepoznata je potreba za proširenjem ove metode ispitivanja da bi se obuhvatile dodatne vrste i da bi se osavremenila kako bi zadovoljila zahtjeve u pogledu procjene opasnosti i klasifikacije hemikalija. Ova revizija izvršena je na osnovu širokog praktičnog iskustva, naučnog napretka u oblasti proučavanja toksičnosti algi i široke regulatorne upotrebe, koji su se desili poslije njenog prvobitnog donošenja. Korišćene definicije date su u Dodatku 1.

1.1 Načelo ispitivanja

Svrha ovog ispitivanja je da se odrede efekti hemikalije na rast slatkovodnih mikroalgi i/ili cijanobakterija. Ispitivani organizmi sa eksponencijalnim rastom izlažu se ispitivanoj hemikaliji u šaržnim kulturama u periodu koji obično iznosi 72 sata. Uprkos relativno kratkom trajanju ispitivanja, mogu se procjenjivati efekti na nekoliko generacija.

Odgovor sistema je smanjenje rasta niza kultura algi (jedinica ispitivanja) izloženih raznim koncentracijama ispitivane hemikalije. Odgovor se ocjenjuje kao funkcija koncentracije izlaganja u poređenju s prosječnim rastom repliciranih, neizlaganih kontrolnih kultura. Da bi odgovor sistema na toksične efekte došao do punog izražaja (optimalna osjetljivost), kulturama se prije mjerenja smanjenja specifične stope rasta dozvoljava neograničen eksponencijalni rast u dovoljnom vremenskom periodu i u uslovima dovoljne ishranjenosti i neprekidne osvijetljenosti.

Rast i inhibicija rasta kvantifikuju se mjerenjima biomase algi u funkciji vremena. Biomasa algi definiše se kao suva masa po zapremini, npr. mg algi/litru ispitnog rastvora. Međutiim, suvu masu je teško izmjeriti, pa se koriste zamjenski parametri. Od tih zamjenskih parametara najčešće se koristi broj ćelija. U ostale zamjenske parameter spadaju ćelijska zapremina, fluorescentnost, optička gustina, itd. Potrebno je da bude poznat faktor konverzije izmjerenog zamjenskog parametra u biomasu.

Parametar praćenja u ovom ispitivanju je inhibicija rasta, izražena kao logaritamsko povećanje biomase (prosječna specifična stopa rasta) u toku perioda izlaganja. Iz prosječnih specifičnih stopa rasta zabilježenih u nizu ispitnih rastvora određuje se koncentracija koja dovodi do specifične x-procentne inhibicije stope rasta (npr. 50%) i izražava kao E_rC_x (npr. E_rC_{50}).

Dodatna varijabla odgovora koja se upotrebljava u ovoj metodi ispitivanja je prirast, koji može biti potreban za ispunjavanje specifičnih regulatornih zahtjeva u nekim zemljama. Prirast je definisan kao biomasa na kraju perioda izlaganja umanjena za biomasu na početku perioda izlaganja. Iz prirasta zabilježenog u nizu ispitnih rastvora računa se koncentracija koja dovodi do specifične xprocentne inhibicije prirasta (npr. 50%) i izražava se kao E_yC_x (npr. E_yC_{50}).

Osim toga, statistički se može odrediti najniža koncentracija sa vidljivim efektom (LOEC) i najveća koncentracija bez vidljivog efekta (NOEC).

1.2 Informacije o hemikaliji koja se ispituje

U informacije o hemikaliji koja se testira, a koje mogu biti korisne prilikom utvrĐivanja uslova ispitivanja, spadaju strukturna formula, čistoća, postojanost na svjetlosti, postojanost pod uslovima ispitivanja, svojstva apsorpcije svjetlosti, pKa i rezultati studija transformacije uključujući biorazgradljivost u vodi.

Treba da budu poznati rastvorljivost u vodi, koeficijent raspodjele oktanol-voda (P_{ow}) i pritisak pare hemikalije koja se testira, kao i da bude dostupna provjerena metoda za kvantifikaciju hemikalije u ispitnim rastvorima sa dokumentovanom efikasnošću iskorišćenja i granicom detekcije.

1.3. Validnost ispitivanja

Da bi ispitivanje bilo validno potrebno je da budu ispunjeni sljedeći kriterijumi:

— Potrebno je da se biomasa u kontrolisanim kulturama eksponencijalno poveća najmanje 16 puta u okviru 72-časovnog perioda ispitivanja. To odgovara specifičnoj stopi rasta od 0,92 dan^{-1}. Za najčešće korišćene vrste stopa rasta je obično znantno veća (v. Dodatak 2). Moguće je da ovaj kriterijum ne bude ispunjen ako se koriste vrste koje rastu sporije od onih navedenih u Dodatku 2. U tom slučaju potrebno je produžiti period ispitivanja da bi se dobio najmanje šesnaestostruki rast u kontrolisanim kulturama, pri čemu rast mora biti eksponencijalan u toku cijelog perioda ispitivanja. Period ispitivanja može se skratiti na najmanje 48 sati da bi se održao neograničeni, eksponencijalni rast u toku ispitivanja pod uslovom da je postignut činilac uvećanja od najmanje 16.

Srednji koeficijent varijacije etapnih specifičnih stopa rasta (dani 0-1, 1-2 i 2-3, za 72časovna ispitivanja) u kontrolisanim kulturama (v. u Dodatku 1 pod —koeficijent varijacije‖) ne smije premašiti 35 %. V. za iizračunavanje etapne specifične stope rasta. Ovaj kriterijum odnosi se na srednju vrijednost koeficijenata varijacije izračunatih za ponavljane kontrolne culture.

Koeficijent varijacije prosječnih specifičnih stopa rasta u toku cijelog perioda ispitivanja u ponavljanim kontrolisanim kulturama ne smije premašiti 7% u ispitivanjima sa vrstama Pseudokirchneriella subcapitata i Desmodesmus subspicatus. Za ostale, rjeĐe ispitivane vrste, ta vrijednost ne smije premašiti 10%.

1.4. Referentne hemikalije

Referentna hemikalija ili hemikalije, kao što je 3,5-dihlorofenol koji je korišćen u međunarodnom uporednom ispitivanju (1), mogu se testirati da bi se provjerio postupak ispitivanja. Kao referentna hemikalija za zelene alge može se koristiti i kalijum dihromat. Poželjno je da se referentna hemikalija testira najmanje dva puta godišnje.

1.5. Primjenljivost ispitivanja

Ova metoda ispitivanja najlakše se primjenjuje na hemikalije rastvorljive u vodi za koje se može pretpostaviti da će, u uslovima ispitivanja, vjerovatno ostati u vodi. Za ispitivanje hemikalija koje su isparljive, veoma adsorptivne, obojene, slabo rastvorljive u vodi ili hemikalija koje mogu uticati na dostupnost nutrijenata ili minerala u medijumumu za ispitivanje može biti potrebno da se izvrše određene izmjene u opisanom postupku (npr. zatvoreni sistem, kondicioniranje ispitnih posuda).

2. Opis metode ispitivanja

2.1 Aparatura

Ispitne posude i druga aparatura koja će doći u kontakt sa ispitnim rastvorima treba da budu napravljeni u cjelosti od stakla ili drugog hemijski inertnog materijala. Sastavne djelove treba temeljno oprati kako nikakvi organski niti neorganski kontaminanti ne bi uticali na rast algi ili na sastav ispitnih rastvora.

Ispitne posude su obično stakleni baloni dimenzija takvih da omogućavaju dovoljnu zapreminu kulture za mjerenja u toku ispitivanja i dovoljan prenos mase CO_2 iz atmosfere. Zapremina tečnosti mora biti dovoljna za analitička određivanja.

Osim toga, može biti potrebno nešto od sljedeće opreme:

— Inkubator za uzgoj: preporučuje se ormar ili komora u kojoj se odabrana temperature inkubacije može održavati sa odstepenima do ± 2 °C.
— Instrumenti za mjerenje svjetlosti: važno je napomenuti da metoda mjerenja intenziteta svjetlosti, a naročito vrsta receptora (kolektora), može uticati na izmjerenu vrijednost. Poželjno je da se mjerenja vrše uz pomoć sfernog (4 π) receptora (koji reaguje na direktnu i reflektovanu svjetlost iz svih uglova iznad i ispod mjerne ravni), ili 2 π receptora (koji reaguje na svjetlost iz svih uglova iznad mjerne ravni).
— Aparatura za određivanje biomase algi. Broj ćelija, najčešće korišćeni zamjenski parameter za biomasu algi, može se odrediti uz pomoć elektronskog brojača čestica, mikroskopa sa komorom za brojanje ili protočnog citometra. Drugi zamjenski parametric biomase mogu se mjeriti uz pomoć protočnog citometra, fluorimentra, spektrofotometra ili kolorimetra. Korisno je izračunati faktor konverzije broja ćelija u suvu masu. Da bi se prilikom upotrebe spektrometra dobili upotrebljivi rezultati mjerenja pri niskim koncentracijama biomase, može biti neophodno da se upotrijebe kivete sa optičkim putem od najmanje 4 cm.

2.2 Organizmi koji se ispituju

Može se koristiti nekoliko vrsta slobodnoplivajućih mikroalgi i cijanobakterija. Uz pomoć navedenog postupka ispitivanja dokazano je da su sojevi nabrojani u Dodatku 2 pogodni za ispitivanje ovom metodom.

Ako se koriste druge vrste, potrebno je navesti soj i/ili porijeklo. Potrebno je uvjeriti se da se eksponencijalni rast alge izabrane za ispitivanje može održati u toku cijelog perioda ispitivanja pod preovlaĐujućim uslovima.

2.4 Medijumum za uzgoj

Preporučuju se dva alternativna medijumuma za uzgoj, OECD i AAP medijumum. Sastavi tih medija dati su u Dodatku 3. Potrebno je napomenuti da su početna pH vrijednost i puferski kapacitet (za regulaciju povećanja pH vrijednosti) ta dva medijumuma različiti. Stoga se rezultati ispitivanja mogu razlikovati u zavisnosti od korišćenog medijumuma, a naročito kada se ispituju jonizujuće hemikalije.

Za određene svrhe može biti neophodna modifikacija medijumuma za uzgoj, npr. kada se ispituju metali i helatni agensi ili ili kada se ispitivanje vrši pri različitim pH vrijednostima. Potrebno je detaljno opisati i obrazložiti upotrebu modifikovanog medijumuma.

Početna koncentracija biomase

Početna biomasa u kulturama koje se ispituju mora biti ista u svim ispitivanim kulturama i dovoljno mala da omogući eksponencijalni rast tokom cijelog perioda inkubacije bez rizika od iscrpljenja nutrijenata. Početna biomasa ne smije premašiti 0,5 mg/l suve mase. Preporučuju se sljedeće početke koncentracije ćelija:

Pseudokirchneriella subcapitata:	$5 \times 10^3 – 10^4$ ćelija/ml
Desmodesmus subspicatus	$2\text{-}5 \times 10^3$ ćelija/ml
Navicula pelliculosa	104 ćelija/ml
Anabaena flos-aquae	104 ćelija/ml
Synechococcus leopoliensis	$5 \times 10^4 – 10^5$ ćelija/ml

Koncentracije hemikalije koja se ispituje

Raspon koncentracija pri kojima se mogu očekivati efekti može se odrediti na osnovu rezultata testa za određivanje raspona. Za konačno, definitivno ispitivanje potrebno je odabrati najmanje pet koncentracija, poređanih u geometrijskom nizu sa faktorom koji nije veći od 3.2. Veći faktor može biti opravdan za ispitivane hemikalije koje daju ravnu krivu koncentracija-odgovor. Poželjno je da niz koncentracija obuhvata raspon koji prouzrokuje inhibiciju stope rasta algi od 5 fo 75%.

Ponavljanja i kontrole

Plan ispitivanja treba da sadrži po tri ponavljanja za svaku ispitivanu koncentraciju. Ako nije potrebno odrediti NOEC, plan ispitivanja može se izmijeniti tako da se poveća broj koncentracija i smanji broj ponavljanja po koncentraciji. Broj kontrolnih ponavljanja mora iznositi najmanje tri, a u idealnom slučaju treba da bude dva puta veći od broja ponavljanja izvršenih za svaku ispitivanu koncentraciju.

Za analitička određivanja koncentracija ispitivane hemikalije može se pripremiti posebna grupa ispitnih rastvora.

Kada se rassupstancaač koristi za solubilizaciju ispitivane hemikalije, plan ispitivanja mora predvidjeti dodatne kontrole sa rassupstancaačem u istoj koncentraciji kao u ispitivanim kulturama.

Pripremanje kulture inokuluma

Da bi se ispitivane alge prilagodile uslovima ispitivanja i obezbijedilo da alge budu u fazi eksponencijalnog rasta onda kada se koriste za inokulaciju ispitnih rastvora, kultura inokuluma u medijumumu za ispitivanje priprema se 2-4 dana prije početka ispitivanja. Biomasu algi treba prilagoditi tako da se omogući da eksponencijalni rast postane preovlađujući u kulturi inokuluma do početka ispitivanja. Kulturu inokuluma potrebno je inkubirati pod istim uslovima kao ispitivane kulture. Potrebno je mjeriti porast biomase u kulturi inokuluma kako bi se obezbijedilo da se rast odvija u granicama normalnim za ispitivani soj u uslovima uzgoja. Primjer postupka za uzgoj algi opisan je u Dodatku 4. Može biti potrebno da se učini još jedan korak u razmnožavanju kulture inokuluma da bi se izbjegle istovremene diobe ćelija u toku ispitivanja.

Priprema ispitnih rastvora

Svi ispitni rastvori moraju sadržati iste koncentracije medijumuma za uzgoj i istu početnu biomasu algi koje se ispituju. Ispitni rastvori izabranih koncentracija obično se pripremaju miješanjem osnovnog rastvora ispitivane hemikalije sa medijumumom za uzgoj i kulturom inokuluma. Osnovni rastvori obično se pripremaju rastvaranjem hemikalije u medijumumu za ispitivanje.

Rassupstancaači kao što su npr. aceton, t-butil alkohol i dimetil formamid mogu se koristiti kao nosači za dodavanje hemikalija slabo rastvorljivih u vodi u medijumum za ispitivanje (2)(3). Koncentracija rassupstancaača ne smije biti veća od 100 µl/l, pri čemu je potrebno svim kulturama (uključujući i kontrolne) u ispitivanom nizu dodati istu koncentraciju rassupstancaača.

Inkubacija

Ispitne posude začepe se čepovima koji su propustljivi za vazduh. Posude se protresu i stave u inkubator za uzgoj. Tokom ispitivanja neophodno je držati alge u suspenziji i olakšati prenos CO_2. To se radi stalnim tresenjem ili miješanjem. Kulture treba držati na temperaturi u rasponu od 21 do 24 °C, uz dopušteno kolebanje od ± 2 °C. Za vrste koje nijesu navedene u Dodatku 2, npr. tropske vrste, veće temperature mogu biti odgovarajuće pod uslovom da se kriterijumi validnosti mogu ispuniti. Preporučuje se da se stakleni baloni nasumično rasporede u inkubatoru i da se svakodnevno razmještaju.

U toku ispitivanja pH vrijednost kontrolnog medijumuma ne smije porasti za više od 1,5 jedinica. Za metale i hemikalije koji se djelimično jonizuju pri pH vrijednosti koja je približna ispitnoj pH vrijednosti može biti neophodno ograničiti pomak pH vrijednosti da bi se dobili reproducibilni i dobro definisani rezultati. Pomak od < 0,5 pH jedinica tehnički je izvodljiv i može se postići tako što se obezbijedi odgovarajuća stopa prenos mase CO_2 iz okolnog vazduha u ispitni rastvor, npr. povećanjem brzine trešenja. Druga mogućnost je da se smanji potrošnja CO_2 tako što će se smanjiti početna biomasa ili trajanje ispitivanja.

Površina na kojoj se kulture inkubiraju treba da bude neprekidno osvijetljena ravnodnosnom fluorescentnom svjetlošću, npr. —hladno bijelog‖ ili —dnevnog‖ tipa. Sojevi algi i cijanobakterija razlikuju se međusobno u pogledu potrebe za svjetlošću. Intenzitet svjetlosti treba odabrati tako da odgovara organizmu koji se koristi u ispitivanju. Za preporučene vrste zelenih algi treba izabrati intenzitet svjetlosti na nivou ispitnih rastvora u rasponu 60-120 µE · m– 2 · s– 1 kada se mjerenje vrši u fotosintetički efektivnom opsegu talasnih dužina od 400 do700 nm uz upotrebu odgovarajućeg receptora. Neke vrste, a naročito *Anabaena flos-aquae*, dobro rastu pod slabijim intenzitetom svjetlosti, dok ih veći intenzitet svjetlosti može oštetiti. Za takve vrste treba oiabrati prosječan intenzitet svjetlosti u rasponu 40-60 µE · m– 2 · s– 1. (Za instrumente za mjerenje svjetlosti koji su baždareni u luksima, ekvivalentni raspon od 4 440 - 8 880 luksa za hladnu bijelu svjetlost približno odgovara preporučenom intenzitetu svjetlosti od 60-120 µE · m– 2 · s– 1). Intenzitet svjetlosti potrebno je održavati u granicama od ±15 % od prosječnog intenziteta svjetlosti na površini na kojoj se odvija inkubacija.

Trajanje ispitivanja

Ispitivanje obično traje 72 sata. Međutiim, ispitivanje može trajati kraće ili duže pod uslovom da se mogu ispuniti svi kriterijumi validnosti.

Mjerenja i analitička određivanja

U toku perioda ispitivanja, biomasa algi u svakom staklenom balonu određuje se najmanje jednom dnevno. Ako se mjerenja vrše na malim količinama izvaĐenim pipetom iz ispitnog rastvora, izvaĐena količina ne mora se nadomjestiti.

Mjerenje biomase vrši se ručnim prebrojavanjem ćelija pod mikroskopom ili elektronskim brojačem čestica (po broju ćelija i/ili biovolumenu). Alternativne tehnike, npr. protočna citometrija, fluorescencija hlorifila *in vitro* ili *in vivo* ili optička gustina mogu se koristiti ako se na opsegu biomase koja se javlja u ispitivanju može pokazati zadovoljavajuća korelacija sa biomasom.

Na početku i na kraju ispitivanja mjeri se pH vrijednost rastvora.

Pod uslovom da je dostupan analitički postupak za određivanje ispitivane hemikalije u korišćenom rasponu koncentracija, ispitne rastvore treba analizirati kako bi se provjerile početne koncentracije i održanje koncentracija izloženosti u toku ispitivanja.

Ako se očekuje da će u toku ispitivanja koncentracije izloženosti varirati za manje od 20% u odnosu na nominalne vrijednosti, može biti dovoljno izvršiti analizu koncentracije ispitivane hemikalije u jednoj niskoj i jednoj visokoj ispitnoj koncentraciji na početku i na kraju ispitivanja i koncentraciju oko očekivane vrijednosti EC_{50}. Ako se ne očekuje da će koncentracije ostati u
granicama od 80-120% nominalne koncentracije, preporučuje se analiza svih ispitnih koncentracija na početku i na kraju ispitivanja. Za isparljive, nestabilne ili jako adsorbujuće ispitne hemikalije preporučuje se uzimanje dodatnih uzoraka za analizu u toku perioda izloženosti i to na svakih 24 sata, u cilju boljeg definisanja gubitka ispitivane hemikalije. Za te hemikalije mogu biti potrebna dodatna ponavljanja. U svim slučajevima, određivanje koncentracija ispitne hemikalije potrebno je vršiti samo na jednoj replikativnoj posudi u svakoj ispitnoj koncentraciji (ili na sadržaju dotične grupe replikativnih posuda združenom u jednoj posudi).

Medijumume za ispitivanje koji su posebno pripremljeni za analizu koncentracija izloženosti u toku ispitivanja treba tretirati isto kao medijumume koji se koriste za ispitivanje, tj. potrebno ih je inokulisati algama i izvršiti inkubaciju pod identičnim uslovima. Ako je potrebno izvršiti analizu koncentracije rastvorene ispitne hemikalije, može biti neophodno odvojiti alge od medijumuma. Poželjno je da se odvajanje vrši centrifugiranjem pri g-sili koja je mala ali dovoljna da se postigne taloženje algi.

Ako postoje dokazi da je koncentracija ispitivane hemikalije u toku cjelokupnog ispitivanja na zadovoljavajući način održavana u granicama ± 20 % u odnosu na nominalnu koncentraciju ili u odnosu na izmjerenu početnu koncentraciju, analiza rezultata može se zasnivati na nominalnim ili izmjerenim početnim vrijednostima. Ako odstepene od nominalne ili izmjerene početne koncentracije nije u rasponu od ± 20 %, analiza rezultata treba da se zasniva na geometrijskoj srednjoj koncentraciji u toku izloženosti ili na modelima koji opisuju opadanje koncentracije ispitivane hemikalije.

Ispitivanje inhibicije rasta algi je dinamičniji sistem ispitivanja od većine drugih kratkoročnih ispitivanja toksičnosti po vodenu životnu sredinu. Zbog toga je nekad teško odrediti ssupstancane koncentracije izloženosti, naročito adsorbujućih hemikalija koje se ispituju pri niskim koncentracijama. U takvim slučajevima, nestajanje ispitivane hemikalije iz rastvora putem adsorpcije koju vrši sve veća biomasa algi ne znači da je hemikalija

nestala iz ispitnog sistema. Prilikom ispitivanja rezultata analize potrebno je provjeriti da li je opadanje koncentracije ispitivane hemikalije u toku ispitivanja praćeno opadanjem inhibicije rasta. Ako je to tako, može se razmotriti primjena odgovarajućeg modela koji opisuje opadanje koncentracije ispitivane hemikalije (7). Ako nije tako, možda je primjereno bazirati analizu rezultata na početnim (nominalnim ili izmjerenim) koncentracijama.

Ostala posmatranja

Na kraju ispitivanja potrebo je izvršiti mikroskopski pregled, da bi se utvrdilo da kultura inokuluma ima normalan i zdrav izgled i da bi se primijetio eventualni abnormalni izgled algi (koji može biti prouzrokovan izlaganjem ispitivanoj hemikaliji).

Granično ispitivanje

Pod određenim okolnostima, npr. kada preliminarno ispitivanje pokaže da ispitivana hemikalija nema nikakve toksične efekte na koncentracije do 100 mg/l ili do njene granice rastvorljivosti u medijumumu za ispitivanje (u zavisnosti od toga šta ima nižu vrijednost), može se izvršiti granično ispitivanje koje sadrži poređenje odgovora kontrolne grupe i jedne tretirane grupe (100 mg/l ili koncentracija jednaka granici rastvorljivosti). Izričito se preporučuje da se uz to izvrši i analiza koncentracije izlaganja. Svi prethodno opisani uslovi ispitivanja i kriterijumi validnosti primjenjuju se i na granično ispitivanje, uz izuzetak što broj ponavljanja u okviru ispitivane grupe treba da iznosi najmanje šest. Varijable odgovora u kontrolnoj i u tretiranoj grupi mogu se analizirati uz pomoć statističkog testa radi poreĐenja srednjih vrijednosti, npr. Studentovim
(Student) t-testom. Ako su varijanse te dvije grupe nejednake, potrebno je izvesti prilagoĐeni ttest za nejednake varijanse.

3. Podaci i izvještavanje

Grafički prikaz krivih rasta

Biomasa u ispitnim posudama može se izraziti u jedinicama zamjenskog parametra koji se koristi za mjerenje (npr. broj ćelija, fluorescencija).

Da bi se dobio grafički prikaz krivih rasta, potrebno je napraviti tabelu procijenjene koncentracije biomase u ispitivanim kulturama i kontrolisanim kulturama zajedno sa koncentracijama ispitivanog materijala i vremenima mjerenja, zabilježenim sa rezolucijom od najmanje jednog cijelog sata. U ovoj prvoj fazi mogu biti korisne kako logaritamske tako i linearne skale, ali su logaritamske skale obavezne i uopšteno govoreći bolje prikazuju varijacije u obrascu rasta u toku perioda ispitivanja. Potrebno je imati u vidu da eksponencijalni rast daje pravu liniju kada se grafički prikaže na logaritamskoj skali, pri čemu nagib linije (kosina) ukazuje na specifičnu stopu rasta.

Uz pomoć grafičkih prikaza potrebno je provjeriti da li tokom ispitivanja kontrolne kulture rastu eksponencijalno i očekivanom brzinom. Potrebno je kritički preispitati sve tačke podataka i izgled grafikona i provjeriti da li u neobraĐenim podacima i pokolonama ima greški. Naročito treba provjeriti one tačke podataka za koje djeluje da odstupaju zbog sistemske greške. Ako je očigledno da se mogu utvrditi greške u postupku ili da se mogu smatrati veoma vjerovatnim, ta konkretna tačka podataka se obilježava kao netipična vrijednost i ne uključuje se u kasniju statističku analizu. (Nulta koncentracija algi u jednoj

od dvije ili tri replikativne posude može značiti da posuda nije pravilno inokulirana ili da je nepravilno očišćena). U izvještaju o ssprovedenom ispitivanju potrebno je jasno navesti razloge za odbacivanje neke tačke podataka kao netipične vrijednosti. Kao opravdani razlozi prihvataju se samo (rijetke) greške u postupku, ali ne i prosta nepreciznost. Kod ove vrste problema statistički postupci za identifikaciju netipičnih vrijednosti imaju ograničenu primjenu i ne mogu zamijeniti stručno mišljenje. Netipične vrijednosti (koje su označene kao takve) treba po mogućnosti zadržati među prikazanim tačkama podataka u eventualnim kasnijim grafičkim ili tabelarnim prikazima podataka.

Varijable odgovora

Svrha ovog ispitivanja je da se odrede efekti ispitivane hemikalije na rast algi. Ova metoda ispitivanja opisuje dvije varijable odgovora, obzirom da različite jurisdikcije imaju različite preferencije i regulatorne zahtjeve. Da bi rezultati ispitivanja bili prihvatljivi u svim jurisdikcijama, efekti treba da se vrednuju uz pomoć obje varijable (a) i (b) čiji opis slijedi.

(a) **Prosječna specifična stopa rasta**: ova varijabla odgovora računa se na osnovu logaritamskog povećanja biomase u toku perioda ispitivanja, izraženog po danu

(b) **Prirast** : ova varijabla odgovora je biomasa na kraju ispitivanja umanjenu za početnu biomasu.

Vrijednosti toksičnosti izračunate upotrebom ove dvije varijable odgovora nijesu uporedive i da se ta razlika mora uzeti u obzir prilikom korišćenja rezultata ispitivanja. Vrijednosti EC_x zasnovane na prosječnoj specifičnoj stopi rasta (E_rC_x) generalno će biti veće od rezultata zasnovanim na prirastu (E_yC_x) ako su primijenjeni ispitni uslovi ove metode, zbog matematičke osnove tih pristupa. To ne treba tumačiti kao razliku u osjetljivosti između dvije varijable odgovora, već da su te vrijednosti jednostavno matematički različite. Koncept prosječne specifične stope rasta zasnovan je na opštem obrascu eksponencijalnog rasta algi u neograničenim kulturama, gdje je toksičnost procijenjena na osnovu efekata na stopu rasta, nezavisno od apsolutnog nivoa specifične stope rasta kontrolne kulture, nagiba krive koncentracija-odgovor ili trajanja ispitivanja. Nasuprot tome, rezultati zasnovani na varijabli odgovora ‘prirast‘ zavisni su od svih tih drugih varijabli. E_yC_x zavisi od specifične stope rasta vrsta algi korišćenih u svakom od ispitivanja i od maksimalne specifične stope rasta koja se može razlikovati između vrsta, pa čak i između sojeva algi. Ovu varijablu odgovora ne treba koristiti za upoređivanje osjetljivosti na toksine među vrstama algi ili čak među različitim sojevima algi. Iako upotreba prosječne specifične stope rasta za procjenjivanje toksičnosti ima naučnu prednost, procjene toksičnosti koje se zasnivaju na prirastu takođe su obuhvaćene ovom metodom ispitivanja da bi se ispunili važeći regulatorni zahtjevi u nekim zemljama.

Prosječna stopa rasta

Prosječna specifična stopa rasta za neki konkretni period računa se kao logaritamsko povećanje biomase za svaku pojedinačnu kontrolnu i ispitnu posudu primjenom sljedeće jednačine:

$$\mu_{i-1} = \frac{lnX_j - lnX_i}{t_j - t_i} \quad dan^{-1}$$

gdje je:

μ_{i-j} prosječna specifična stopa rasta od vremena *i* do vremena *j*;
X_i je biomasa u vremenu *i*;
X_j je biomasa u vremenu *j*

Za svaku ispitnu i kontrolnu grupu treba izračunati srednju vrijednost stope rasta s procjenom varijanse.

Potrebno je izračunati prosječnu specifičnu stopu rasta za vrijeme cjelokupnog trajanja ispitivanja (obično 0-3 dana), tako što se kao početna vrijednost koristi nominalno inokulisana biomasa umjesto izmjerene početne vrijednosti, jer se na taj način obično postiže veća preciznost. Ako oprema koja se koristi za mjerenje biomase omogućava dovoljno precizno određivanje male biomase inokuluma (npr. protočni citometar), u tom slučaju može se koristiti izmjerena početna koncentracija biomase. TakoĐe je potrebno procijeniti etapnu stopu rasta, izračunatu kao specifične stope rasta za svaki dan u toku ispitivanja (dani 0-1, 1-2 i 2-3) i ispitati da li kontrolna stopa rasta ostaje nepromjenljiva (vidjeti kriterijume validnosti). Značajno manja specifična stopa rasta u prvom danu u odnosu na ukupnu prosječnu specifičnu stopu rasta može ukazivati na fazu zaostajanja. Dok se faza zaostajanja u kontrolisanim kulturama može svesti na najmanju mjeru i praktično eliminisati pravilni razmnožavanjem pretkulture, u kulturama izloženim hemikaliji faza zaostajanja može ukazivati na oporavak nakon početnog toksičnog šoka ili na manje izlaganje zbog gubitka ispitivane hemikalije (uključujući sorpciju na biomasu algi) nakon početnog izlaganja. Stoga se može procijeniti etapna stopa rasta radi ocjene efekata ispitivane hemikalije koji se javljaju u toku perioda izlaganja. Znatne razlike između etapne stope rasta i prosječne stope rasta ukazuju na odstepene od konstantnog eksponencijalnog rasta i iziskuju pažljivo ispitivanje krivih rasta.

Potrebno je izračunati procentualnu inhibiciju stope rasta za svako ponavljanje u okviru ispitivane grupe uz pomoć sljedeće jednačine:

$$\%I_r = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_c} \times 100$$

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$ [2],

gdje je:

$\%I_r$ = procentualna inhibicija prosječne specifične stope rasta; μ_C = srednja vrijednost prosječne specifične stope rasta (μ) u kontrolnoj grupi; μ_T = prosječna specifična stopa rasta za dato ponavljanje u okviru ispitivane grupe.

Ako se za pripremanje ispitnih rastvora koriste rassupstancaači, prilikom izračunavanja procentualne inhibicije potrebno je koristiti kontrolne grupe sa rassupstancaačem umjesto kontrolnih grupa bez rassupstancaača.

Prirast

Prirast se računa kao biomasa na kraju ispitivanja umanjena za početnu biomasu za svaku pojedinačnu posudu kontrolne i ispitivane grupe. Za svaku ispitnu koncentraciju i kontrolnu grupu, uz davanje procjene varijansi treba izračunati srednju vrijednost prirasta. Procentualna inhibicija prirasta (%Iy) može se izračunati za svako ponavljanje u okviru ispitivane grupe, na sljedeći način:

$$\%I_y = \frac{Y_c - Y_T}{Y_c} \times 100$$

gdje je:

$\%I_y$ = procentualna inhibicija prirasta;
Y_C = srednja vrijednost prirasta u kontrolnoj grupi;
Y_T = vrijednost prirasta za dato ponavljanje u okviru ispitivane grupe.

Grafički prikaz krive odgovora na koncentraciju

Potrebno je grafički prikazati procenat inhibicije u odnosu na logaritam koncentracije ispitivane hemikalije i pažljivo pregledati grafikon, zanemarujući pritom eventualne tačke podataka koje su u prvoj fazi izdvojene kao netipične vrijednosti. Golim okom ili kompjuterizovanom interpolacijom prilagoditi pravilnu krivu tačkama podataka kako bi se dobio prvi utisak o odnosu koncentracija-odgovor, a potom primijeniti detaljniju metodu, po mogućstvu kompjuterizovanu statističku metodu. U zavisnosti od namjene za koju će se podaci koristiti, kvaliteta (preciznosti) i količine podataka, kao i dostupnosti alata za analizu podataka, može se donijeti odluka (ponekad sasvim opravdana) da se analiza podataka prekine u ovoj fazi i da se prosto očitaju ključne vrijednosti EC_{50} i EC_{10} (i/ili EC_{20}) sa krive prilagođene golim okom (v. takođe u nastavku odjeljak o stimulatornim efektima). U valjane razloge da se ne koristi statistička metoda spada sljedeće:

— Podaci nijesu pogodni za to da se kompjuterizovanim metodama dobiju pouzdaniji podaci od onih koji se mogu dobiti stručnim prosuđivanjem – u takvim situacijama može se čak desiti da neki kompjuterski programi ne daju pouzdano rješenje (iteracije ne konverguju, itd.)

— Odgovori na stimulisani rast ne mogu se na odgovarajući način obraditi rapoloživim kompjuterskim programima.

Statistički postupci

Cilj je dobiti kvantitativni odnos koncentracija-odgovor regresionom analizom. Moguće je koristiti ponderisanu linearnu regresiju nakon što se izvrši linearizacijska transformacija podataka odgovora - na primjer u jedinice probit ili logit ili Vejbul (Weibull) (8), ali se pokolonama nelinearne regresije daje prednost jer su to tehnike koje se bolje nose sa neizbježnim nepravilnosti podataka i odstepenima od pravilnih distribucija. Bližeći se nultoj ili potpunoj inhibiciji, te nepravilnosti može uvećati transformacija, što ometa analizu (8). Treba napomenuti da su standardne metode analize uz pomoć vrijednosti probit, logit ili Vejbul (Weibull) dobijenih transformacijom namijenjene za upotrebu na kvantalnim podacima (npr. mortalitet ili preživljavanje) i da se moraju prilagoditi da bi se mogle primijeniti na podatke o rastu ili biomasi. Konkretni postupci za određivanje vrijednosti EC_x iz kontinualnih podataka mogu se naći u literaturi pod (9) (10) i (11). Upotreba nelinearne regresione analize podrobnije je opisana u Dodatku 5.

Za svaku varijablu odgovora koju treba analizirati potrebno je izračunati procjene tačaka za vrijednosti EC_x koristeći pritom odnos koncentracija-odgovor. Ako je moguće, treba odrediti granice pouzdanosti od 95% za svaku procjenu. Potrebno je izvršiti grafičku ili statističku procjenu valjanosti poklapanja podataka odgovora sa regresionim modelom. Regresionu analizu treba izvršiti na osnovu pojedinačnih odgovora ponavljanja, a ne na osnovu srednjih vrijednosti ispitivane grupe. Ako je, međutiim, nelinearno prilagođavanje

krive teško ili ne uspijeva zbog prevelike rasijanosti podataka, taj problem se može zaobići izvoĐenjem regresije na srednjim vrijednostima grupe kao praktičnim načinom smanjivanja uticaja mogućih netipičnih vrijednosti. U izvještaju o ssprovedenom ispitivanju potrebno je naznačiti upotrebu ove varijante kao odstepene od uobičajenog postupka zbog toga što prilagoĐavanje krive pojedinačnim ponavljanjima nije dalo dobar rezultat.

Ukoliko su rapoloživi regresioni modeli/metode nepogodni za dotične podatke, procjene vrijednosti EC_{50} i granice pouzdanosti mogu se dobiti i linearnom interpolacijom sa samonadopunjavanjem ('bootstrapping').

Za procjenu najniže koncentracije sa vidljivim efektom (LOEC), a samim tim i najveće koncentracije bez vidljivog efekta (NOEC), u pogledu efekata ispitivane hemikalije na stopu rasta, neophodno je uporediti srednje vrijednosti ispitivane grupe kroz upotrebu tehnika analize varijanse (ANOVA). Srednja vrijednost za svaku koncentraciju mora se zatim uporediti sa srednjom vrijednošću kontrolne grupe, i to primjenom odgovarajuće metode višestrukog poreĐenja ili metode testa trenda. Danitov (Dunnett) ili Vilijamsov (Williams) test može biti koristan. Neophodno je procijeniti da li je ANOVA-ina pretpostavka homogenosti varijanse valjana. Ta procjena može se izvesti grafički ili formalnim testom. Pogodni testovi su Levinov (Levene) ili Bartletov (Bartlett). Ako pretpostavka homogenosti varijanse nije valjana, to se može ponekad korigovati logaritamskom transformacijom podataka. Ako je heterogenost varijanse ekstremna i ne može se korigovati transformacijom, treba razmotriti analizu upotrebom metoda kao što su Jonkirovi (Jonkheere) testovi trenda sa postupnim snižavanjem.

Nedavna naučna saznanja rezultirala su preporukom da se napusti pojam NOEC i zamijeni se procjenama tačaka EC_x dobijenih regresijom. Za ovo ispitivanje algi nije utvrĐena odgovarajuća vrijednosti za x. Čini se da je raspon od 10 do 20% primjeren (u zavisnosti od izabrane varijable odgovora), a po mogućstvu treba navesti i EC_{10} i EC_{20}.

Stimulacija rasta

Ponekad se pri niskim koncentracijama može primijetiti stimulacija rasta (negativna inhibicija). To može nastati kao rezultat hormeze (—toksična stimulacija‖) ili unošenja faktora stimulacije rasta zajedno sa ispitivanim materijalom u upotrijebljeni minimalni medijumum. Napominje se da unošenje neorganskih nutrijenata ne bi trebalo da ima nikakav direktan efekat jer medijumum za ispitivanje u toku cijelog ispitivanja treba da sadrži višak nutrijenata. Stimulacija u niskim dozama obično se može ignorisati u proračunima za EC_{50}, osim ako je ekstremna. Međutiim, ako ona jeste ekstremna, ili ako treba izračunati vrijednost EC_x za niske vrijednosti x, posebni postupci mogu biti potrebni. Po mogućstvu treba izbjegavati brisanje odgovora na stimulaciju iz analize podataka, a ako rapoloživi softver za prilagoĐavanje krive ne može da prihvati malu stimulaciju, tada se može upotrijebiti linearna interpolacija sa samonadopunjavanjem ('bootstrapping'). Ako je stimulacija ekstremna, može se razmotriti upotreba modela hormeze.

Netoksična inhibicija rasta

Ispitni materijali koji apsorbuju svjetlost mogu dovesti do smanjenja stope rasta, zato što zasjenjivanje smanjuje količinu rapoložive svjetlosti. Takve fizičke vrste efekata treba razdvojiti od toksičnih efekata izmjenom uslova ispitivanja i treba ih posebno navesti u izvještaju o ssprovedenom ispitivanju. Smjernice se mogu naći u literaturi pod (2) i (3).

3. Izvještaj o ssprovedenom ispitivanju

Izvještaj o ssprovedenom ispitivanju mora sadržati sljedeće:

- *Ispitivana hemikalija*:

- fizička priroda i relevantna fizičko-hemijska svojstva, uključujući granicu rastvorljivosti u vodi;
  podaci za identifikaciju hemikalije (npr. CAS broj), uključujući čistoću (nečistoće).

- *Ispitivane vrste*:

  soj, dobavljač ili izvor i primijenjeni uslovi uzgoja.

- *Uslovi ispitivanja*:

  datum početka ispitivanja i njegovo trajanje;
- opis plana ispitivanja: ispitne posude, zapremine kulture, gustina biomase na početku ispitivanja;
  sastav medijumuma;
- ispitne koncentracije i ponavljanja (npr. broj ponavljanja, broj ispitnih koncentracija i primijenjena geometrijska progresija);
- opis pripreme ispitnih rastvora, uključujući upotrebu rassupstancaača itd.
- inkubator za uzgoj;
- intenzitet i kvalitet svjetlosti (izvor, homogenost);
  temperatura;
  ispitane koncentracije: nominalne ispitane koncentracije i svi rezultati analiza za određivanje koncentracija ispitivane hemikalije u ispitnim posudama. Treba navesti efikasnost iskorišćenja metode i granicu kvantifikacije u matrici ispitivanja;
  sva odstepena od ove metode ispitivanja;
  metoda za određivanje biomase i dokaz korelacije između izmjerenog parametra i suve mase;

- *Rezultati*:

  pH vrijednosti na početku i na kraju ispitivanja u svim ispitivanim grupama;
- biomasa za svaki stakleni balon u svakoj mjernoj tački i metoda za mjerenje biomase;
  krive rasta (grafički prikaz biomase u zavisnom odnosu sa vremenom);
- izračunate varijable odgovora za svako ponavljanje u okviru ispitivane grupe, sa srednjim vrijednostima i koeficijentom varijacije za ponavljanja;
  grafički prikaz odnosa koncentracija/efekat;
  procjene toksičnosti za varijable odgovora, npr. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} i pripadajući intervali pouzdanosti. LOEC i NOEC, ako su izračunati, i statističke metode korišćene za njihovo određivanje;
- ako je korišćena ANOVA, veličina efekta koji se može primijetiti (npr. najmanja značajna razlika);
  eventualna stimulacija rasta otkrivena u bilo kojoj ispitivanoj grupi;
  svi drugi primijećeni efekti, npr. morfološke promjene algi;

diskusija rezultata, uključujući svaki eventualni uticaj na ishod ispitivanja koji je posljedica odstepena od ove metode ispitivanja.

Dodatak 1

Definicije

Sljedeće definicije i skraćenice koriste se za potrebe ove metode ispitivanja:

Biomasa je suva masa žive materije prisutne u nekoj populaciji izražena u odnosu na datu zapreminu, npr. mg algi/litru ispitnog rastvora. Obično se —biomasa|| definiše kao masa, ali u ovom ispitivanju ova riječ se koristi da označi masu po zapremini. TakoĐe, u ovom ispitivanju se zamjenski parametri biomase, kao što su broj ćelija, fluorescencija, itd. obično mjere, pa se izraz —biomasa|| tako odnosi i na te zamjenske mjere.
Koeficijent varijacije je bezdimenzionalna mjera varijabilnosti parametra, definisana kao odnos standardne devijacije i srednje vrijednosti. To se takoĐe može izraziti kao procentualna vrijednost. Srednji koeficijent varijacije prosječne specifične stope rasta u ponavljanjima kontrolnih kultura računa se na sljedeći način:

Izračunati % koeficijenta varijacije (KV) prosječne specifične stope rasta na osnovu dnevnih/etapnih stopa rasta za odgovarajuće ponavljanje;

2 Izračunati srednju vrijednost iz svih izračunatih vrijednosti iz tačke 1 da bi se dobio srednji
. koeficijent varijacije dnevne/etapne specifične stope rasta u ponavljanjima kontrolnih kultura.

EC_x je koncentracija ispitivane hemikalije rastvorene u medijumumu za ispitivanje koja dovodi do x-
procentnog (npr. 50%) smanjenja rasta ispitivanog organizma u okviru navedenog perioda izloženosti (koji se izričito navodi ako odstupa od punog ili normalnog trajanja ispitivanja). Da bi se nedvosmisleno označilo da li je vrijednost EC dobijena iz stope rasta ili prirasta, za stopu rasta koristi se simbol —E_rC—, a za prirast koristi se simbol „E_yC—.

Medijumum za rast je kompletni sintetički medijumum za uzgoj u kojem ispitivane alge rastu kada se izlože ispitivanoj hemikaliji. Ispitivana hemikalija obično se rassupstancaa u medijumumu za ispitivanje.

Stopa rasta (prosječna specifična stopa rasta) je logaritamsko povećanje biomase u toku perioda
izloženosti.

Najniža koncentracija sa vidljivim efektom (LOEC) je najniža ispitana koncentracija pri kojoj je uočeno da hemikalija ima statistički značajan efekat smanjenja rasta (pri $p < 0,05$) u poreĐenju sa kontrolnom grupom, u okviru datog vremena izlaganja. Međutiim, sve ispitne koncentracije iznad LOEC moraju imati štetan efekat koji je jednak ili veći od efekta uočenog pri LOEC. Ako se ova dva uslova ne mogu zadovoljiti, mora se dati detaljno objašnjenje o tome na koji način je izabrana LOEC (a prema tome i NOEC).

Najveća koncentracija bez vidljivog efekta (NOEC) je ispitna koncentracija neposredno ispod LOEC.

Varijabla odgovora je varijabla za procjenu toksičnosti izvedena iz bilo kojeg izmjerenog parametra koji opisuje biomasu različitim metodama proračuna. Za ovu metodu ispitivanja, stope rasta i prirast su varijable odgovora izvedene neposrednim mjerenjem biomase ili nekog od pomenutih zamjenskih parametara.

Specifična stopa rasta je varijabla odgovora definisana kao koeficijent razlike prirodnih logaritama posmatranog parametra (u ovoj metodi ispitivanja to je biomasa) i odgovarajućeg vremenskog perioda.

Hemikalija koja se ispituje je supstanca ili smješa koja se ispituje upotrebom ove metode ispitivanja.

Prirast je vrijednost mjerne varijable na kraju perioda izloženosti umanjena za vrijednost mjerne varijable na početku perioda izloženosti, kojom se izražava povećanje biomase u toku ispitivanja.

Dodatak 2

Sojevi koji su se pokazali kao prikladni za ispitivanje

Zelene alge

Pseudokirchneriella subcapitata (ranije poznata kao *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

Desmodesmus subspicatus (ranije poznata kao *Scenedesmus subspicatus*), 86.81 SAG

Silikatne alge (dijatomeje)

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Cijanobakterije

Anabaena flos-aquae, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Izvori sojeva

Preporučeni sojevi dostupni su u kulturama jedne vrste algi iz sljedećih zbirki (abecednim redom):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209 SAD

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology,
Windermere Laboratory

Far Sawrey, Ambleside
Cumbria LA22 0LP UK

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Göttingen
Nikolausberger Weg 18
37073 Göttingen
NJEMAČKA

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences the University of Texas at Austin Austin, Texas 78712 SAD.

Izgled i karakteristike preporučenih vrsta

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Izgled	Zakrivljene, uvijene pojedinačne ćelije	Ovalne, uglavnom pojedinačne ćelije	Štapićaste	Lanci ovalnih ćelija	Štapićaste
Veličina (D × Š) µm	8 – 14 × 2 – 3	7 – 15 × 3 – 12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Ćelijska zapremina (µm /ćelija)[32] 3	40 – 60	60 – 80	40 – 50	30 – 40	2,5
Suva masa ćelija (mg/ćelija)	$2 – 3 \times 10^{-8}$	$3 – 4 \times 10^{-8}$	$3 – 4 \times 10^{-8}$	$1 – 2 \times 10^{-8}$	$2 – 3 \times 10^{-9}$
Stopa rasta (dan^{-1})	1,5 – 1,7	1,2 – 1,5	1,4	1,1 – 1,4	2,0 × 2,4

Posebne preporuke za uzgoj i postepene sa preporučenim vrstama za ispitivanje

Pseudokirchneriella subcapitata i Desmodesmus subspicatus
Ove zelene alge obično su lake za održavanje u raznim medijumumima za uzgoj. Informacije o pogodnom medijumumu mogu se dobiti iz zbirki kultura. Obično se radi o pojedinačnim ćelijama, a mjerenja gustune ćelija mogu se lako izvršiti uz pomoć elektronskog brojača čestica ili mikroskopa.

Anabaena flos-aquae

[32] Mjereno elektronskim brojačem čestica

Za držanje početne kulture mogu se koristiti različiti medijumumi za rast. Naročito je važno da se ne dopusti da šaržna kultura kod obnavljanja prođe dalje od logaritamske faze rasta, jer je tada oporavljanje teško.

Anabaena flos-aquae pravi naslage povezanih lanaca ćelija. Veličina tih naslaga može varirati u zavisnosti od uslova uzgajanja. Ponekad je potrebno razbiti te naslage ako se za određivanje biomase koristi brojanje pod mikroskopom ili elektronski brojač čestica.

Za razbijanje lanaca radi smanjenja varijabilnosti rezultata brojenja može se koristiti ultrazvučna obrada poduzoraka. Ukoliko ultrazvučna obrada radi razbijanja lanaca na kraće djelove traje duže nego što je potrebno, to može uništiti ćelije. Intenzitet i trajanje ultrazvučne obrade moraju biti isti za svaku ispitivanu grupu.

Potrebno je izbrojati dovoljno polja na hemocitometru (najmanje 400 ćelija) da bi se lakše kompenzovala varijabilnost. To će povećati pouzdanost mikroskopskih određivanja gustine.

Elektronski brojač čestica može se koristiti za određivanje ukupne ćelijske zapremine *Anabaena* nakon što se pažljivom ultrazvučnom obradom razbiju lanci ćelija. Energija ultrazvučne obrade mora se podesiti tako da se izbjegne oštećenje ćelija.

Da bi se obezbijedilo da suspenzija algi za inokulaciju ispitnih posuda bude dobro izmiješana i homogena, treba koristiti vrtložnu (—vortex||) mješalicu ili sličnu odgovarajuću metodu.

Ispitne posude treba staviti na orbitalnu ili platformnu treskalicu na oko 150 obrtaja u minuti. Drugi način da se smanji tendencija *Anabaena* da ssupstancaa grudvice je da se vrši periodično mućkanje. Ako dođe do pojave grudvica, potrebno je pobrinuti se da se dobiju reprezentativni uzorci za mjerenja biomase. Ponekad je prije uzimanja uzoraka neophodno snažno mućkanje da bi se razbile grudvice algi.

Synechococcus leopoliensis
Za držanje početne kulture mogu se koristiti razni medijumumi za rast. Informacije o odgovarajućim medijima mogu se naći u zbirkama kultura.

Synechococcus leopoliensis raste u obliku pojedinačnih štapićastih ćelija. Ćelije su veoma male, što komplikuje upotrebu brojanja pod mikroskopom radi mjerenja biomase. Tu su korisni elektronski brojači čestica opremljeni za brojanje čestica veličine od najmanje oko 1µm. TakoĐe se mogu primijeniti fluorometrijska mjerenja *in vitro*.

Navicula pelliculosa
Za držanje početne kulture mogu se koristiti razni medijumumi za rast. Informacije o odgovarajućim medijima mogu se naći u zbirkama kultura. Treba napomenuti da medijumum mora sadržati silikat. *Navicula pelliculosa* može pod određenim uslovima rasta ssupstancaati naslage. Zbog proizvodnje lipida, ćelije algi ponekad imaju tendenciju skupljanja u površinskom tankom sloju. Pod tim okolnostima, prilikom uzimanja poduzoraka radi određivanja biomase moraju se preduzeti posebne mjere, kako bi se dobili reprezentativni uzorci. Ponekad je potrebno snažno mućkanje, npr.
upotrebom vrtložne (|| vortex||) mješalice.

Dodatak 3

Medijumumi za rast

Može se upotrijebiti jedan od sljedeća dva medijumuma za rast:

— Medijumum OECD-a: Originalni medijumum OECD-a TG 201, takođe usklađen sa standardom ISO 8692

— US. EPA medijumum AAP, takođe usklađen sa standardom ASTM.

Prilikom pripremanja ovih medijumuma treba koristiti reagens ili hemikalije analitičke čistoće kao i dejonizovanu vodu.

Sastav medijumuma AAP (US. EPA) i medijumuma OECD TG 201.

Sastojak	AAP		OECD	
	mg/l	mM	mg/l	mM
NaHCO3	15,0	0,179	50,0	0,595
N NO3	25,5	0,300		
NH4Cl			15,0	0,280
MgCl2·6(H2O)	12,16	0,0598	12,0	0,0590
CaCl2·2(H2O)	4,41	0,0300	18,0	0,122
MgSO4·7(H2O)	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K2HPO4	1,044	0,00599		
KH2PO4			1,60	0,00919
FeCl3·6(H2O)	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
Na2EDTA·2(H2O)	0,300	0,000806	0,100	0,000269*
H3BO3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
MnCl2·4(H2O)	0,415	0,00201	0,415	0,00210
ZnCl2	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
CoCl2·6(H2O)	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
Na2MoO4·2(H2O)	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
CuCl2·2(H2O)	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

Molarni odnos EDTA i gvožđa nešto je veći od jedan. To sprečava taloženje gvožđa i istovremeno svodi helaciju jona teških metala na najmanju moguću mjeru.

U ispitivanju sa silikatnom algom *Navicula pelliculosa* u oba ova medijumuma mora se dodati Na2SiO3 ·9H20 da bi se dobila koncentracija od 1,4 mg Si/l. pH vrijednost

medijumuma dobija se kada se uspostavi ravnoteža između karbonatnog sistema medijumuma i parcijalnog pritiska CO_2 u atmosferskom vazduhu. Približan odnos između pH na 25°C i molarne koncentracije bikarbonata je:

$pH_{eq} = 11,30 + \log[HCO_3]$

Sa 15 mg NaHCO3/l, pH_{eq} = 7,5 (U.S. EPA medijumum), a sa 50 mg NaHCO3/l, pH_{eq} = 8,1 (OECD medijumum).

Elementarni sastav ispitivanih medijumuma

Element	AP	OECD
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Pripremanje medijumuma OECD

Nutrijent	Koncentracija u osnovnom rastvoru
Osnovni rastvor 1: makronutrijenti	
NH4Cl	1,5 g/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Osnovni rastvor 2: gvožĐe	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l
Osnovni rastvor 3: elementi u tragovima	

H_3BO_3	185 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/l
$ZnCl_2$	3 mg/l
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/l
Osnovni rastvor 4: bikarbonat $NaHCO_3$ $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	 50 g/l

Osnovne rastvore treba sterilisati membranskom filtracijom (srednji prečnik pora 0,2 μm) ili obradom u autoklavu (120 °C, 15 min). Rastvore čuvati na tamnom mjestu na temperaturi od 4 °C.

Rastvori 2 i 4 ne sterilišu se u autoklavu već membranskom filtracijom.

Potrebno je pripremiti medijumum za rast dodavanjem odgovarajuće zapremine osnovnih rastvora 1-4 u vodu:

U 500 ml sterilne vode dodati:

10 ml osnovnog rastvora 1

1 ml osnovnog rastvora 2

1 ml osnovnog rastvora 3

1 ml osnovnog rastvora 4

Dospe se sterilne vode toliko da ukupno bude 1 000 ml.

Treba ostaviti dovoljno vremena da se medijumum izjednači sa atmosferskim CO_2, po potrebi uvođenjem mjehurića sterilnog, filtriranog vazduha u trajanju od nekoliko sati.

Pripremanje medijumuma U.S. EPA

Dodati po 1 ml osnovnih rastvora 2.1–2.7 u približno 900 ml dejonizovane ili destilovane vode a onda razblažiti tako da se dobije 1 litar.

Osnovni rastvori sa makronutrijentima pripremaju se rastvaranjem sljedeće količine navedenih supstanci u 500 ml dejonizovane ili destilovane vode. Reagensi 2.1, 2.2, 2.3 i 2.4 mogu se kombinovati u jednom osnovnom rastvoru.

2.1	$NaNO_3$	12,750 g.
2.2	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	6,082 g.
2.3	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2,205 g.
2.4	Osnovni rastvor sa makronutrijentima (v. 3).	
2.5	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,350 g.

2.6	K_2HPO_4	0,522 g.
2.7	$NaHCO_3$	7,500 g.
2.8	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	V. napomenu 1.

Napomena 1: Koristiti samo za ispitivanja silikatnih algi. Može se dodati direktno (202,4 mg) ili putem osnovnog rastvora tako da se dobije konačna koncentracija u medijumumu od 20 mg/l Si.

Osnovni rastvor sa mikronutrijentima priprema se rastvaranjem sljedeće količine navedenih supstanci u 500 ml dejonizovane ili destilovane vode:

3.1 H_3BO_3	92,760 mg.
3.2 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$	207,690 mg.
3.3 $ZnCl_2$	1,635 mg.
3.4 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	79,880 mg.
3.5 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,714 mg.
3.6 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	3,630 mg.
3.7 $CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,006 mg.
3.8 $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	150,000 mg. [Dinatrijum (Etilenedinitrilo) tetraacetat].
3.9 $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$	0,005 mg V. napomenu 2.

Napomena 2: Koristiti samo u medijumumu za početne kulture vrsta silikatnih algi.

Korigovati pH na 7,5 ± 0,1 sa 0,1 N ili 1,0 N NaOH ili HCl.

Profiltrirati medijumume u sterilnu posudu kroz membranski filter od 0,22 µm ako će se koristiti
brojač čestica ili kroz filter od 0,45 µm ako se neće koristiti brojač čestica.

Medijumum do upotrebe čuvati na tamnom mjestu na temperaturi od oko 4 °C.

Dodatak 4 **Primjer postupka za uzgoj algi**

Opšta zapažanja

Svrha uzgoja na osnovu sljedećeg postupka je dobijanje kultura algi za ispitivanje toksičnosti. Potrebno je koristiti odgovarajuće metode kako bi se obezbijedilo da se kulture algi ne inficiraju bakterijama. Aksenične kulture mogu biti poželjne, ali se moraju uspostaviti i koristiti kulture koje sadrže samo jednu vrstu algi.

Sve radnje moraju se izvoditi u sterilnim uslovima da bi se izbjegla kontaminacija bakterijama i drugim algama.

Oprema i materijali

V. pod Metoda ispitivanja: Aparatura.

Postupci za dobijanje kultura algi

Pripremanje hranljivih rastvora (medijumuma):

Sve hranljive soli medijumuma pripremaju se kao koncentrisani osnovni rastvori i čuvaju se na tamnom i hladnom mjestu. Ti rastvori se sterilišu filtracijom ili obradom u autoklavu.

Medijumum se priprema dodavanjem ispravne količine osnovnog rastvora u sterilnu destilovanu vodu, pazeći da ne dođe do infekcije. Kod čvrstog medijumuma dodaje se 0,8% agara.

Početna kultura:

Početne kulture su male kulture algi koje se redovno prenose u svjež medijumum da bi poslužile kao početni material za ispitivanje. Ako se kulture ne koriste redovno, tada se nanose na agar u iskošenim epruvetama. Kulture se prenose u svježi medijumum najmanje jedanput u svaka dva mjeseca.

Početne kulture uzgajaju se u konusnim staklenim balonima u kojima se nalazi odgovarajući medijumum (zapremine oko 100 ml). Ako se alge inkubiraju na 20 °C uz neprekidno osvjetljenje, tada je potrebno prenositi ih jedanput sedmično.

Tokom prenosa, određena količina „stare|| kulture prenosi se sterilnim pipetama u stakleni balon sa svježim medijumumom, tako da je kod brzorastućih vrsta početna koncentracija oko 100 puta manja nego u staroj kulturi.

Brzina rasta neke vrste može se odrediti na osnovu krive rasta. Ako je to poznato, moguće je procijeniti gustinu pri kojoj kulturu treba prenijeti u novi medijumum. To se mora uraditi prije nego što kultura dostigne fazu odumiranja.

Pretkultura:

Pretkultura je namijenjena dobijanju određene količine algi pogodne za inokulaciju kultura koje se ispituju. Pretkultura se inkubira u uslovima ispitivanja i upotrebljava dok još raste eksponencijalno, obično nakon perioda inkubacije od 2 do 4 dana. Ako kulture algi sadrže deformisane ili abnormalne ćelije, te kulture se moraju odbaciti.

Dodatak 5 **Analiza podataka nelinearnom regresijom**

Opšta razmatranja

U ispitivanjima algi i drugim ispitivanjima mikrobnog rasta – rasta biomase – odgovor je po svojoj prirodi kontinualna ili metrička varijabla – brzina procesa, ako se upotrebljava stopa rasta, i njen vremenski integral ako je izabrana biomasa. Oboje se stavlja u odnos prema odgovarajućem srednjem odgovoru ponavljanja neizloženih kontrolnih grupa koje najjače reaguju na nametnute uslove – pri čemu su svjetlost i temperatura primarni određujući faktori u ispitivanju algi. Sistem je podijeljen ili je homogen, a biomasa se može posmatrati kao continuum, bez uzimanja u obzir pojedinačnih ćelija. Raspodjela varijanse za vrste odgovora u takvim sistemima u vezi je isključivo sa eksperimentalnim faktorima (koji se obično opisuju lognormalnim ili normalnim raspodjelama greške). To je suprotno tipičnim odgovorima u biološkim eksperimentima sa kvantalnim podacima gdje se tolerancija (po pravilu sa binomnom raspodjelom) pojedinačnih organizama često smatra dominantnom komponentom varijanse. Ovdje su odgovori kontrolne grupe na nultom ili prirodnom nivou.

U nekomplikovanoj situaciji, normalizovani ili relativni odgovor, r, jednolično opada od 1 (nulta inhibicija) do 0 (100-procentna inhibicija). Treba napomenuti da svi odgovori imaju

grešku s kojom su povezani i da se očite negativne inhibicije mogu izračunati samo kao rezultat nasumične greške.

Regresiona analiza

Modeli

Cilj regresione analize je da se kvantitativno opiše kriva odgovor-koncentracija u obliku matematičke regresione funkcije Y = f (C) ili češće F(Z), gdje je Z = log C. U inverznom obliku C = f– 1 (Y) moguće je izračunati vrijednosti EC_x, uključujući EC_{50}, EC_{10} i EC_{20}, kao i njihove granice pouzdaosti od 95 %. Pokazalo se da nekoliko jednostavnih matematičkih funkcija uspješno opisuju odnose koncentracija-odgovor dobijene u ispitivanjima inhibicije rasta algi. U te funkcije spadaju npr. logistička jednačina, nesimetrična Vejbulova jednačina i funkcija lognormalne raspodjele, koje sve daju sigmoidne krive koje se asimptotski približavaju nuli za C → 0 i jedinici za C → beskonačno.

Upotreba modela kontinualne funkcije s pragom (npr. Koimanov (Kooijman) model —za inhibiciju rasta populacije‖ , Kooijman et al. 1996) predstavlja nedavno predloženu alternativu asimptotičkim modelima. Ovaj model polazi od pretpostavke nepostojanja efekata na koncentracijama ispod određenog praga EC_0+ , koji se procjenjuje ekstrapolacijom odnosa odgovor-koncentracija sa presjekom na osi koncentracije uz pomoć jednostavne kontinualne funkcije koja nije diferencijabilna u početnoj tački.

Treba napomenuti da analiza može biti u obliku jednostavne minimizacija zbirova rezidualnih kvadrata (pod pretpostavkom konstantne varijanse) ili u obliku ponderisanih kvadrata ako je heterogenost varijanse kompenzuje.

Postupak

Postupak se može ukratko opisati na sljedeći način: Odabrati odgovarajuću funkcijsku jednačinu, Y = f(C), i prilagoditi je podacima nelinearnom regresijom. Po mogućstvu treba koristiti mjerenja pojedinačnih staklenih balona umjesto srednje vrijednosti ponavljanja, da bi se iz podataka izvuklo što više informacija. S druge strane, ako je varijansa visoka, iz praktičnog iskustva proizilazi da srednje vrijednosti ponavljanja mogu dati kvalitetniju matematičku procjenu sa manje uticaja sistemskih grešaka u podacima u odnosu na pojedinačne zadržane tačke podataka. Grafički prikazati prilagođenu krivu i izmjerene podatke i preispitati da li je kriva dobro prilagođena. Analiza reziduala može biti naročito koristan alat za tu svrhu. Ako izabrani funkcijski odnos za prilagođavanje krive koncentracija-odnos ne opisuje dobro cijelu krivu ili neki njen suštinski dio, kao što je odgovor pri niskim koncentracijama, potrebno je izabrati drugu opciju za prilagođavanje krive – npr. nesimetričnu krivu kao što je Vejbulova funkcija umjesto simetrične. Negativne inhibicije mogu predstavljati problem, npr. kod funkcije lognormalne raspodjele, koje u tom slučaju isto tako iziskuju upotrebu neke alternativne regresione funkcije. Ne preporučuje se da se tim negativnim vrijednostima dodijeli nulta ili mala pozitivna vrijednost, jer to iskrivljuje distribuciju grešaka. Može biti primjereno da se na određenim djelovima krive izvrši posebno prilagođavanje, kao što je dio koji prikazuje nisku inhibiciju, da bi se napravila procjena vrijednosti EC_{lowx}. Iz prilagođene jednačine („inverznom procjenom—, C=f-1(Y)) izračunati karakteristične procjene tačaka EC_x i navesti barem EC_{50} i jednu ili dvije procjene $EC_{low\ x}$. Praktično iskustvo iz ispitivanja pokazalo je da preciznost ispitivanja algi obično omogućava prilično tačnu procjenu na nivou inhibicije od 10% , pod uslovom da ima dovoljno tačaka podataka – izuzev ako se pri niskim koncentracijama javlja stimulacija kao zbunjujući faktor. Preciznost procjene EC_{20} često je znatno bolja od preciznosti procjene EC_{10}, jer je EC_{20}

obično smješten na približno linearnom dijelu središnje krive koncentracija-odgovor. Ponekad je teško tumačiti EC_{10} zbog stimulacije rasta. Stoga, iako se EC_{10} obično može dobiti s dovoljnom preciznošću, preporučuje se da se uvijek navede i EC_{20}.

Ponderi

Eksperimentalna varijansa obično nije konstantna i najčešće uključuje proporcionalnu komponentu, pa je stoga dobro rutinski izvršiti ponderisanu regresiju. Obično se uzima da su ponderi za takvu analizu obrnuto proporcionalni varijansi:

$W_i = 1/Var(r_i)$

Mnogi regresioni program omogućavaju opciju ponderisane regresione analize uz pomoć pondera navedenih u tabeli. Radi jednostavnosti, ponderi se normiraju množenjem sa $n/\Sigma w_i$ (n je broj tačaka podataka) tako da njihov zbor bude 1.

Normiranje odgovora

Normiranjem srednjeg odgovora kontrolne grupe javljaju se neki načelni problem i dobija se prilično komplikovana struktura varijanse. Dijeljenjem odgovora srednjim odgovorom kontrolne grupe da bi se dobio postotak inhibicije uvodi se dodatna greška prouzrokovana greškom u srednjoj vrijednosti odgovora kontrolne grupe. Izuzev ako je ta greška zanemarljivo mala, ponderi regresije i granice pouzdanosti moraju se korigovati za kovarijansu sa kontrolnom grupom (Drejper i Smit (Draper and Smith), 1981). Treba napomenuti da je postizanje visoke preciznosti procjene srednje vrijednosti odgovora kontrolne grupe važno da bi se sveukupna varijansa relativnog odgovora svela na najmanju moguću mjeru. Ta varijansa se definiše na sljedeći način:

(Indeks i odnosi se na nivo koncentracije i, dok se indeks 0 odnosi na kontrolnu grupu) $Y_i =$

Relativni odgovor = $r_i/r_0 = 1 – I = f(C_i)$ sa varijansom $Var(Y_i) = Var\ (r_i/r_0) \cong (\partial\ Y_i/\partial\ r_i)^2 \cdot Var(r_i) +$

$((\partial\ Y_i/\partial\ r_0)^2 \cdot Var(r_0)$ a obzirom da je $(\partial\ Y_i/\partial\ r_i) = 1/r_0$ i $(\partial\ Y_i/\partial\ r_0) = r_i/r_0^2$ uz normalnu distribuciju

podataka i ponavljanja m_i i m_0: $Var(r_i) = \sigma^2/m_i$ ukupna varijansa relativnog odgovora Y_i tako

postaje

$Var(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0$

Greška u srednjoj vrijednosti kontrolne grupe obrnuto je proporcionalna kvadratnom korjenu prosječnog broja ponavljanja u kontrolnoj grupi, pa je stoga ponekad opravdano uvrstiti podatke iz ranijih istraživanja i tako znatno smanjiti grešku. Alternativni postupak je da se umjesto normiranja podataka i prilagoĐavanja apsolutnih odgovora, uključujući podatke o odgovoru kontrolne grupe, uvede vrijednost odgovora kontrolne grupe kao dodatni parameter koji se prilagoĐava nelinearnom regresijom. Uz uobičajenu regresionu jednačinu sa 2 parametra, ova metoda iziskuje prilagoĐavanje 3 parametra, pa stoga zahtijeva više tačaka podataka nego kod nelinearne regresije podataka koji su normirani upotrebom unaprijed definisanog odgovora kontrolne grupe.

Obrnuti intervali pouzdanosti

Iizračunavanje intervala pouzdanosti nelinearne regresije inverznom procjenom prilično je složeno i ne predstavlja dostupnu standardnu opciju u običnim statističkim kompjuterskim programskim paketima. Približne granice pouzdanosti mogu se dobiti uz pomoć standardnih programa nelinearne regresije sa reparametarizacijom. (Brus i Versit (Bruce and Versteeg), 1992), što uključuje preradu matematičke jednačine na način da se umjesto parametara koji se procjenjuju koriste željene procjene tačaka, npr. EC_{10} i EC_{50}. (Neka funkcija glasi I = f (α, β, koncentracija), a upotrebom definicijskih odnosa f (α, β, EC_{10}) = 0,1 i f (α, β, EC_{50}) = 0,5 zamijeni se f (α, β, koncentracija) ekvivalentnom funkcijom g(EC_{10}, EC_{50}, koncentracija).

Neposrednije iizračunavanje (Andersen et al, 1998) vrši se tako što se zadrži originalna jednačina i upotrijebi Tejlorova (Taylor) ekspanzija oko srednjih vrijednosti r_i i r_0.

U posljednje vrijeme postale su popularne metode samonadopunjavanja (—boot strap||). Te metode koriste izmjerene podatke i često ponovljeno uzorkovanje upotrebom generatora nasumičnih podataka za procjenu empirijske distribucije varijanse.

C.4. ODREĐIVANJE BRZE BIORAZGRADLJIVOSTI

Dio I

1. Opšta razmatranja

1.1. Uvod

Za trijažu hemikalija prema brzoj biorazgradljivosti u aerobnom vodenom medijumumu koriste se sljedeće metode ispitivanja:

1. Nestajanje DOC (Metoda C.4-A);
2. Modifikovana OECD trijaža - Nestajanje DOC (Metoda C.4-B);
3. Razvijanje metode C.4-B (Modifikovani Sturm test) (Metoda C.4-C);
4. Manometrijska respirometrija (Metoda C.4-D); 5. Ispitivanje u zatvorenoj boci (Metoda C.4-E);
6. MITI ispitivanje (Metoda C.4-F).

Razmatranja metoda data su u Dijelu I. U Dijelu II do VII dati su detalji za pojedine metode. Prilozi sadrže definicije, formule i uputstva. U zavisnosti od fizičkih svojstava ispitivane hemikalije, prioritet ima jedna ili druga metoda.

1.2. Definicije

Rastvoreni kiseonik (Dissolved Oxygen, u daljem tekstu: DO) je koncentracija kiseonika rastvorenog u uzorku vode, izražava se u mg/l.

Biohemijska potrošnja kiseonika (u daljem tekstu: BPK) je količina kiseonika koju utroše mikroorganizmi pri razgradnji ispitivanog jedinjenja, izražava se u gramima, BPK se takođe izražava kao gram potrošenog kiseonika po gramu ispitivanog jedinjenja (Metoda C.5. koja je data u ovom prilogu).

Hemijska potrošnja kiseonika (u daljem tekstu: HPK) je količina kiseonika potrošenog u toku oksidacije ispitivanog jedinjenja sa vrućim, kiselim bihromatom; daje mjeru količine prisutne supstance koja oksidiše, izražava se u gramima, i kao gram kiseonika potrošenog po gramu ispitivanog jedinjenja.

Rastvoreni organski ugljenik (Dissolved Organic Carbon, u daljem tekstu: DOC) je organski ugljenik prisutan u rastvoru ili onaj koji prolazi kroz 0,45 µ filter ili ostaje u supernatantu nakon centrifugiranja na 40.000 m/s^2 (± 4000 g) u toku 15 minuta.

Teoretska potrošnja kiseonika (Theoretical Oxygen Demand, u daljem tekstu: ThOD) je ukupna količina kiseonika (u mg) potrebna da se hemikalija potpuno oksidiše, iizračunava se iz molekulske formule (dio 2.2) i takođe se izražava u mg potrebnog kiseonika po mg ispitivanog jedinjenja.

Teoretski ugljen-dioksid (Theoretical Carbon Dioxide, u daljem tekstu: ThC.4-B) jes izračunata količina CO_2 (u mg), koja nastaje iz poznatog ili izmjerenog sadržaja ugljenika u ispitivanom jedinjenju, kada se ono u potpunosi mineralizuje; takođe se izražava u mg ugljen-dioksida po mg ispitivanog jedinjenja.

Ukupni organski ugljenik (TotalOrganic Carbon, u daljem tekstu: TOC) uzorka je suma organskog ugljenika u rastvoru i onog u suspenziji.

IC (Inorganic Carbon) je neorganski ugljenik.

Ukupni ugljenik (Total Carbon, u daljem tekstu: TC) je suma organskog i neorganskog ugljenika prisutnog u uzorku.

MITI (Ministry Of International Trade And Industry, Japan) je Ministarstvo međunarodne trgovine i industrije Japana.

Primarna biorazgradnja je promjena u hemijskoj strukturi supstance izazvana biološkim djelovanjem, koja dovodi do gubitka specifičnog svojstva te supstance.

Potpuna biorazgradnja (aerobna) je nivo razgradnje koji se postiže kada ispitivano jedinjenje u potpunosti iskoriste mikroorganizmi, pri čemu nastaju ugljen-dioksid, voda, mineralne soli i nove ćelijske strukture (biomase).

Brzo biorazgradljiva supstanca je arbitrarna klasifikacija hemikalija koje su prošle određene specifične skrining testove za potpunu biorazgradljivost, ovi testovi su toliko striktni da se smatra da se takva jedinjenja brzo i potpuno biorazgrađuju u vodenoj životnoj sredini pri aerobnim uslovima.

Inherentno biorazgradljiva supstanca je klasifikacija hemikalija za koje, na osnovu ispitivanja biorazgradljivosti, postoji nedvosmislen dokaz da podliježu biorazgradnji (primarnoj ili potpunoj).

Uklonjivost je podložnost jedinjenja uklanjanju putem biološkog prečišćavanja otpadnih voda, bez negativnog uticaja na uobičajeni proces obrade otpadnih voda, brzo biorazgradljiva jedinjenja se uklanjaju, ali ne i sva inherentno biorazgradljiva jedinjenja. Procesu uklanjanja doprinose i abiotički procesi.

Vrijeme kašnjenja je vrijeme od inokulacije, u ispitivanju nestanka, pa do momenta kada razgradnja dostigne nivo od najmanje 10%. Vrijeme kašnjenja često varira i teško se reprodukuje.

Vrijeme razgradnje nastupa nakon vremena kašnjenja i traje do momenta kada se dostigne 90% od maksimalnog nivoa razgradnje.

Desetodnevni period je period od 10 dana koji nastupa odmah pošto se dostigne nivo razgradnje od 10%.

1.3. Izbor odgovarajuće metode

Za izbor odgovarajuće metode, neophodni su podaci o rastvorljivosti, naponu pare i adsorpcionim svojstvima hemikalije. Upoznati hemijsku strukturu ili formulu da bi se izračunale teoretske vrijednosti, odnosno provjeriti izmjerene vrijednosti parametara, npr. ThOD, ThC.4-B, DOC, TOC i HPK (Dio II ove metode).

Hemikalije čija rastvorljivost nije niža od 100 mg/l se ispituju svim metodama ako nisu isparljive i ako se ne adsorbuju. Za one hemikalije koje su slabo rastvorljive u vodi, isparljive ili se adsorbuju, pogodne metode su naznačene u Tabeli 1. Načini postepena sa hemikalijama koje su slabo rastvorljive u vodi i koje su isparljive opisani su u Dijelu III ove metode. Srednje isparljive hemikalije se ispituju pomoću metode Nestajanje DOC (Metoda C.4-A), ako u ispitivanim posudama (koje su adekvatno zapušene) ima dovoljno prostora za gas. U ovom slučaju, postavlja se abiotička kontrola kako bi se uzeo u obzir i bilo kakav fizički gubitak.

Tabela 1: Primjenljivost metoda ispitivanja

Metoda ispitivanja	Analitička metoda	Prikladnost za supstance:		
		koje su slabo rastvorljive	koje su isparljive	koje se adsorbuju
Nestajanje DOC (Metoda C.4-A)	Rastvoreni organski ugljenik	-	-	+/-
Modifikovana OECD trijaža - Nestajanje DOC (Metoda C.4-B)	Rastvoreni organski ugljenik	-	-	+/-
Razvijanje C.4-B (Metoda C.4-C)	Respirometrija: razvijanje C.4-B	+	-	+
Manometrijska respirometrija (Metoda C.4-D)	Man. respirometrija: potrošnja kiseonika	+	+/-	+
Ispitivanje uzatvorenoj boc (Metoda C.4-E)	Respirometrija: rastvoreni kiseonik	+/-	+	+
MITI ispitivanje (Metoda C.4-F)	Respirometrija: potrošnja kiseonika	+	+/-	+

Za tumačenje dobijenih rezultata neophodni su podaci o stepenu čistoće ili relativnom uDijelu glavnih sastojaka ispitivanog materijala, posebno kad su vrijednosti rezultata niske ili granične.

Podaci o toksičnom dejstvu ispitivane hemikalije na bakterije (Dio IV ove metode) su korisni pri izboru prikladnih koncentracija za ispitivanje. Navedeni podaci su od suštinske važnosti za ispravno tumačenje niskih vrijednosti biorazgradnje.

1.4. Referente supstance

Za provjeru postupka ispituju se referentne hemikalije koje ispunjavaju kriterijume brze biorazgradljivosti i to tako što se uporedo sa ispitivanim postave i posude sa referentnom supstancom.
Podesne hemikalije su anilin (svježe destilovan), natrijum acetat i natrijum benzoat. Referentne hemikalije razgrađuju se primjenom ovih metoda čak i kad namjerno nije dodat nikakav inokulum. Tražiti referentnu hemikaliju koja je brzo biorazgradljiva, ali zahtijeva dodavanje inokuluma, to je kalijum hidrogen-ftalat.
U respirometrijskim ispitivanjima, jedinjenja koji sadrže azot utiču na potrošnju kiseonika usled nitrifikacije (Dio II I V ove metode).

1.5. Princip metode

Rastvor ili suspenzija ispitivane supstance u mineralnoj podlozi inokuliše se i inkubira u aerobnim uslovima u mraku ili pod difuznim osvetljenjem. Količina DOC u ispitivanom rastvoru koja je porijeklom iz inokuluma je što niža u poređenju sa količinom DOC iz ispitivane supstance. Računa se i na endogenu aktivnost inokuluma. Uporedo se postavlja slijepa proba sa inokulumom, ali bez ispitivane supstance, iako se endogena aktivnost ćelija u prisustvu supstance ne poklapa sa onom u endogenoj kontroli. Uporedo se ispituje i referentna supstanca, kako bi se provjerilo izvođenje samog postupka.

Nakon razgradnje slijedi određivanje parametara poput DOC, produkcija C.4-B i potrošnja kiseonika, a mjerenja se sprovode u dovoljno čestim vremenskim intervalima kako bi se omogućilo utvrđivanje početka i kraja biorazgradnje. Mjerenje se sprovodi kontinuirano automatskim respirometrima. DOC se mjeri uporedo sa nekim drugim parametrom, i to na početku ili na kraju ispitivanja. Procjena primarne razgradnje ispitivane supstance, kao i utvrđivanje koncentracija međuproizvoda koji nastaju, utvrđuje se pomoću specifične hemijske analize (obavezno u MITI ispitivanju).

Ispitivanje obično traje 28 dana. Ispitivanje se završava i prije isteka 28 dana, odnosno čim kriva biorazgradnje dostigne plato u najmanje tri određivanja. Ispitivanje se produžava nakon 28 dana kada se po krivoj vidi da je biorazgradnja započeta, ali plato nije dostignut 28. dana.

1.6. Kriterijumi kvaliteta

1.6.1. Ponovljivost

Zbog prirode biorazgradnje i miješanih populacija bakterija koje se koriste kao inokulumi, ispitivanje se sprovodi najmanje u duplikatu.

Što je veća početna koncentracija mikroorganizama koja se prvobitno dodaje u ispitivanu podlogu, to je manje odstepene između replika.

1.6.2. Prihvatljivost ispitivanja

Ispitivanje je validno ukoliko na kraju ispitivanja ili na kraju 10-dnevnog perioda, zavisno od slučaja, razlika između krajnjih vrijednosti, dobijenih pri dostizanju platoa razgradnje ispitivane supstance u ponovljenim ispitivanjima, iznosi manje od 20% i ako je procenat razgradnje referentne supstance dostigao nivo za brzu biorazgradljivosti od 14 dana.

Ako ni jedan od ovih uslova nije ispunjen, ispitivanje se ponavlja. Usled isključivosti metode, niske vrijednosti ne znače da ispitivana supstanca nije biorazgradljiva u uslovima životne sredine, ali ukazuju da je potrebno još rada da se ustanovi biorazgradljivost.

Ako se u ispitivanju toksičnosti, koje uključuje i ispitivanu supstancu i referentnu hemikaliju, desi manje od 35% razgradnje (na osnovu DOC) ili manje od 25% (na osnovu ThOD ili ThC.4-B) u roku od 14 dana, ispitivana hemikalija je inhibitorna (Dio IV ove metode). Serije ispitivanja se ponavljaju, po mogućnosti korišćenjem niže koncentracije ispitivane hemikalije, odnosno više koncentracije inokuluma, ali ne više od 30 mg/l čvrste faze.

1.7. Opšte procedure i preparati

Opšti uslovi koji se primjenjuju u ispitivanjima navedeni su u Tabeli 2. Oprema i drugi uslovi ispitivanja specifični za svaku pojedinu metodu ispitivanja navedeni su u kod opisa konkretne metode.

Tabela 2: Uslovi u toku ispitivanja

Test	Nestajanje DOC	Razvijanje C.4-B	Manometrijska respirometrija	Modif. OEC skrining test	Ispitivanje zatvorenoj boci	MITI Ispitivanje (I)
Koncentracija ispitivane supstance						
kao mg/l			100		2-10	100
mg DOC/l	10-40	10-20		10-40		
mg ThOD/l			50-100		5-10	
Koncentracija inokuluma (u ćelijama/l približno)	≤ 30 mg/l SS ml efluenta/l ili ≤ 100 (10^7-10^8)			0,5 ml sekun efluenta/l (10^5)	≤ 5 ml efluenta/l (10^4-10^6)	30 mg/l SS (10^7-10^8)
Koncentracija elemenata u mineralnoj podlozi (mg/l)						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05-0,1				0,05-0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					najbolje 7,0
Temperatura	22 °C ± 2 °C					25 °C ± 1°C
SS - suspendovane čvrste materije						

1.7.1. Voda za razblaživanje

Koristi se dejonizovana ili destilovana voda, koja ne sadrži toksične supstance (npr. jone Cu^{2+}) u inhibitornim koncentracijama. Voda ne sadrži više od 10% organskog ugljenika koji je unjet sa ispitivanim materijalom. Visoka čistoća vode za razblaživanje neophodna je da se eliminišu visoke vrijednosti u slijepim probama. Kontaminacija nastaje zbog prirodno prisutnih nečistoća, kao i zbog smola jonskih izmjenjivača i proizvoda razgradnje porijeklom od bakterija i algi. U svakoj ispitivanoj seriji koristi se voda iz istog kontejnera, prethodno provjerena pomoću DOC analize. Takva provjera nije neophodna za ispitivanje u zatvorenoj boci, ali voda ima malu potrošnju kiseonika.

1.7.2. Osnovni rastvori mineralnih materija

Da bi se pripremili ispitivani rastvori, pripremaju se osnovni rastvori mineralnih materija u odgovarajućim koncentracijama. Koriste se sljedeći osnovni rastvori (sa različitim faktorima razblaženja) za metode: nestajanje DOC, modifikovani OECD skrining test, razvijanje C.4-B, manometrijska respirometrija i ispitivanje u zatvorenoj boci.

Faktori razblaženja i priprema mineralne podloge specifična za MITI ispitivanje dati su u konkretnoj metodi ispitivanja.

Osnovni rastvori

Pomoću reagenasa analitičke čistoće pripremaju se osnovni rastvori:

1. rastvoriti u vodi i dopuniti do 1 L (pH rastvora je 7,4): - 8,50 g KH_2PO_4 (kalijum-dihidrogenfosfat);
   - 21,75 g K_2HPO_4 (dikalijum-hidrogenfosfat);
   - 33,40 g $Na_2HPO_4x2H_2O$ (dinatrijum-hidrogenfosfat dihidrat);
   - 0,50 g NH_4Cl (amonijum-hlorid);
2. rastvoriti u vodi i dopuniti do 1 L:
   - 27,50 g $CaCl_2$ (kalcijum-hlorid, bezvodni) ili - 36,40 g $CaCl_2x2H_2O$ (kalcijum-hlorid dihidrat);
3. rastvoriti u vodi i dopuniti do 1 L:
   - 22,50 g $MgSO_4x7H_2O$ (magnezijum-sulfat heptahidrat);
4. rastvoriti u vodi i dopuniti do 1 L:
   - 0,25 g $FeCl_3x6H_2O$ (gvožĐe(III)-hlorid heksahidrat). [33]

1.7.3. Osnovni rastvori hemikalija

U zavisnosti od potrebe, rastvori se od 1 g do 10 g ispitivane ili referentne hemikalije u dejonizovanoj vodi i dopuni do 1 L nakon što rastvorljivost premaši vrijednost 1 g/l. U suprotnom, osnovni rastvori se pripremaju u mineralnoj podlozi ili se hemikalija dodaje direktno u mineralnu podlogu. Za postepene sa slabije rastvorljivim hemikalijama, Dio III ove metode. U MITI ispitivanju (Metoda C.4-F) ne upotrebljava se rassupstancaač ni emulgator.

1.7.4. Inokulumi

[33] Za izbjegavanje pripreme ovog rastvora neposredno prije upotrebe, dodaje se jedna kapljica koncentrovane HCl ili 0,4 g/l natrijumove soli EDTA (etilendiamintetra sirćetna kiselina).

Inokulum potiče iz raznih izvora, kao što su: aktivni mulj, otpadna voda (dehlorisana), površinske vode i zemljište ili iz smješe ovih izvora. Ako se u ispitivanjima nestajanja DOC, razvijanja C.4-B i manometrijskoj respirometriji koristi aktivni mulj, mulj se uzima iz postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda ili iz uređaja laboratorijaskog tipa, koji prima pretežno otpadnu vodu iz domaćinstava. Rasipanje rezultata je veće kad se koriste inokulumi iz drugih izvora. Za modifikovani OECD skrining test i ispitivanje u zatvorenoj boci, koristi se razrijeđeniji inokulum bez folikula mulja, pa se uzima sekundarni efluent iz postrojenja za prečišćavanje komunalnih otpadnih voda ili uređaja laboratorijaskog tipa. Za MITI ispitivanje, inokulum se izvodi iz miješanih izvora i dat je u konkretnoj metodi ispitivanja.

1.7.4.1. Inokulum iz aktivnog mulja

Svjež uzorak aktivnog mulja uzima se iz aeracionog bazena postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda ili uređaja laboratorijaskog tipa u kojem se pretežno obrađuje komunalna otpadna voda. Veće grube čestice po potrebi se uklanjaju pomoću filtracije kroz fino sito, a mulj se nakon toga čuva u aerobnim uslovima.

Alternativno, nakon uklanjanja većih čestica, mulj se taloži ili centrifugira (npr. na 100 g u toku 10 minuta). Supernatant se baca. Mulj se ispira u mineralnoj podlozi. Koncentrovani mulj se suspenduje u mineralnoj podlozi da se dobije koncentracija od 3 g do 5 g suspendovanih materija po litru i aeracija se sprovodi do upotrebe.

Mulj se uzima iz konvencionalnog uređaja koji ispravno radi. Mulj isprati ukoliko se uzima iz velikog uređaja za prečišćavanje ili se smatra da sadrži inhibitore. Nakon što se promiješa, resuspendovani mulj se taloži ili centrifugira, supernatant se baca, a isprani mulj se ponovno resuspenduje u novoj zapremini mineralne podloge. Postupak se ponavlja sve dok se iz mulja ne odstrani višak supstrata ili inhibitora.

Nakon što se postigne potpuna resuspenzija ili sa neobrađenim muljem, uzima se uzorak neposredno prije određivanja suve mase suspendovanih materija.

Sljedeća alternativa je homogenizacija aktivnog mulja (od 3 g/l do 5 g/l suspendovanih materija). Mulj se miješa u mehaničkoj miješalici u toku 2 minuta umjerenom brzinom. Promiješani mulj se taloži 30 minuta ili duže, po potrebi, a tečni dio koji se koristi kao inokulum dekantuje se na 10 ml mineralne podloge.

1.7.4.2. Ostali izvori inokuluma

Inokulum se uzima iz sekundarnog efluenta iz postrojenja za prečišćavanje ili uređaja laboratorijaskog tipa koji prima uglavnom otpadne vode iz domaćinstava. Uzme se svježi uzorak i čuva u aerobnim uslovima u toku transporta. Uzorak se taloži u toku 1 sata ili filtrira kroz grubi filter papir, a efluent ili filtrat se dekantuje i čuva u aerobnim uslovima do upotrebe. Koristi se do 100 ml ove vrste inokuluma po litru podloge.

Izvor inokuluma su i površinske vode. U tom slučaju uzima se uzorak odgovarajuće površinske vode, npr. iz rijeke ili jezera, i čuva u aerobnim uslovima do upotrebe. Po potrebi, inokulum se koncentriše filtriranjem ili centrifugiranjem.

1.7.5. Prekondicioniranje inokuluma

Inokulumi se prekondicioniraju za ispitivane uslove, ali se ne preadaptiraju za ispitivanu hemikaliju. Prekondicioniranje se sastoji od aeracije aktivnog mulja u mineralnoj podlozi ili sekundarnom efluentu u toku 5 do 7 dana na ispitivanoj temperaturi. Prekondicioniranje poboljšava preciznost postupka ispitivanja, jer smanjuje vrijednosti slijepe probe. Nije potrebno prekondicionirati MITI inokulum.

1.7.6. Abiotička kontrola

Po potrebi se provjerava moguća abiotička razgradnja ispitivane supstance određivanjem uklanjanja DOC, potrošnje kiseonika i razvijanja ugljen-dioksida u sterilnim kontrolama koje ne sadrže inokulum. Sterilizacija se vrši filtracijom kroz membranu prečnika od 0,2 µm do 0,45 µm ili dodavanjem odgovarajuće toksične supstance u odgovarajućoj koncentraciji. Ako se koristi membranska filtracija, uzorci se uzimaju aseptički da se održi sterilnost. Testovi koji mjere biorazgradnju kao uklanjanje DOC, sa inokulumima aktivnog mulja, sadrže i abiotičku kontrolu, koja je inokulisana i otrovana, osim u slučaju kad se prethodno isključila adsorpcija ispitivane hemikalije.

1.7.7. Broj posuda za ispitivanje

Broj posuda u tipičnom načinu ispitivanja dat je u pojedinačnom ispitivanju.

Koriste se sljedeće vrste posuda: 1) ispitivana suspenzija:
- sadrži ispitivanu supstancu i inokulum; 2) slijepa proba sa inokulumom:
- sadrži samo inokulum; 3) kontrola postupka:
- sadrži referentnu supstancu i inokulum; 4) sterilna abiotička kontrola:
- sadrži ispitivanu supstancu (tačka 1.7.6. ove metode); 5) kontrola adsorpcije:
- sadrži ispitivanu supstancu, inokulum i sredstvo za sterilizaciju; 6) kontrola toksičnosti:
- sadrži ispitivanu supstancu, referentnu supstancu i inokulum.

Određivanje u ispitivanoj suspenziji i slijepoj probi sa inokulumom se rade uporedo. I određivanja u ostalim posudama se rade uporedo.

Uporedo određivanje nekada nije moguće. Vodi se računa da se uzme dovoljno uzoraka i izvrši dovoljno mjerenja da se procjeni procenat uklanjanja nakon desetodnevnog perioda.

1.8. Podaci i procjena

Kad se iizračunava procenat razgradnje (Dt) koriste se srednje vrijednosti dvostrukih mjerenja parametara u posudi za ispitivanje i slijepoj probi sa inokulumom. Formule za iizračunavanje date su u pojedinim metodama ispitivanja. Tok razgradnje prikazuje se grafički i pokazuje se desetodnevni period. Iizračunava se i prikazuje procenat uklanjanja koji je postignut na kraju desetodnevnog perioda i vrijednost na platou ili na kraju ispitivanja, u zavisnosti šta je primjerenije. U respirometrijskim ispitivanjima jedinjenja koja sadrže azot utiču na potrošnju kiseonika zbog nitrifikacije (Deo II i V ove metode).

1.8.1. Razgradnja mjerena pomoću određivanja DOC

Procenat razgradnje (Dt) u trenutku uzimanja uzorka iizračunava se posebno za svaku posudu koja sadrži ispitivanu supstancu pomoću srednjih vrijednosti DOC iz dva mjerenja da bi se procjenila prihvatljivost ispitivanja (dio 1.6.2. ove metode). Procenat razgradnje se iizračunava prema jednačini:

D_t=□□□1_____$_C C_0^1$ $_C C_b^{bt}{}_0$ □□□□□100 gdje je: D_t procenat razgradnje u vremenu t; C_0 srednja početna

□ koncentracija DOC u inokulisanoj podlozi koja sadrži ispitivanu supstancu (u mg DOC/l); C_t srednja koncentracija DOC u inokulisanoj podlozi koja sadrži ispitivanu supstancu u vremenu t (u mg DOC/l); C_{b0} srednja početna koncentracija DOC u mineralnoj podlozi inokulisanoj slijepom probom (u mg DOC/l); C_{bt} srednja koncentracija DOC u mineralnoj podlozi inokulisanom slijepom probom u vremenu t (u mg DOC/l).

Sve koncentracije mjere se eksperimentalno.

1.8.2. Razgradnja koja se mjeri pomoću specifične analize

Primarna biorazgradnja, kad postoje podaci za specifičnu analizu, iizračunava se prema formuli:

D_t=□□□□1 _____S^b S_b S^a □□□□□100gdje je: Dt procenat razgradnje u vremenu t koje uobičajeno iznosi 28 dana;

S_a ostatak ispitivane supstance u inokulisanoj podlozi na kraju ispitivanja (mg); S_b ostatak ispitivane supstance u slijepoj probi sa vodom/podlogom kojoj je dodata samo ispitivana supstanca (mg).

1.8.3. Abiotička razgradnja

Procenat abiotičke razgradnje, kad se koristi abiotička sterilna kontrola, izračuna se pomoću formule:

%abiotičke razgradnje= _____$C^{s0\tilde{}\,Cst}$ □100gdje je: $C_{s(0)}$ DOC koncentracija u sterilnoj kontroli na dan

Cso

0; $C_{s(t)}$ DOC koncentracija u sterilnoj kontroli na dan t.

1.9. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:
- ispitivanim i referentnim hemikalijama i njihovim čistoćama;
- uslovima u toku ispitivanja;
- inokulumu: priroda i mjesto/mjesta uzimanja uzorka, koncentracija i svaka obrada prekondicioniranjem;
- uDijelu i prirodi industrijskog otpada prisutnog u otpadnoj vodi (ako je poznato);
- dužini ispitivanja i temperaturi;
- u slučaju slabo rastvorljivih ispitivanih hemikalija, podatke o pripremi ukoliko je bilo,
- primjenjenoj metodi ispitivanja(moraju se dati naučni razlozi i objašnjenja za svaku izmjenu u postupku);
- obrascu za unos podataka;
- svakoj primjećenoj pojavi inhibicije;
- svakoj primjećenoj abiotičkoj razgradnji;
- specifičnim hemijskim analizama, ako postoje;

- analitičkim podacima o međuproizvodima, ako postoje;
- grafičkim prikazima procenta razgradnje u vremenu za određenu ispitivanu i referentnu supstancu; faza odgode, faza razgradnje, desetodnevni period i nagib moraju biti jasno označeni (dio 1.2. ove metode). Ako je ispitivanje zadovoljilo kriterijume prihvatljivosti, srednje vrijednosti procenta razgradnje u posudama koje sadrže ispitivanu supstancu mogu se upotrijebiti za izradu grafičkog prikaza;
- procentu uklanjanja nakon desetodnevnog perioda, kao i na platou ili na kraju ispitivanja.

METODA ISPITIVANJA NESTAJANJE DOC (METODA C.4-A)

2.1. Princip metode

Izmjerena zapremina inokulisane mineralne podloge koja sadrži poznatu koncentraciju ispitivane supstance (10 mg DOC/l do 40 mg DOC/l) kao jedini nominalni izvor organskog ugljenika aeriše se u mraku ili pod difuznim osvetljenjem na temperaturi od (22 ± 2) °C.

Nakon razgradnje slijedi DOC analiza u čestim vremenskim intervalima u toku perioda od 28 dana. Stepen biorazgradnje iizračunava se prikazivanjem koncentracije uklonjenog DOC (korigovan za onaj DOC u kontroli sa inokulisanom slijepom probom) kao procenta od koncentracije prisutne na početku. Stepen primarne biorazgradnje se iizračunava i iz dopunske hemijske analize sprovedene na početku i na kraju inkubacije.

2.2. Opis metode

2.2.1. Oprema

Oprema za ispitivanje sadrži:
- erlenmajer sudove 250 ml do 2 L, u zavisnosti od zapremine potrebne za DOC analizu;
- miješalicu u koju se pričvršćuju erlenmajer sudovi (sa ili bez automatske kontrole temperature ili se koriste pri konstantnoj sobnoj temperaturi), dovoljne snage da održi aerobne uslove u svim posudama;
- uređaj za filtriranje, sa odgovarajućim membranama;
- DOC analizator;
- uređaj za određivanje rastvorenog kiseonika; - centrifugu.

2.2.2. Priprema mineralne podloge

Za pripremu osnovnog rastvora dio 1.8.2. ove metode.

Pomiješa se 10 ml osnovnog rastvora 1. sa 800 ml vode za razblaživanje, doda se 1 ml osnovnih rastvora 2. do 4. i dopuni se do 1 L vodom za razblaživanje.

2.2.3. Priprema i prekondicioniranje inokuluma

Inokulum se iznosi iz raznih vrsta izvora: aktivnog mulja, komunalnog efluenta, površinskih voda, zemljišta ili smješe istih u skladu sa tačkama 1.7.4, 1.7.4.1, 1.7.4.2. i 1.7.5. ove metode.

2.2.4. Priprema posuda za ispitivanje

Ulije se 800 ml mineralne podloge u dvolitarske erlenmajer sudove i dodaju se dovoljne zapremine osnovnih rastvora ispitivanih i referentnih supstanci u odvojene sudove tako da

se dobije koncentracija hemijskog ekvivalenta 10 mg DOC/l do 40 mg DOC/l. Provjere se pH vrijednosti i dovedu do 7,4. Aktivni mulj ili drugi izvori inokuluma (dio 1.7.4. ove metode) inokuliraju se u obične sudove tako da se dobije konačna koncentracija do najviše 30 mg/l suspendovanih materija.
Pripreme se i kontrole inokuluma u mineralnoj podlozi, ali bez ispitivane ili referentne hemikalije.

Jedna posuda se koristi za provjeru mogućeg inhibitornog efekta ispitivane hemikalije inokulacijom rastvora koji sadrži, u mineralnoj podlozi, slične koncentracije kako ispitivane, tako i referentne hemikalije.

Postavi se još jedan sterilan običan sud da se pomoću neinokulisanog rastvora hemikalije provjeri da li se hemikalija abiotički razgrađuje (dio 1.7.6. ove metode).

Ako se ispitivana hemikalija značajno adsorbuje na staklo, mulj, i dr. napravi se preliminarna procjena da se odredi vjerovatni opseg adsorpcije i tako pogodnost metode ispitivanja za date hemikalije (Tabela 1). Postavi se običan sud koji sadrži ispitivanu supstancu, inokulum i sredstvo za sterilizaciju.

Zapremina u svim običnim sudovima se dopuni do 1 l mineralnom podlogom i nakon miješanja, uzima se uzorak iz svakog običnog suda da se odredi početna koncentracija DOC (dio 2.4. ove metode). Otvori običnih sudova se pokriju, npr. aluminijskom folijom, ali tako da se omogući slobodna razmjena vazduha između običnog suda i okolne atmosfere. Zatim se posuda stavi na miješalicu da bi se započelo ispitivanje.

2.2.5. Broj običnih sudova u tipičnom ispitivanju

- ispitivana suspenzija: obični sudovi br. 1 i 2;
- slijepa proba sa inokulumom: obični sudovi br. 3 i 4;
- kontrola postupka: običan sud broj 5.

Preporučeno i po potrebi:
- sterilna abiotička kontrola: običan sud broj 6;
- kontrola adsorpcije: običan sud broj 7;
- kontrola toksičnosti: običan sud broj 8.

Tačka 1.7.7. ove metode.

2.2.6. Postupak
Tokom ispitivanja, koncentracije DOC u svakom običnom sudu određuju se u duplikatu u poznatim vremenskim intervalima, da se može odrediti početak desetodnevnog perioda i procenat uklanjanja na kraju desetodnevnog perioda. Uzima se minimalna zapremina ispitivane suspenzije potrebna za svako određivanje.

Prije uzimanja uzoraka gubitak nastao isparavanjem iz bočica se nadoknađuje dodavanjem vode za razblaživanje (dio 1.8.1. ove metode) u odgovarajućoj količini. Prije uzimanja uzorka, podloga za kulturu se promiješa i osigura se da materijal koji prilježe uz zidove posude bude rastvoren i suspendovan. Filtrira se kroz membrane ili centrifugira (dio 2.4. ove metode) odmah nakon uzimanja uzorka. Filtrirani ili centrifugirani uzorci analiziraju se istog dana; u suprotnom, čuvaju se najviše 48 sati na temperaturi od 2 °C do 4 °C ili na temperaturi ispod -18 °C u toku dužeg perioda.

2.3. Podaci i izvještaj

2.3.1. Obrada rezultata

Izračuna se procenat razgradnje u vremenu t kako je opisano u dijelu 1.8.1. ove metode (određivanje DOC) i, po izboru, u dijelu 1.8.2. ove metode (specifična analiza).

Rezultati se zapisuju na obrascima za unos podataka.

2.3.2. Prihvatljivost rezultata
Prihvatljivost rezultata je u skladu sa dijelom 1.6.2. ove metode.

2.3.3. Izvještaj

Izvještaj je u skladu sa dijelom 1.9. ove metode.

2.4. Obrasci za unos podataka
Primjer obrasca za unos podataka:

METODA ISPITIVANJA NESTAJANJA DOC

1. Laboratorijaa

2. Datum početka ispitivanja

3. Ispitivana supstanca

Hemijski naziv:

Koncentracija osnovnog rastvora:... mg/l kao hemikalija

Početna koncentracija u podlozi, do/prema:... mg/l kao hemikalija

4. Inokulum

Izvor:

Sprovedena obrada:

Prekondicioniranje, ako je ssprovedeno:

Koncentracija suspendovanih materija u reakcionoj smješi: … mg/l

5. Određivanje ugljenika

Analizator ugljenika:

	Običan sud broj:		DOC nakon n dana				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Ispitivana supstanca +		a_1					

inokulum	1	a_2					
		a, srednja Ca(n)					
	2	b_1					
		b_2					
		b, sradnja Cb(n)					
Slijepa proba sa inokulumom bez ispitivane supstance	3	c_1					
		c_2					
		c, srednja Cc(n)					
		d1					
	4	d2					
		d, srednja Cd(n)					
	$Cd(1)=\frac{Cc(s)\ Cd(n)}{2}$						

6.Procjena neobrađenih podataka

Običan sud broj:		% razgradnje nakon n dana				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	1 ——— □□□1*CCdd*01*CCbbt*0 □□□□□100 D = □	0				
2	2 ——— □□□1*CCdd*01*CCbbt*0 □□□□□100 D = □	0				
Srednja vrijednost*	$D=\frac{D_1\ D_2}{2}$	0				
* ne koristi se srednja vrijednost ako između D1 I D2 postoji značajna razlika						

Za referentne hemijske kontrole i kontrole toksičnosti koriste se slični obrasci.

7. Abiotička kontrola (po izboru)

	Vrijeme (u danima)	
	0	t
DOC koncentracija (mg/l) u sterilnoj kontroli	Cs(0)	Cs(t)

%abiotičke razgradnje= $\frac{C^{s0\ Cst}}{Cso} \times 100$

8. Specifična hemijska analiza (po izboru)

	rezidualna količina ispitivane supstance na kraju ispitivanja (mg/l)	% primarne razgradnje
Sterilna kontrola	S_b	
Inokulisana ispitivana podloga	S_a	

MODIFIKOVANI OECD SKRINING TEST (METODA C.4-B)

3.1. Princip metode

Izmjerena zapremina mineralne podloge koja sadrži poznatu koncentraciju ispitivane supstance (10 mg DOC/l do 40 mg DOC/l) kao jedini nominalni izvor organskog ugljenika inokulira se sa 0,5 ml efluenta po litru medijumuma. Smješa se aeriše u mraku ili pod difuznim osvetljenjem na 22 °C ± 2 °C.

Nakon razgradnje slijedi DOC analiza u čestim razmacima u toku 28 dana. Stepen biorazgradnje iizračunava se prikazivanjem koncentracije uklonjenog DOC (korigovanog za onaj u kontroli koju predstavlja inokulisana slijepa proba) kao procenat od koncentracije prisutne na početku. Stepen primarne biorazgradnje može se izračunati i iz dodatne hemijske analize koja se radi na početku i na kraju inkubacije.

3.2. Opis metode

3.2.1. Oprema

Oprema za ispitivanje sadrži:

- erlenmajer sudove zapremine od 250 ml do 2 L, u zavisnosti od zapremine potrebne za DOC analizu;
- miješalicu (u koju se pričvršćuje erlenmajer sudovi sa automatskom kontrolom temperature ili bez, ako se koriste pri konstantnoj sobnoj temperaturi) dovoljne snage da održi aerobne uslove u svim posudama;
- uređaj za filtriranje, sa odgovarajućim membranama;
- DOC analizator;
- uređaj za određivanje rastvorenog kiseonika;
- centrifugu.

3.2.2. Priprema mineralne podloge

Priprema osnovnog rastvora je u skladu sa tačkom 1.7.2. ove metode. Potrebno je pomiješati 10 ml osnovnog rastvora 1. sa 80 ml vode za razblaživanje, dodati 1 ml osnovnog rastvora 2. do 4. i dopuniti vodom za razblaživanje do ukupne zapremine od 1 L.

Koristi se 0,5 ml/l efluenta kao inokulum, pa bi podlogu trebalo obogatiti elementima u tragovima i faktorima rasta. To se postiže dodatkom 1 ml svakog od sljedećih rastvora po litru gotove podloge:

1. Rastvor elemenata u tragovima:
   - 39,9 mg $MnSO_4x4H_2O$ (mangan-sulfat tetrahidrat);
   - 57,2 mg H_3BO_3 (borna kiselina);
   - 42,8 mg $ZnSO_4x7H_2O$ (cink-sulfat heptahidrat); - 34,7 mg $(NH_4)_6Mo7O_{24}$ (amonijum heptamolibdat); - 100,0 mg $FeCl_3$ i EDTA (helat gvožđa).

Rastvoriti u vodi za razblaživanje i dopuniti vodom do ukupno 1.000ml.

2. Rastvor vitamina:
   - ekstrakt kvasca 15,0 mg.

Rastvoriti ekstrakt kvasca u 100 ml vode. Sterilisati filtracijom kroz membranu od 0,2 µ ili pripremiti neposredno pred upotrebu.

3.2.3. Priprema i prekondicioniranje inokuluma

Inokulum se uzima iz sekundarnog efluenta iz postrojenja za prečišćavanje ili uređaja laboratorijaskog tipa koji prima pretežno otpadnu vodu iz domaćinstava. Tačke 1.7.4.2. i 1.7.5. ove metode. Koristi se 0,5 ml po litru mineralnog medijumuma.

3.2.4. Priprema običnih sudova

Sipa se 800 ml mineralne podloge u dvolitarske erlenmajer sudove i doda se dovoljno velika zapremina osnovnih rastvora ispitivane i referentne supstance u odvojene obične sudove da se dobije koncentracija hemijskog ekvivalenta 10 mg DOC/l do 40 mg DOC/l. Provjeri se pH vrijednost i po potrebi dovede na 7,4. Izlazni efluent inokuliše se u obične sudove u koncentraciji od 0,5 ml po litru (dio 1.7.4.2. ove metode). Pripreme se i kontrole inokuluma u mineralnoj podlozi, ali bez ispitivane ili referentne hemikalije.

Koristi se jedna posuda da se provjeri mogući inhibitorni efekat ispitivane hemikalije inokulacijom rastvora koji sadrži, u mineralnoj podlozi, slične koncentracije i ispitivane i referentne hemikalije. Postavi se još jedan sterilan običan sud da se pomoću neinokulisanog rastvora hemikalije provjeri da li se ispitivana hemikalija razgrađuje abiotički (dio 1.8.6. ove metode).

Ako se ispitivana hemikalija adsorbuje na staklo, mulj, itd. radi se preliminarna procjena da se odredi verovatni opseg adsorpcije i time pogodnost metode za ispitivanje te hemikalije (Tabelu 1). Postavi se običan sud koji sadrži ispitivanu supstancu, inokulum i sredstvo za sterilizaciju.

U sve obične sudove dodaje se mineralna podloga do zapremine od 1 L. Nakon miješanja, uzima se uzorak iz svakog pojedinog običnog suda da se odredi početna koncentracija DOC (dio 2.4. ove metode). Pokriju se otvori običnih sudova, npr. sa aluminijskom folijom, ali tako da se omogući razmjena vazduha između običnog suda i okolne atmosfere. Zatim se posude stavljaju na miješalicu i započinje se sa ispitivanjem. 3.2.5. Broj običnih sudova u tipičnom ispitivanju

Redni broj običnih sudova:

- ispitivana suspenzija: obični sudovi br. 1 2;
- slijepa proba sa inokulumom: obični sudovi br. 3 i 4;
- kontrola postupka: običan sud broj 5.

Preporučeno i po potrebi:

- sterilna abiotička kontrola: običan sud broj 6;
- kontrola adsorpcije: običan sud broj 7;
- kontrola toksičnosti: običan sud broj 8.

Takođe, broj običnih sudova u tipičnom ispitivanju treba da je u skladu sa tačkom 1.7.7. ove metode.

3.2.6. Postupak

Tokom čitavog ispitivanja, koncentracije DOC određuju se u svakom običnom sudu u duplikatu u poznatim vremenskim intervalima, da se odredi početak desetodnevnog perioda i procenat uklanjanja na kraju desetodnevnog perioda. Uzima se minimalna zapremina ispitivane suspenzije potrebne za svako određivanje.

Prije uzimanja uzoraka zapremina koja se izgubila isparavanjem iz bočica nadoknađuje se dodavanjem vode za razblaživanje (dio 1.7.1. ove metode) u odgovarajućoj količini. Prije uzimanja uzorka, podloga se temeljno promiješa i pazi se da materijal koji prileže uz zidove posude bude rastvoren ili suspendovan. Odmah nakon uzimanja, uzorak se membranski filtrira ili centrifugira (dio 2.4. ove metode). Filtrirani ili centrifugirani uzorci analiziraju se istog dana; u suprotnom, čuvaju se na 2 °C do 4 °C u toku najviše 48 sati ili na temperaturi manjoj od -18 °C u toku dužeg perioda.

3.3. Podaci i izvještaj

3.3.1. Obrada rezultata

Izračuna se procenat razgradnje u vremenu t kako je dato u dijelu 1.8.1. ove metode (DOC određivanje) i po izboru, u dijelu 1.8.2. ove metode (specifična analiza). Rezultati se zapisuju na obrascima za unos podataka.

3.3.2. Prihvatljivost rezultata

Prihvatljivost rezultata je u skladu sa tačkom 1.6.2. ove metode.

3.3.3. Izvještaj

Izvještaj je u skladu sa tačkom 1.9. ove metode.

3.4. Obrasci za unos podataka

Primjer obrasca za unos podataka:

MODIFIKOVANA OECD TRIJAŽA

1. Laboratorijaa

2. Datum početka ispitivanja

3. Ispitivana supstanca

Hemijski naziv:

Koncentracija osnovnog rastvora:... mg/l kao hemikalija

Inicijalna koncentracija u podlozi, do:... mg/l kao hemikalija

4. Inokulum

Izvor:

Obavljena obrada:

Prekondicioniranje, ako je obavljeno:

Koncentracija suspendovanih materija u reakcionoj smješi: … mg/l

5. Određivanje ugljenika

Analizator ugljenika:

	Običan sud broj:		DOC nakon n dana				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Ispitivana supstanca + inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, srednja Ca(n)					
	2	b_1					
		b_2					
		b, sradnja Cb(n)					
Slijepa proba sa inokulumom bez ispitivane supstance	3	c_1					
		c_2					
		c, srednja Cc(n)					
	4	d1					
		d2					
		d, srednja Cd(n)					

	$Cc(s)\ Cd(n)$ Cd(1)= ——— 2					

6.Procjena neobraĐenih podataka

Običan sud broj:		% razgradnje nakon n dana				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	——— □□□1*CCdd*01*CCbbt*0 □□□□□100 D_1= □	0				
2	——— □□□1*CCdd*01*CCbbt*0 □□□□□100 D_2= □	0				
Srednja vrijednost*	D D= ———1 $D2$ 2	0				
* ne koristi se srednja vrijednost ako između D1 I D2 postoji značajna razlika						

Za referentne hemijske kontrole i kontrole toksičnosti mogu se koristiti slični obrasci.

7. Abiotička kontrola (po izboru)

	Vrijeme (u danima)	
	0	t
DOC koncentracija (mg/l) u sterilnoj kontroli	Cs(0)	Cs(t)

%abiotičke razgradnje= ———$C^{s0\ Cst}$ □100
Cso

8. Specifična hemijska analiza (po izboru)

	rezidualna količina ispitivane supstance na kraju ispitivanja (mg/l)	% primarne razgradnje
Sterilna kontrola	S_b	
Inokulisana ispitivana podloga	S_a	

RAZVIJANJE METODE C.4-B (METODA C.4-C)

4.1. Princip metode

Izmjerena zapremina inokulisane mineralne podloge koja sadrži poznatu koncentraciju ispitivane hemikalije (10 mg do 20 mg DOC ili TOC/l) kao jedini nominalni izvor organskog ugljenika aeriše se prolaskom vazduha bez ugljen-dioksida pri kontrolisanoj brzini u mraku ili

pod difuznim osvetljenjem. Razgradnja se prati u toku 28 dana određivanjem proizvedenog ugljen-dioksida, koji se hvata barijum ili natrijum hidroksidom i mjeri titracijom rezidualnog hidroksida ili kao neorganski ugljenik. Količina ugljen-dioksida proizvedena iz ispitivane hemikalije (korigovano za onu količinu izvedenu iz slijepe probe sa inokulumom) izražava se kao procenat ThC.4-B. Stepen biorazgradnje se iizračunava i iz dodatne DOC analize koja se obavlja na početku i na kraju inkubacije.

4.2. Opis metode

4.2.1. Oprema

Oprema za ispitivanje sadrži:

- obične sudove, od 2 L do 5 L, svaki opremljen sa cijevčicom za vazduh koja doseže skoro do dna posude i otvorom;
- magnetne miješalice, ako se ispituju slabo rastvorljive hemikalije;
- boce za apsorpciju gasova;
- uređaj za kontrolu i mjerenje protoka vazduha;
- opremu za uklanjanje ugljen-dioksida, tj. za pripremu vazduha koji ne sadrži ugljendioksid; alternativno se koristi smješa kiseonika bez C.4-B i azota bez C.4-B, iz gasnih cilindara, u pravoj proporciji (20% O_2 : 80% H_2);
- uređaj za određivanje ugljen-dioksida, ili titrimetrijski ili pomoću nekog tipa analizatora neorganskog ugljenika;
- uređaj za membransku filtraciju (nije obavezan); - DOC analizator (nije obavezan).

4.2.2. Priprema mineralne podloge

Priprema osnovnog rastvora je u skladu sa tačkom 1.8.2. ove metode.

Pomiješa se 10 ml osnovnog rastvora 1. sa 800 ml vode za razblaživanje, doda se 1 ml osnovnog rastvora 2. do 4. i dopuni vodom za razblaživanje do ukupno 1 L.

4.2.3. Priprema i prekondicioniranje inokuluma

Inokulum se uzima iz raznih izvora: aktivnog mulja; efluenata otpadne vode; površinskih voda, zemljišta ili iz smješe istih.

Priprema i prekondicioniranje inokuluma je u skladu sa tačkama 1.7.4, 1.7.4.1, 1.7.4.2. i 1.7.5. ove metode.

4.2.4. Priprema običnih sudova

Kao primjer, dolje navedene zapremine i težine pokazuju vrijednosti koje se koriste za petolitarske obične sudove koje sadrže 3 L suspenzije. Ako se koriste manje zapremine, vrijednosti se prilagoĐavaju, s tim da se stvoreni ugljen-dioksid tačno mjeri.

U svaki petolitarski običan sud sipa se 2.400 ml mineralne podloge. Doda se odgovarajuća zapremina pripremljenog aktivnog mulja (dio 1.7.4.1. i 1.7.5. ove metode) tako da se u konačnoj inokulisanoj mješavini od 3 L dobije koncentracija suspendovanih materija od najviše 30 mg/l. Alternativno, prvo se klasai pripremljeni mulj da se formira suspenzija od 500 mg/l do 1.000 mg/l u mineralnoj podlozi prije dodavanja uzorka - tako da se dobije koncentracija od 30 mg/l. Postupak obezbjeđuje veću preciznost. Koriste se i ostali izvori

inokuluma (dio 1.7.4.2. ove metode). Inokulirane smješe aerišu se vazduhom koji ne sadrži C.4-B u toku noći, da se sistem pročisti od ugljen-dioksida.

Ispitivani materijal i referentna supstanca dodaju se odvojeno, kao poznate zapremine osnovnih rastvora, u običnim sudovima u duplikatu, tako da finalne koncentracije, kojima su doprinele dodate hemikalije, budu od 10 mg do 20 mg DOC ili TOC/l. U neke obične sudove ne dodaju se hemikalije i one služe kao kontrola inokuluma. Slabo rastvorljive ispitivane supstance dodaju se direktno u obične sudove na bazi težine ili zapremine, kao što je opisano u Dijelu III ove metode.

Po potrebi, jedan običan sud se koristi za provjeru mogućeg inhibitornog efekata ispitivane hemikalije tako što se dodaju i ispitivana i referentna hemikalija u istim koncentracijama u kojima su prisutne u drugim običnim sudovima.

Po potrebi, jedan sterilan običan sud koristi se kako bi se upotrebom neinokulisanog rastvora hemikalije provjerilo da li se ispitivana hemikalija razgrađuje abiotički (dio 1.8.6. ove metode). Steriliše se dodavanjem toksične supstance u odgovarajućoj koncentraciji.

Suspenzija se u svim običnim sudovima dopuni do zapremine od 3 L dodavanjem mineralne podloge prethodno aerisane vazduhom koji ne sadrži C.4-B. Po izboru, mogu se izvući uzorci za analizu DOC (Dio II ove metode), odnosno uzorci za specifičnu analizu. Apsorpcione boce spajaju se sa otvorima za vazduh na običnim sudovima.

Ako se koristi barijum-hidroksid, jedinjenjee se tri apsorpcione boce, od kojih svaka sadrži 100 ml rastvora barijum-hidroksida od 0,0125 M, u seriji sa svakim petolitarskim običnim sudom. Navedeni rastvor ne sadrži istaloženi sulfat ni karbonat i njegova jačina se određuje neposredno prije upotrebe. Ako se koristi natrijum hidroksid, spajaju se dvije klopke, od kojih druga ima ulogu kontrole, da se pokaže da se sav ugljen-dioksid apsorbovao u prvoj. Pogodne su apsorpcione boce sa gumenim čepom. U svaku bocu se doda po 200 ml 0,05 M natrijum-hidroksida, što je dovoljno da se apsorbuje ukupna količina ugljen-dioksida koja se razvije kad ispitivana hemikalija bude potpuno razgrađena. Rastvor natrijum-hidroksida, čak i kad je svježe pripremljen, sadrži tragove karbonata, što se koriguje oduzimanjem vrijednosti karbonata u slijepoj probi.

4.2.5. Broj običnih sudova u tipičnom ispitivanju

Redni broj običnih sudova:

- ispitivana suspenzija: obični sudovi br. 1 i 2; - slijepa proba sa inokulumom: obični sudovi br. 3 i 4; - kontrola postupka: običan sud broj 5.

Preporučeno i po potrebi:

- sterilna abiotička kontrola: običan sud broj 6; - kontrola adsorpcije: običan sud broj 7;
- kontrola toksičnosti: običan sud broj 8.

Broj običnih sudova u tipičnom ispitivanju dio 1.7.7. ove metode.

4.2.6. Postupak

Ispitivanje započinje propuštanjem mjehurića vazduha koji ne sadrži C.4-B kroz suspenzije brzinom od 30 ml/min do 100 ml/min. Periodično se uzimaju uzorci apsorbenta ugljen

dioksida za analizu sadržaja C.4-B. Tokom prvih 10 dana analiza se uradi svaki drugi ili treći dan, a zatim svaki peti dan sve do 28. dana, tako da se identifikuje desetodnevni period.

Dvadesetosmog dana, uzimaju se uzorci (po izboru) za DOC, odnosno za specifičnu analizu, mjeri se pH suspenzije i dodaje 1 ml koncentrovane hlorovodonične kiseline u svaki običan sud. Preko noći obični sudovi se aerišu da se izvuče ugljen-dioksid prisutan u ispitivanim suspenzijama. Dvadesetdevetog dana radi se nakondnja analiza stvorenog ugljen-dioksida.

Na dane mjerenja C.4-B, odvaja se apsorber sa barijum hidroksidom koji je najbliži običnom sudu i hidroksidni rastvor se titrira sa 0,05 M HCl, pri čemu se fenolftalein koristi kao indikator. Preostali apsorberi se pomiču za jedno mjesto bliže običnom sudu i postavlja se novi apsorber koji sadrži 100 ml svježeg 0,0125 M barijum hidroksida na najdalji kraj serije. Titracije se rade po potrebi, npr. kad se vidi velika precipitacija u prvoj klopci, a prije nego postane vidljiva u drugoj, ili najmanje jednom nedeljno. Alternativno se, sa NaOH kao apsorbentom, pipetom izvlači mali uzorak (u zavisnosti od karakteristika upotrijebljenog analizatora ugljenika) rastvora natrijum hidroksida u apsorberu bližem običnom sudu. Uzorak se injektira direktno u IC dio analizatora ugljenika za analizu nastalog ugljen-dioksida.

Sadržaj druge klopke analizira se na kraju ispitivanja, radi korekcije za eventualni preneti ugljendioksid.

4.3. Podaci i izvještaj

4.3.1. Obrada rezultata

Količina C.4-B uhvaćenog u apsorberu izražava se pomoću formule:

$mgCO_2 = (100 \times C_B - 0.5 \times C \times C_A) \times 44$ gdje je: V zapremina HCl upotrijebljene za titraciju 100 ml u apsorberu (ml); C_B koncentracija rastvora barijum hidroksida (M); C_A koncentracija rastvora hlorovodonične kiseline (M).

Ako C_B iznosi 0,0125 M i C_A iznosi 0,05 M, titracija za 100 ml barijum hidroksida jeste 50 ml, a masu C.4-B daje izraz:

$$\frac{05}{2} \quad 0.$$
$$\square 44 \square mltitiraneHCl \ \square 1.1 \square mlHCl$$

U ovom slučaju, za prevođenje zapremine istitrovane HCl u mg proizvedenog C.4-B primjenjuje se faktor 1,1. Izračunaju se mase C.4-B proizvedenog iz čistog inokuluma i inokuluma sa ispitivanom hemikalijom pomoću odgovarajućih titracionih vrijednosti, a dobijena razlika je masa C.4-B proizvedenog samo iz ispitivane hemikalije. Na primjer, ako sam inokulum daje titraciju od 48 ml, a inokulum sa ispitivanom hemikalijom daje 45 ml:

C.4-B iz inokuluma = 1,1 x (50-48)=2,2 mg

C.4-B iz inokuluma sa ispitivanom hemikalijom = 1,1 x (50-45) = 5,5 mg

Masa C.4-B proizvedenog iz ispitivane hemikalije iznosi 3,3 mg.

Procenat biorazgradnje iizračunava se formulom:

$$\%\ \text{razgradnje} = \frac{mg\,proizvedenog\,C4\ B \times 100}{ThC.4\ B \times mg\,dodate\,ispitivane\,hemikalije}$$ ili formulom:

$$\%\ \text{razgradnje} = \frac{mg\,proizvedenog\,C4\ B \times 100}{mg\,TOC\,dodatog\,prilikom\,isoitivanja \times 3.67}$$ uz 3,67 kao faktor konverzije (44/12) za ugljenik u ugljen-dioksid.

Da bi se dobio procenat razgradnje nakon bilo kog vremenskog intervala, doda se procenat vrijednosti ThC.4-B izračunate za svaki pojedini dan, do vremena na koji se radilo mjerenje.

Za apsorbere od natrijum hidroksida, izračuna se količina proizvedenog ugljen-dioksida, izražena kao IC (mg), množenjem koncentracije IC u apsorbentu sa zapreminom apsorbenta.

Procenat razgradnje iizračunava se formulom:

$$\%\text{ThC.4-B} = \frac{mg\,IC\,običg\,I\ gsuda\,mlIC(slijepe\,probe)}{MG\,TOC\,dodatka\,oispitivana\,hemikalija}$$

Uklanjanje DOC (po izboru) se izračuna na način iz dijela 1.8. ove metode. Rezultati se zapisuju u obrascima za unos podataka.

4.3.2. Prihvatljivost rezultata

Sadržaj IC u suspenziji ispitivane hemikalije u mineralnoj podlozi na početku ispitivanja iznosi manje od 5% TC, a ukupno razvijeni C.4-B u slijepoj probi sa inokulumom na kraju ispitivanja ne prelazi 40 mg/l podloge. Ako se dobiju vrijednosti iznad 70 mg C.4-B/l, podaci i ispitivana tehnika se kinetički ispituje.

Prihvatljivost rezultata je u skladu sa tačkom 1.6.2. ove metode.

4.3.3. Izvještaj

Izvještaj je u skladu sa tačkom 1.9. ove metode.

4.4. Obrasci za unos podataka

Primjer obrasca za unos podataka:

METODA ISPITIVANJA RAZVIJANJA C.4-B

1. Laboratorijaa

2. Datum početka ispitivanja

3. Ispitivana supstanca

Hemijski naziv:
Koncentracija osnovnog rastvora:... mg/l kao hemikalija
Početna koncentracija u podlozi:... mg/l kao hemikalija

Ukupni C dodat u običnu posudu :... mg C
ThC.4-B: … mg C.4-B

4. Inokulum

Izvor:
Sprovedena obrada:
Prekondicioniranje, ako je ssprovedeno:
Koncentracija suspendovanih materija u reakcionoj smješi:... mg/l.

Vrijeme(dani)	RazvijeniC.4-B Test (mg)		RazvijeniC.4-B Slijepa proba (mg)		Kumulativni razvijeniC.4 B(mg)(test – srednja vrijednost slijepe probe)		ThC.4-B $\frac{kumulativniCO_2}{ThCO_2} \cdot 100$		
	1/2	Srednja vrijednost	3/4	Srednja vrijednost	1	2	1	2	Srednja vrijednost
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Slični formati se koriste za referentne hemijske kontrole i kontrole toksičnosti.

6. Analiza ugljenika (po izboru)

Analizator ugljenika

Vrijeme (u danima)	Slijepa proba (mg/l)	Test hemikalija (mg/l)
0	Cb(0)	C_0
28 (*)	Cb(t)	C_t
(*) ili na kraju inkubacije		

%uklonjenog DOC=□□□1_____*CC*01 *CCbb*10 □□□□□100

□

7.Abiotička razgradnja (po izboru)

% abiotičke razgradnje= _____
*CO2nastaouobičnojposudinakon*28*dana*□*mg*□□100
ThCO$_2$□*mg*□

MANOMETRIJSKA RESPIROMETRIJA (METODA C.4-D)

5.1. Princip metode

Odmjerena zapremina inokulisane mineralne podloge, koja sadrži poznatu koncentraciju ispitivane hemikalije (100 mg/l ispitivane supstance, da se dobije najmanje 50 mg ThOD/l do 100 mg ThOD/l) kao jedini nominalni izvor organskog ugljenika, miješa se u zatvorenom običnom sudu na stalnoj temperaturi (± 1°C ili manje) ne duže od 28 dana. Potrošnja kiseonika određuje se ili pomoću mjerenja količine kiseonika (proizvedenog elektrolizom) potrebnog da se održi konstantna zapremina gasa u običnom sudu respirometra ili iz promjena u zapremini ili pritisku ili kombinacijom ova dva načina) u opremi. Razvijeni ugljen-dioksid apsorbuje se u rastvoru kalijum hidroksida ili drugog pogodnog apsorbenta. Količina kiseonika koju potroši ispitivana hemikalija (korigovano za potrošnju inokuluma iz slijepe probe, radi se uporedo) izražava se kao procenat ThOD ili HPK. Po izboru, primarna biorazgradnja se iizračunava i iz dodatne specifične analize uraĐene na početku i na kraju inkubacije, a krajnja biorazgradnja pomoću DOC analize. **5.2. Opis metode**

5.2.1. Oprema

Oprema za ispitivanje sadrži:
- pogodni respirometar;
- kontrolu temperature, koja se održava unutar ± 1 °C ili manje; - sistem za membransku filtraciju (nije obavezan); - analizator ugljenika (nije obavezan).

5.2.2. Priprema mineralne podloge

Priprema osnovnog rastvora je u skladu sa tačkom 1.7.2. ove metode.

Pomiješa se 10 ml osnovnog rastvora 1 sa 800 ml vode za razblaživanje, doda se 1 ml osnovnog rastvora 2 do 4 i dopuni do zapremine od 1 L sa vodom za razblaživanje.

5.2.3. Priprema i prekondicioniranje inokuluma

Inokulum se uzima iz raznih vrsta izvora: aktiviranog mulja, efluenta otpadnih voda, površinskih voda i zemljišta ili smješe istih.

Priprema i prekondicioniranje inokuluma je u skladu sa tačkama 1.7.4, 1.7.4.1, 1.7.4.2. i 1.7.5. ove metode.

5.2.4. Priprema običnog suda

Rastvori ispitivanih i referentnih hemikalija pripremaju se u odvojenim serijama, u mineralnoj podlozi ekvivalentno koncentraciji obično od 100 mg hemikalije/l (dajući najmanje 50 mg ThOD/ldo 100 mg ThOD/l), pomoću osnovnih rastvora.

ThOD se iizračunava na osnovu nagraĐenih soli amonijaka, osim u slučaju kad se očekuje nitrifikacija. Tada se iizračunavanje bazira na ssupstancaanju nitrata (dio 2.2. ove metode).

Odrede se pH vrijednosti i po potrebi svedu na vrijednosti od 7,4 ± 0,2.

Slabo rastvorljive supstance se dodaju u kasnijoj fazi.

Ako se određuje toksičnost ispitivane hemikalije, priprema se još jedan rastvor u mineralnoj podlozi koja sadrži i ispitivanu i referentnu hemikaliju u istim koncentracijama kao i pojedinačni rastvori.

Ako se mjeri fizičko-hemijska potrošnja kiseonika, priprema se rastvor ispitivane hemikalije u koncentraciji obično od 100 mg ThOD/l koja je prethodno bila sterilisana dodatkom odgovarajuće toksične supstance (dio 1.7.6. ove metode).

Potrebna zapremina svakog od rastvora ispitivane i referentne hemikalije sipa se u najmanje dva obična suda. U ostale obične sudove dodaje se samo mineralna podloga (za kontrolu inokuluma) i po potrebi, pomiješani rastvori ispitivane/referentne supstance i sterilni rastvor.

Ako je ispitivana supstanca slabo rastvorljiva, u ovoj fazi se ona dodaje direktno na osnovu mase ili zapremine, ili se obraĐuje na način iz odjeljka 3. ove metode. U odjeljke C.4-B apsorbera dodaju se kalijum-hidroksid, zrnca natrijum i kalcijum-hidroksida (kreč) ili drugi apsorbensi.

5.2.5. Broj običnih sudova u tipičnom ispitivanju

Redni broj običnih sudova:

- ispitivana suspenzija: obični sudovi br. 1 i 2; - slijepa proba sa inokulumom: obični sudovi br. 3 i 4; - kontrola postupka: običan sud broj 5.

Preporučeno i po potrebi:

- sterilna kontrola: običan sud broj 6;
- kontrola toksičnosti: običan sud broj 7.

Broj običnih sudova u tipičnom ispitivanju je u skladu sa tačkom 1.7.7. ove metode.

5.2.6. Postupak

Nakon što se u posudama postigne željena temperatura, u odgovarajuće posude se inokuliše pripremljeni aktivni mulj ili inokulum iz drugog izvora da se dobije koncentracija suspendovanih materija ne veća od 30 mg/l. Sastavi se oprema, pokrene miješalica, provjeri se izolacija vazduha i započne sa mjerenjem potrošnje kiseonika. Obično nije potreban dodatni oprez osim što se rade obavezna očitavanja i svakodnevno provjeravada je temperatura tačna i da miješalica radi.

Potrošnja kiseonika iizračunava se iz očitavanja obavljenih u redovnim i čestim intervalima, pomoću postupaka koje je dao proizvoĐač opreme. Na kraju inkubacije, obično od 28 dana, izmjeri se pH vrijednost sadržaja običnih sudova, posebno ako je potrošnja kiseonika niska ili veća od ThODNH4 (za jedinjenja koja sadrže azot).

Uzimaju se uzorci iz respirometrijskih običnih sudova, na početku i na kraju, za analizu DOC ili specifične hemikalije (dio 2.4. ove metode). Kad se prvi put uzimaju uzorci, poznata je zapremina test suspenzije koja je preostala u običnom sudu. Kad test supstanca koja sadrži azot troši kiseonik, određuje se porast koncentracije nitrita ili nitrata u toku 28 dana i izračuna se korekcija za kiseonik potrošen u nitrifikaciji (Dio V ove metode).

5.3. Podaci i izvještaj

5.3.1. Obrada rezultata

Kiseonik (mg) koji je potrošila ispitivana hemikalija u određenom vremenskom periodu (korigovan za onaj pomoću kontrole slijepe probe sa inokulumom u istom vremenskom periodu) podijeli se sa masom upotrijebljene ispitivane hemikalije. Time se dobije BPK izražen kao mg kiseonika po mg ispitivane hemikalije, to jest:

$$BPK = \frac{mg\,potrošnja\,O2\,ispitivane\,hemikalije - mg\,potrošnja\,O2\,slijepe\,probe}{mg\,ispitivane\,hemikalije\,u\,običnu\,sudu}$$ = mg O2 po ispitivanom mg hemikalije

Procenat biorazgradnje iizračunava se pomoću jednačine:

$$\%razgradnje = \%ThOD \frac{BPK(mgO^2/mg\,ispitivane\,hemikalije)}{ThOD(mgO_2/mg\,ispitivane\,hemikalije)}$$ 100ili jednačine:

$$\%HPK = \frac{BPK(mgO^2/mg\,ispitivane\,hemikalije)}{HPK(mgO_2/mg\,ispitivane\,hemikalije)}$$ 100

Ova dva postupka ne daju obavezno iste vrijednosti. Prednost se daje prvom postupku. Za ispitivanje supstanci koje sadrže azot, koristi se odgovarajući ThOD (NH_4 ili NO_3) u zavisnosti od toga šta se zna ili šta se očekuje u vezi sa pojavom nitrifikacije (dio 2.2. ove metode). Ako nastupi nitrifikacija, ali ne bude potpuna, izračuna se korekcija za kiseonik potrošen u nitrifikaciji iz promjena u koncentraciji nitrita i nitrata (Dio V ove metode). Kad se rade opciona određivanja organskog ugljenika, odnosno specifične hemikalije, procenat razgradnje se iizračunava na način iz dijela 1.8. ove metode.

Rezultati se zapisuju u obrasce za unos podataka.

5.3.2. Prihvatljivost rezultata

Potrošnja kiseonika slijepe probe sa inokulumom normalno iznosi 20 mg/lO_2 do 30 mg/l O_2 i nije veća od 60 mg/l u 28 dana. Ako su vrijednosti veće od 60 mg/l, kritički provjeriti podatke i ispitivane tehnike. Ako pH vrijednost izlazi izvan opsega od 6 do 8,5 i potrošnja kiseonika ispitivane hemikalije je manja od 60% kiseonika, ispitivanje se ponavlja sa nižim koncentracijama ispitivane hemikalije.

Prihvatljivost rezultata je u skladu sa tačkom 1.6.2. ove metode.

5.3.3. Izvještaj

Izvještaj je u skladu sa tačkom 1.9. ove metode.

5.4. Obrasci za unos podataka

Primjer obrasca za unos podataka:

MANOMETRIJSKA RESPIROMETRIJA

1. Laboratorijaa

2. Datum početka ispitivanja

3. Ispitivana supstanca

Hemijski naziv:

Koncentracija osnovnog rastvora:... mg/l

Početna koncentracija u podlozi, Co :... mg/l

Zapremina u običnom sudu (V):... ml

ThOD ili HPK:... mg O_2/... mg ispitivane supstance (NH_4 ili NO_3)

4. Inokulum

Izvor:

Sprovedena obrada:

Prekondicioniranje, ako je obavljeno:

Koncentracija suspendovanih materija u reakcionoj smesi:... mg/l **5. Potrošnja kiseonika: biorazgradljivost**

Vrijeme (u danima)		Vrijeme (u danima)											
		0		7		14			21			28	
Potrošnja O_2(mg) ispitivana hemikalija	1												
	2												
	a, srednja vrijednost												
Potrošnja O_2(mg) slijepa proba	3												
	4												
	b, srednja vrijednost												
Korigovani BPK	(a_1-b_m)												
	(a_2-b_m)												
BPK po mg test hemijalije	$\frac{a1\ b}{C_0V}$												
	$\frac{a2\ b}{C_0V}$												
% razgradnje $\frac{BPK}{ThOD}$ 100	$D_1(a_1)$												
	$D_2(a_2)$												
	Srednja vrijednost*												
V=zapremina podloge u običnom sudu													

* ne računa se srednja vrijednost ako postoji velika razlika između D_1 i D_2

Slični obrasci se koriste za referentnu hemikaliju i kontrolu toksičnosti.

6. Korekcija zbog nitrifikacije (Dio V ove metode)

Dan		0	28	razlika
(I)	Koncentracija nitrata (mg N/L)			(N)
(II)	Ekvivalent kiseonika (4,57 × N × V) (mg)	-	-	
(III)	Koncentracija nitrita (mg N/L)			(N)
(IV)	Ekvivalent kiseonika (3,43 × N × V) (mg)	-	-	
(II+IV)	Ukupni ekvivalent kiseonika	-	-	

7. Analiza ugljenika (po izboru) Analizator ugljenika:

Vrijeme (u danima)	Sijepa proba (mg/l)	Test hemikalija (mg/l)
0	Cbl0	C_0
28 (*)	C_{blt}	C_t
(*) ili na kraju inkubacije		

%uklonjenost DOC=□□□□1_____*CC0t CCblblt*0 □□□□□100

8. Specifična hemikalija (po izboru)

S_b = koncentracija u fizičko-hemijskoj (sterilnoj) kontroli 28. dana

S_a = koncentracija u inokulisanom običnom sudu 28. dana

%biorazgradnje= _____$S^{b\ Sa}$ □100gdje je: S_b koncentracija u fizičko-hemijskoj (sterilnoj) kontroli 28.

S_b

dana; S_a koncentracija u inokulisanom običnom sudu 28. dana **9. Abiotička razgradnja** (po

izboru)

potrošnja O_2 po mg ispitivane hemikalije = $\frac{a \square 100}{c_n V}$ (tačka 1. i 3.)

%abiotičke razgradnje= $\frac{a \square 100}{c_n V \square ThOD}$

gdje je a potrošnja kiseonika u sterilnom običnom sudu nakon 28 dana, (mg).

METODA ISPITIVANJA U ZATVORENOJ BOCI (METODA C.4-E)

6.1. Princip metode

Rastvor od 2 mg/l do 5 mg/l, ispitivane hemikalije u mineralnoj podlozi, inokuliše se sa relativno malim brojem mikroorganizama iz miješane populacije i čuva u potpuno punim, zatvorenim bocama u mraku na stalnoj temperaturi. Nakon razgradnje slijedi analiza rastvorenog kiseonika u toku 28 dana. Količina kiseonika koju veže ispitivana hemikalija, korigovana za kiseonik koji je potrošila uporedna slijepa proba sa inokulumom, izražava se kao procenat ThOD ili HPK. **6.2. Opis metode**

6.2.1. Oprema

Oprema za ispitivanje sadrži:

- BPK boce sa staklenim zasupstancaačima, npr. 250 ml do 300 ml;
- vodeno kupatilo ili inkubator, za čuvanje boca na stalnoj temperaturi (± 1 °C ili manje) bez svijezemljišta;
- velike staklene boce (od 2 L do 5 L) za pripremu podloge i za punjenje BPK boca;
- kiseoničnu elektrodu i merni instrument ili opremu i reagense za Vinklerovu titraciju (Winkler titration).

6.2.2. Priprema mineralne podloge

Priprema osnovnog rastvora je u skladu sa tačkom 1.7.2. ove metode. Pomiješa se 1 (jedan) ml osnovnog rastvora 1 do 4 i dopuni do zapremine od 1 L sa vodom za razblaživanje.

6.2.3. Priprema inokuluma

Inokulum se normalno dobija iz sekundarnih otpadnih voda postrojenja za prečišćavanje ili uređaja laboratorijaskog tipa koji prima uglavnom otpadnu vodu iz domaćinstava. Alternativni izvor inokuluma su površinske vode. Koristi se jedna kapljica (od 0,05 ml do 5,0 ml filtrata po litru podloge). Da bi se pronašla optimalna zapremina za određenu otpadnu vodu, ponekad je potrebno više pokušaja (tačke 1.7.4.2. i 1.7.5. ove metode).

6.2.4. Priprema običnih sudova

Mineralna podloga se temeljno aeriše u toku najmanje 20 minuta. Svaka ispitivana serija postavlja se sa mineralnom podlogom dobijenom iz iste serije. Podloga je spremna za upotrebu nakon što odstoji 20 sati, na ispitivanoj temperaturi. Odredi se koncentracija rastvorenog kiseonika zbog kontrole. Vrijednost koncentracije iznosi oko 9 mg/l na 20 °C. Prilikom prenosa i punjenja podloge zasićene vazduhom ne ssupstancaaju se mjehurići, što se postiže pomoću sifona.

Pripreme se paralelno grupe BPK boca za određivanje ispitivane i referentne hemikalije u uporednim serijama. Prikupi se dovoljan broj BPK boca, uključujući slijepe probe sa inokulumom, da se potrošnja kiseonika mjeri najmanje u duplikatu u željenim intervalima, npr. nakon 0, 7, 14, 21 i 28 dana. Da bi se identifikovao desetodnevni period, potrebno je više boca.

Velike boce se pune potpuno aerisanom mineralnom podlogom do jedne trećine zapremine. Zatim se sipa dovoljno osnovnog rastvora ispitivane hemikalije i referentne hemikalije u odvojene velike boce, tako da konačna koncentracija hemikalije nije veća od 10 mg/l. U

podlogu sa slijepom probom kao kontrolnom u narednoj velikoj boci ne dodaju se nikakve hemikalije.

Da bi se osiguralo da aktivnost inokuluma ne bude ograničena, koncentracija rastvorenog kiseonika ne pada ispod 0,5 mg/l u BPK bocama. Ovo ograničava koncentraciju ispitivane hemikalije na oko 2 mg/l. Za slabo razgradljiva jedinjenja i ona sa niskim ThOD, upotrijebljava se 5 mg/l do 10 mg/l. U nekim slučajevima, postaviti uporedne serije ispitivane hemikalije u dvije različite koncentracije, npr. od 2 mg/l do 5 mg/l. ThOD se računa na osnovu nagrađenih amonijevih soli, ali ako se očekuje ili se zna da postoji nitrifikacija, iizračunava se na osnovu stvorenih nitrata ($ThOD_{NO_3}$: dio 2.2. ove metode). Ako nitrifikacija nije potpuna, iako postoji, radi se korekcija za promjene u koncentraciji nitrita i nitrata, određena analizom (Dio V ove metode). Ako se određuje toksičnost ispitivane hemikalije (u slučaju, npr. da je prethodno utvrđena niska vrijednost biorazgradljivosti), potreban je još jedan niz boca.

Pripremi se još jedna velika boca i napuni aerisanom mineralnom podlogom (do otprilike jedne trećine zapremine boce) pa se u bocu dodaju ispitivana i referentna hemikalija u konačnim koncentracijama koje su iste kao i koncentracije u drugim velikim bocama.

Ovi rastvori se inokulišu u velike boce koje sadrže sekundarni efluent (jedna kapljica ili 0,05 ml/l do 5,0 ml/l) ili drugi izvor, kao što je rečna voda (tačka 1.7.4.2. ove metode). Na kraju se pripremaju rastvori sa aerisanom mineralnom podlogom pomoću gumene cijevi koja doseže do dna boce, da bi se postiglo odgovarajuće miješanje podloge i rastvora.

6.2.5. Broj običnih sudova u tipičnom ispitivanju

U tipičnom ispitivanju koristi se:

- najmanje 10 boca koje sadrže ispitivanu hemikaliju i inokulum (ispitivana suspenzija);
- najmanje 10 boca koje sadrže samo inokulum (slijepa proba sa inokulumom);
- najmanje 10 boca koje sadrže referentnu hemikaliju i inokulum (kontrola postupka);
- i po potrebi, 6 boca koje sadrže ispitivanu hemikaliju, referentnu hemikaliju i inokulum (kontrola toksičnosti). Da bi se desetodnevni period mogao sa sigurnošću identifikovati, potrebno je najmanje dvostruko više boca.

6.2.6. Postupak

Pojedinačni pripremljeni rastvori iz donje četvrtine (ne sa dna) odgovarajuće velike boce odmah se raspodjele pomoću cijevi u odgovarajući niz BPK boca, tako da sve BPK boce budu potpuno pune. Nežnim kuckanjem po zidu boce uklone se mogući mjehurići vazduha. Odmah se u nultom vremenu radi analiza rastvorenog kiseonika u BPK bocama pomoću Vinklerove metode ili elektroda. Sadržaj boca se čuva za kasniju analizu Vinklerovom metodom dodavanjem mangan(II)sulfata i natrijum-hidroksida (prvi Vinklerov reagens). Boce se čuvaju dobro zatvorene, jer je prisutan kiseonik fiksiran u obliku smeđeg mangan(III)-hidroksida, u mraku na temperaturi od 10 °C do 20 °C ne duže od 24 sata prije nastavka sa preostalim koracima Vinklerove metode. Zasupstancaačem se zatvore preostali duplikati boca (pazi se da u bocama ne ostanu mjehurići vazduha) i inkubiraju se na 20 °C u mraku. Uz svaku seriju postoji potpuno uporedna serija za određivanje podloge inokulirane slijepom probom. Za potrebe analize uzimaju se najmanje po dvije boce iz iste serije zbog analize rastvorenog kiseonika u određenim vremenskim intervalima (najmanje jedanput nedeljno) u toku 28 dana inkubacije.

Nedeljni uzorci omogućavaju predviđanje procenta uklanjanja u razdoblju od 14 dana. Uzimanje uzoraka svaka 3 do 4 dana omogućava identifikaciju perioda od 10 dana, za što je potrebno dvostruko više boca.

Za ispitivane supstance koje sadrže azot, prave se korekcije za potrošnju kiseonika zbog moguće nitrifikacije. Prvo se koristi metoda O_2-elektrode da bi se odredila koncentracija rastvorenog kiseonika, a zatim se izvlači uzorak iz BPK boce za analizu na nitrate i nitrite. Iz povećanja u koncentraciji nitrata i nitrita, izračuna se potrošeni kiseonik (Dio V ove metode).

6.3. Podaci i izvještaj

6.3.1. Obrada rezultata

Prvo se izračuna BPK nakon svakog vremenskog intervala tako što se oduzme vrijednost pada kiseonika (mg O_2/l) iz slijepe probe sa inokulumom od one koju je pokazala ispitivana hemikalija. Korigovani pad kiseonika podijeli se sa koncentracijom (mg/l) ispitivane hemikalije, da se dobije specifični BPK kao mg kiseonika po mg ispitivane hemikalije. Izračuna se procenat biološke razgradljivosti dijeljenjem specifičnog BPK sa specifičnim ThOD (izračunati u skladu sa odjeljkom 2.2. ove metode) ili HPK (određeno analizom, dio 2.3. ove metode), pa je:

$$\text{BPK} = \frac{mg\,potrošnja\,O2\,ispitivane\,hemikalije - mg\,potrošnja\,O2\,slijepe\,probe}{mg\,ispitivane\,hemikalije\,u\,obič\,eu\,o\,sudu} = \text{mg O2 po ispitivanom mg hemikalije}$$

ili

$$\%\text{razgradnje} = \%\text{ThOD}\,\frac{BPK\,(mgO^2/mg\,ispitivane\,hemikalije)}{ThOD\,(mgO_2/mg\,ispitivane\,hemikalije)}\,100$$

ili:

$$\%\text{HPK} = \frac{BPK\,(mgO^2/mg\,ispitivane\,hemikalije)}{HPK\,(mgO_2/mg\,ispitivane\,hemikalije)}\,100$$

Ova dva postupka ne daju obavezno iste vrijednosti. Prednost se daje prvom postupku. Za ispitivane supstance koje sadrže azot, koristi se odgovarajući ThOD (NH_4 ili NO_3) prema onome što se zna ili očekuje u pogledu pojave nitrifikacije (dio 2.2. ove metode). Ako je nitrifikacija prisutna, ali nije potpuna, izračuna se korekcija za kiseonik potrošen nitrifikacijom iz promjena u koncentraciji nitrita i nitrata (DioV ove metode).

6.3.2. Prihvatljivost rezultata

Pad kiseonika u slijepoj probi sa inokulumom nije viši od 1,5 mg rastvorenog kiseonika po litru nakon 28 dana. Vrijednosti veće od ove zahtijevaju provjeru eksperimentalnih tehnika. Rezidualna koncentracija kiseonika u ispitivanim bocama ne spušta se na vrijednosti niže od 0,5 mg/l ni u jednom trenutku. Tako niski nivoi kiseonika prihvatljivi su samo ako se postupkom koji se koristi za određivanje rastvorenog kiseonika mjere takve koncentracije.

Prihvatljivost rezultata je u skladu sa tačkom 1.6.2. ove metode.

6.3.3. Izvještaj

Izvještaj je u skladu sa tačkom 1.9. ove metode.

6.4. Obrazac za unos podataka

Primjer obrasca za unos podataka:

METODA ISPITIVANJA U ZATVORENOJ BOCI

1. Laboratorijaa

2. Datum početka ispitivanja

3. Ispitivana supstanca

Hemijski naziv:

Koncentracija osnovnog rastvora:... mg/l

Početna koncentracija u boci:... mg/l

ThOD ili HPK:... mg O_2 /... mg ispitivane supstance

4. Inokulum

Izvor:

Obavljena obrada:

Prekondicioniranje, ako ga je bilo:

Koncentracija u reakcionoj smesi:... mg/l

5. Određivanje do

Postupak: Vinkler/elektroda

Analize običnih sudova

Vrijeme inkubacije (u danima)			DO(mg/l)			
			0	N1	N2	
Slijepa proba (bez hemikalija)	1	c_1				
	2	c_2				

Srednja vrijednost	$mb = \frac{C1\ C2}{2}$					
Ispitivana hemikalja	1	a_1				
	2	a_2				
Srednja vrijednost	$Mr = \frac{a1\ a2}{2}$					

Sličan obrazac se koristi za referentno jedinjenje i kontrolu toksičnosti.

6. Korekcija zbog nitrifikacije (Dio V ove metode)

Vrijeme inkubacije (u danima)		0	n_1	n_2	n_3
(I)	Koncentracija nitrata (mg N/l)				
(II)	Promjena u koncentraciji nitrata (mg N/l)	-			
(III)	Ekvivalent kiseonika (mg/l)	-			
(IV)	Koncentracija nitrita (mg N/l)				
(V)	Promejna u koncentraciji nitrita (mg N/l)	-			
(VI)	Ekvivalent kiseonika (mg/l)	-			
(III+VI)	Ukupni ekvivalent kiseonika (mg/l)	-			

7. Pad koncentracije rastvorenog kiseonika (do): procenat razgradnje

	Pad nakon n dana (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
Običan sud 1: $(mt_0-mt_x)-(mb_0-mb_x)$				
Običan sud 2: $(mt_0-mt_x)-(mb_0-mb_x)$				
Običan sud 1: $\%D1 = \frac{mt\ 0\ mtx\ mbo\ mbx \cdot 100}{konc.ispit. \cdot ThODhemikalije}$				
Običan sud 2: $\%D2 = \frac{mt\ 0\ mtx\ mbo\ mbx \cdot 100}{konc.ispit. \cdot ThODhemikalije}$ Srednja vrijednost $\%D^* = \frac{D^1\ D^2}{2}$				
* Srednja vrijednost se ne koristi ako su postajale velike razlike između dva mjerenja				

Gdje je: mt_0 vrijednost u običnom sudu u vremenu 0; mt_x vijrednost u običnom sudu u vremenu x; mb_0 srednja vrijednost slijepe probe u vremenu 0; mb_x srednja vrijednost slijepe probe u vremenu x.

Primjenjuje se korekcija zbog nitrifikacije u tački 6 (III + VI).

8. Pad koncentracije rastvorenog kiseonika (do) slijepe probe

Potrošnja kiseonika slijepe probe: (m_{bo} - m_{b28}) mg/l. Ova potrošnja je važna za prihvatljivost ispitivanja i niža je od 1,5 mg/l.

7. MITI ISPITIVANJE (METODA C.4-F)

7.1. Princip metode

Kiseonik koji potroše miješani rastvor ili suspenzija, ispitivana hemikalija u mineralnoj podlozi, inokulisana sa specijalno uzgojenim, neprilagođenim mikroorganizmima, mjeri se automatski u toku 28 dana u zamračenom zatvorenom respirometru na temperaturi od 25 °C ± 1 °C. Ugljendioksid koji se razvije apsorbuje kreč. Biorazgradljivost se izražava kao procenat potrošnje kiseonika (korigovan za potrošnju kiseonika slijepe probe) teoretske potrošnje (u daljem tekstu: ThOD). Procenat primarne biološke razgradljivosti iizračunava seiz dodatne specifične hemijske analize urađene na početku i kraju inkubacije i opciono, DOC analizom.

7.2. Opis metode

7.2.1. Oprema

Oprema za ispitivanje sadrži:

- automatski elektrolitski BPK mjerač ili respirometar obično opremljen sa 6 boca, svaka zapremine od 300 ml i sa posudicama koje sadrže apsorbent za ugljen-dioksid;
- stalnu sobnu temperaturu, odnosno vodeno kupatilo temperature 25 °C ± 1 °C ili manje; - sistem za membransku filtraciju (nije obavezan); - uređaj za analizu ugljenika (nije obavezan).

7.2.2. Priprema mineralne podloge

Pripreme se sljedeći osnovni rastvori, pomoću analitičkih reagenasa i vode (dio 1.7.1. ove metode):

1. rastvoriti u vodi i dopuniti do 1 L (pH rastvora mora biti 7,2):
   - 8,50 g KH_2PO_4 (kalijum-dihidrogenfosfat);
   - 21,75 g K_2HPO_4 (dikalijum-hidrogenfosfat);
   - 44,60 g $Na_2HPO_4x12H_2O$ (dinatrijum-hidrogenfosfat dodekahidrat); - 1,70 g NH_4Cl (amonijum-hlorid);
2. rastvoriti u vodi i dopuniti do 1 L:
   - 22,50 g $MgSO_4x7H_2O$ (magnezijum-sulfat heptahidrat);
3. rastvoriti u vodi i dopuniti do 1 L:
   - 27,50 g $CaCl_2$ (kalcijum-hlorid, bezvodni);
4. rastvoriti u vodi i dopuniti do 1 L:
   - 0,25 g $FeCl_3x6H_2O$ (gvožđe(III)-hlorid heksahidrat).

Uzme se 3 ml osnovnog rastvora 1, 2, 3. i 4. i dopuni do 1 L. Uzmu se svježi uzorci iz najmanje 10 različitih mjesta, uglavnom u područjima u kojima se koriste i u koja se ispuštaju razne hemikalije. Sa lokacija, kao što su postrojenja za prečišćavanje otpadne vode iz domaćinstava, za obradu industrijske otpadnih voda, rijeka, jezera, mora, prikupi se 11 uzoraka mulja, površinskog zemljišta, vode, itd. i sve zajedno temeljno se promiješa. Nakon uklanjanja plutajućih materija i nakon slijeganja, supernatant se svede na pH (7 ± 1) pomoću natrijum hidroksida i fosforne kiseline.

Koristi se odgovarajuća zapremina filtriranog supernatanta da se napuni posuda za punjenje i izvlačenje aktivnog mulja, a tečnost se aeriše u toku otprilike 23 1/2 sata. Trideset minuta nakon aeracije, baci se oko jedne trećine ukupne zapremine supernatanta i istaloženom materijalu doda jednaka zapremina rastvora (pH 7) koji sadrži 0,1% glukoze, peptona i kalijum ortofosfata i ponovo aeriše. Ovaj postupak se ponavlja jedanput dnevno. Jedinicom za mulj se upravlja u skladu sa dobrom praksom: otpadna voda je bistra, temperatura se održava na 25 °C ± 2°C, pH je 7 ± 1, mulj se dobro taloži, aeracija je dobra tako da smješa bude stalno u aerobnim uslovima, prisutne su protozoe, a aktivnost mulja se ispita pomoću referentnih supstanci najmanje jednom u tri mjeseca. Mulj se obraĐuje na ovakav način najmanje mesec dana prije nego što se može iskoristiti kao inokulum, ali ne duže od četiri mjeseca. Nakon toga, uzima se uzorak iz najmanje 10 mjesta u redovnim razmacima, jednom svaka tri mjeseca.

Da bi se održala ista aktivnost svježeg i starog mulja, filtrirani supernatant aktivnog mulja koji se koristi pomiješa se sa jednakom zapreminom filtriranog supernatanta svježe smješe prikupljene sa 10 različitih izvora i tako kombinovana tečnost održava se u kulturi, kako je opisano. Mulj se koristi kao inokulum 18 do 24 sata nakon što je jedinica napunjena.

7.2.3. Priprema inokuluma

7.2.4. Priprema običnih sudova

Pripremi se 6 običnih sudova:

- 100 mg/l ispitivane hemikalija u vodi za razblaživanje: običan sud br. 1;
- 100 mg/l ispitivana hemikalija u mineralnoj podlozi: običan sud br. 2,3 i 4; - 100 mg/l referentne hemikalije (npr. anilin) u mineralnoj podlozi: običan sud br. 5; - samo mineralna podloga: običan sud br. 6.

Slabo rastvorljiva ispitivana hemikalija dodaje se direktno na bazi mase ili zapremine ili na način kako je opisano u Dijelu III ove metode, osim što se ne koriste ni rassupstancaači ni emulgatori. U sve obične sudove doda se apsorbens C.4-B u ponuĐenim specijalnim posudicama. U običnim sudovima br. 2, 3 i 4 pH vrijednost se svede na 7,0.

7.2.5. IzvoĐenje

Malom zapreminom inokuluma inokuliraju se obični sudovi br. 2, 3 i 4 (ispitivana suspenzija), broj 5 (kontrola aktivnosti) i broj 6 (slijepa proba sa inokulumom) da se dobije koncentracija od 30 mg/l suspendovanih materija. Inokulum se ne dodaje u tikvicu broj 1, koja služi kao abiotička kontrola. Poveže se oprema i provjeri da nema dotoka vazduha, pokrenu se miješalice i započne sa mjerenjem potrošnje kiseonika u mraku. Svakodnevno se provjerava temperatura, rad miješalice i kulometrijski uređaj za zapisivanje potrošnje kiseonika i zapisuje se svaka promjena u boji sadržaja običnih sudova. Potrošnja kiseonika u šest običnih sudova očitava se direktno odgovarajućim postupkom, npr. iz zapisa šesto-kanalnog čitača koji proizvodi BPK krivu. Na kraju inkubacije, obično nakon 28 dana, mjeri se pH

sadržaj običnih sudova i određuje koncentracija rezidualne ispitivane hemikalije i svake koncentracije koja nastane u meĐuvremenu, a u slučaju supstanci rastvorljivih u vodi, i koncentracija DOC (dio 2.4. ove metode). Posvetiti pažnju nedugotrajnim hemijskim supstancama. Ako se očekuje nitrifikacija odrediti koncentraciju nitrata i nitrita.

7.3. Podaci i izvještaj

7.3.1. Obrada rezultata

Potrošnja kiseonika (mg) ispitivane hemikalije u toku određenog vremena, korigovana za vrijednost potrošnje kiseonika u kontrolnoj slijepoj probi sa inokulumom za to isto vrijeme, podijeli se sa masom upotrijebljene ispitivane hemikalije. Ovo daje BPK izražen kao mg kiseonika:

$$\text{BPK} = \frac{mgpotrošnjaO2ispitivanehemikalijemgpotrošnjaO_2slijepepro^{be}}{mgispitivanehemikalijeuobičeuo\ sudu}$$

Procenat biorazgradnje se zatim iizračunava prema formuli:

$$\%\text{razgradnje} = \%\text{ThOD}\ \frac{BPK(mgO^2/mgispitivanehemikalije)\ \ 100}{ThOD(mgO_2/mgispitivanehemikalije)}$$

Za smješe, izračuna se ThOD iz elementarne analize, kao za jednostavna jedinjenja. Koristi se odgovarajuća ThOD (ThODNH_4 ili ThODNO_3) u zavisnosti od toga da li nitrifikacija ne postoji ili je nepotpuna (tačka 2.2. ove metode). Ako nitrifikacija postoji, čak i samo delimična, radi se korekcija za kiseonik potrošen nitrifikacijom koji se izračuna iz promjena u koncentracijama nitrita i nitrata (Dio V ove metode).

Procenat primarne biorazgradnje iizračunava se na osnovu gubitka početne hemikalije (dio 1.8.2.
ove metode):

$$D1 = \frac{Sb\ Sa}{S_b}\ 100$$

Ako se prilikom mjerenja fizičko-hemijskog uklanjanja izgubio dio ispitivane hemikalije u običnom sudu broj 1, to se navodi, a za iizračunavanje procenta biorazgradnje koristi se koncentracija ispitivane hemikalije (Sb) u ovom običnom sudu nakon 28 dana. Kad se odredi DOC (opciono), procenat potpune biorazgradnje računa se prema formuli:

$$D1 = \square\square\square\square 1 \frac{CC01\ CCbb10}{} \square\square\square\square\square 100$$

Kao što je opisano u tački 1.8.1. ove metode ako postoji gubitak DOC u običnom sudu 1, mjerenjem fizičko-hemijskog uklanjanja, za iizračunavanje procenta biorazgradnje koristi se koncentracija DOC u ovom običnom sudu. Rezultati se upisuju u obrasce za unos podataka.

7.3.2. Prihvatljivost rezultata

Potrošnja kiseonika u slijepoj probi sa inokulumom je 20 mg/lO_2 do 30 mg/l O_2 i nije veća od 60 mg/lO_2 u 28 dana. Vrijednosti veće od 60 mg/lO_2 zahtijevaju kritičko preispitivanje podataka i procedura ispitivanja. Ako pH vrijednost izlazi izvan opsega od 6 do 8,5 i potrošnja kiseonika ispitivane hemikalije je manja od 60%, ispitivanje se ponavlja uz niže koncentracije ispitivane hemikalije. Prihvatljivost rezultata je u skladu sa tačkom 1.7.2. ove metode.

Ako procenat razgradnje aninila dobijen iz potrošnje kiseonika ne prelazi 40% nakon 7 dana i 65% nakon 14 dana, rezultati ispitivanja nisu prihvatljivi.

7.3.3. Izvještaj

Izvještaj je u skladu sa tačkom 1.9. ove metode.

7.4. Obrazac za unos podataka

Primjer obrasca za unos podataka:

METODA ISPITIVANJA: MITI (I)

1. Laboratorijaa

2. Datum početka ispitivanja

3. Ispitivana supstanca

Hemijski naziv:

Koncentracija osnovnog rastvora: … mg/l kao hemikalija

Početna koncentracija u podlozi, C_0:... mg/l kao hemikalija

Zapremina reakcione smješe, V:... ml

ThOD:... mg/l O_2

4. Inokulum

Mjesta uzimanja uzoraka mulja:

1)...,

2)...,

3)...,

4)...,

5)...,

6)...,

7)...,

8)...,

9)...,

10)...,

Koncentracija suspendovanih materija u aktivnom mulju nakon aklimatizacije sa sintetičkom otpadnom vodom =... mg/l

Zapremina aktivnog mulja po litru gotove podloge =... ml

Koncentracija mulja u gotovoj podlozi =... mg/l

5. Potrošnja kiseonika: biorazgradljivost

Vrsta upotrijebljenog respirometra:

			Vrijeme (u danima)				
			0	7	14	21	28
Potrošnja O_2(mg) ispitivane hemikalije	a_1						
	a_2						
	a_3						
Potrošnja O_2(mg) slijepe probe	b						
Korigovana BPK	(a_1-b) (a_2-b) (a_3-b)						
BPK po mg isptivane hemikalije	$\frac{a\ b}{CV}$	Običan sud 1					
		Običan sud 2					
		Običan sud 3					
%razgradnje $\frac{BPK}{ThOD} \cdot 100$		1					
		2					
		3					
		Srednja vrijednost*					
*srednja vrijednost se ne koristi ako postoje znatne razlike između dva mjerenja							

Slični obrasci se koriste za referentnu supstancu.

6. Analiza ugljenika (nije obavezno)

Analizator ugljenika

Običan sud	DOC				% uklonjenog DOC	Srednja vrijednost
	izmjereno		korigovano			
Voda + ispitivana supstanca	a				-	-
Mulj + ispitivana supstanca	b_1		b_1 - c			
Mulj + ispitivana supstanca	b_2		b_2 - c			
Mulj + ispitivana supstanca	b_3		b_3 - c			
Kontrola slijepom probom	c		-		-	-

% uklonjenog DOC =	$\frac{a_1 - (b-c)}{}$ x 100

7. Podaci specifične hemijske analize

	Rezidualna količina ispitivane supstance na kraju ispitivanja (mg/l)	% razgradnje
Ispitivanje slijepe probe sa vodom	S_b	
Inokulisana ispitivana podloga	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\%\text{razgradnje} = \frac{S^{b\ Sa}}{S_b} \square 100$$

Iizračunava se procenat razgradnje za obične sudove a_1, a_2 i a_3.

8. Napomene

Ako je moguće priložiti BPK krivu u funkciji vremena.

IIZRAČUNAVANJE I ODREĐIVANJE ODGOVARAJUĆIH UKUPNIH PARAMETARA
DIO II

1. Sadržaj ugljenika

Sadržaj ugljenika iizračunava se iz poznatog sastava elemenata ili elemenata određenih analizom ispitivane supstance.

2. Teorijska potrošnja kiseonika (ThOD)

Teorijska potrošnja kiseonika (u daljem tekstu: ThOD) se iizračunava ako je sastav elemenata poznat ili određen analizom elemenata. To je za jedinjenje: $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ bez nitrifikacije,

$$16 \square 2c^{\ 1} hcl\ 3n3s^{\ 5} p^{\ 1} na\ o \square$$

ThODNO3 □ 2 MW 2 2 □□□mgmg□□□ ili sa nitrifikacijom

□

16□ □2c 1 hcl3s 5 n 5 p 1 na o□ □ —

ThODNO3 □ 2 2 2 2 □□□mgmg□□□

MW □

3. Hemijska potrošnja kiseonika (hpk)

Hemijska potrošnja kiseonika (u daljem tekstu: HPK) određuje se prema Metodi C.6. koja je data u ovom prilogu.

4. Rastvoreni organski ugljenik (doc)

Rastvoreni organski ugljenik (u daljem tekstu: DOC) je organski ugljenik bilo koje hemikalije ili smješe u vodi koji prolazi kroz filter prečnika 0,45 µ.

Izvuku se uzorci iz posuda za ispitivanje i filtriraju u filtracijskom uređaju koji koristi odgovarajući membranski filter. Prvih 20 ml (količina se smanjuje kad se koriste mali filteri) filtrata se bacaju. Zapremine od 10 ml do 20 ml ili manje, ako se injektiraju (zapremina zavisi od količine koja je potrebna za analizator ugljenika) zadržavaju se zbog analize ugljenika. Koncentracija DOC određuje se pomoću analizatora organskog ugljenika koji tačno mjeri koncentraciju ugljenika koja je jednaka ili niža od 10% početne koncentracije DOC korišćene u ispitivanju.

Filtrirani uzorci koji se ne analiyiraju istog dana se čuvaju u frižideru na temperaturi od 2°C do 4 °C u toku 48 sata ili na temperaturi ispod -18 °C u toku dužeg perioda.

Membranski filteri su često impregnirani površinski aktivnim materijama za hidrofilizaciju. Zato filter sadrži do nekoliko mg rastvorenog organskog ugljenika koji utiče na određivanje biorazgradljivosti. Površinski aktivne materije i druga rastvorljiva organska jedinjenja uklanjaju se iz filtera kuvanjem filtera u dejonizovanoj vodi tri puta po sat vremena. Filteri se čuvaju u vodi nedelju dana. Ako se koriste jednokratna punjenja filtera, svako punjenje se provjerava da bi se potvrdilo da ne otpušta rastvorljivi organski ugljenik.

Membranski filter, zavisno od tipa, usled adsorpcije zadržava test supstancu. Provjeriti da li filter zadržava ispitivanu hemikaliju.

Centrifugiranje na 40.000 m/s^2 (4.000 g) u toku 15 minuta se koristi umjesto filtracije za razlikovanje TOC od DOC. Postupak nije pouzdan pri početnim koncentracijama manjim od 10 mg DOC/l, s obzirom na to dali su ili nisu uklonjene sve bakterije ili se ugljenik kao dio bakterijske plazme ponovno rastvorio.

PROCJENA BIOLOŠKE RAZGRADLJIVOSTI SLABO RASTVORLJIVIH SUPSTANCI DIO III

U ispitivanju biorazgradnje slabo rastvorljivih supstanci, posvetiti pažnju sljedećim aspektima:

Dok su homogene tečnosti rijetko problem za uzimanje uzoraka, čvrste supstance su homogenizovane odgovarajućim sredstvima kako bi se izbjegle greške usled nehomogenosti. Potrebni su reprezentativni uzorci od nekoliko miligrama iz smješe hemikalija ili supstanci sa velikom količinom nečistoća.

Tokom ispitivanja se koriste različiti oblici miješanja. Hemikalija se miješa tek toliko da ostane dispergovana. Pregrijavanje, prekodnosno stvaranje pjene i pretjerane vučne sile se izbjegavaju.

Koristi se emulgator koji omogućava stabilnu disperziju hemikalije. Emulgator nije toksičan za bakterije i nije biorazgradljiv ili da uzrokuje stvaranje pjene u ispitivanim uslovima.

Na rassupstancaače se primjenjuju isti kriterijumi kao i na emulgatore.

Ne koriste se čvrsti nosači za ispitivane čvrste supstance, ali oni mogu biti pogodni samo za supstance.

Kad se koriste pomoćne supstance kao što su emulgatori, rassupstancaači i nosači, ispita se posuda sa slijepom probom koja sadrži te pomoćne supstance.

Za ispitivanje biorazgradljivosti slabo rastvorljivih jedinjenja koristi se bilo koji od tri respirometrijska ispitivanja: C.4-B, BPK, MITI.

PROCJENA BIORAZGRADLJIVOSTI HEMIKALIJA ZA KOJE SE SUMNJA DA SU TOKSIČNE

ZA INOKULUM
DIO IV

Kad se ispitivana hemikalija podvrgne ispitivanju biorazgradljivosti i pokaže se da nije brzo biorazgradljiva, sljedeći postupak je za utvrĐivanje razlika između inibicije i inercije[1]:

Za ispitivanja toksičnosti i biorazgradnje, koristiti slične ili identične inokulume.

Da bi se ispitivanjem brze biorazgradljivosti procjenila toksičnost hemikalije, primjenjuje se jedan ili kombinacija postupaka za utvrĐivanje inhibicije stepena respiracije mulja (ispitivanje inhibicije respiracije aktivnog mulja, literatura[2)], BPK, odnosno postupaka za utvrĐivanje inhibicije rasta.

Ako se izbjegava inhibicija izazvana toksičnošću, koncentracije ispitivane supstance koja se koristi u ispitivanju brze biološke razgradljivosti su manje od 1/10 EC_{50} vrijednosti (ili manje od EC_{20} vrijednosti) koja se dobije ispitivanjem toksičnosti. Jedinjenja sa EC_{50} vrijednošću većom od 300 mg/l nemaju toksične efekte u ispitivanju brze biorazgradljivosti.

EC_{50} vrijednosti manje od 20 mg/l predstavljaju ozbiljne probleme za dalje testove. Koriste se niske ispitivane koncentracije, zbog čega se koristi stroga i osjetljiva metoda ispitivanja u zatvorenoj boci ili materijal označen izotopom ugljenika C^{14}. Alternativno, ako se radi sa aklimatizovanim inokulumom, koriste se više koncentracije ispitivane supstance. U tom slučaju, gubi se specifični kriterijum metode ispitivanja brze biološke razgradljivosti.

KOREKCIJA POTROŠNJE KISEONIKA ZBOG UTICAJA NITRIFIKACIJE
DIO V

Greške zbog propusta da se uračuna nitrifikacija u procjenu biorazgradljivosti ispitivane supstance koja ne sadrži N na osnovu potrošnje kiseonika su marginalne (ne veće od 5%), čak i ako je pojava oksidacije amonijačnog azota u podlozi nepravilna, kao između posuda za ispitivanje i posuda sa slijepom probom. Kad ispitivane supstance sadrže N, javljaju se greške.

Ako je došlo do nitrifikacije, ali ona nije potpuna, opažena potrošnja kiseonika reakcione smješe se koriguje za količinu kiseonika potrošenog u oksidaciji amonijaka na nitrite i nitrate, ako se promjene u koncentraciji u toku inkubacije nitrita i nitrata određuju pomoću jednačina:

$2NH_4Cl+3O_2 = {}_2HNO_2 + 2HCl + 2H_2O$ [1]

$2HNO_2 + O_2 = 2HNO_3$ [2]

Ukupno: $2NH_4Cl + 4O_2 = 2HNO_3 + 2HCl + 2H_2O$ [3]

Iz jednačine [1] vidi se da 28 g azota iz amonijum hlorida (NH_4Cl) potroši 96 g kiseonika u toku oksidacije do nitrita, odnosno faktor je 3,43 (96/28). Na isti način, iz jednačine (3) vidi se da 28 g azota potroši 128 g kiseonika u toku oksidacije do nitrata, odnosno faktor je 4,57 (128/28). S obzirom da su reakcije sekvencijalne, a za njih su zaslužne različite bakterijske vrste, koncentracija nitrita se povaćava ili smanjuje. Dakle: O_2 potrošen u ssupstancaanju nitrata = 4,57 x povećanje koncentracije nitrata [4] i O_2 potrošen u ssupstancaanju nitrita = 3,43 x povećanje koncentracije nitrata [5] i gubitak O_2 zbog gubljenja nitrita = -3,43 x smanjenje koncentracije nitrata [6] tako da je:
O_2 potrošnja zbog nitrifikacije = ±3,43 x promjena konc. nitrita + 4,57 x
povećanje koncentracije nitrata [7] i stoga je: O_2 potrošnja zbog C oksidacije = ukupna opažena potrošnja zbog nitrifikacije [8].

Alternativno, ako se određuje samo ukupni oksidovani N, prihvata se da je potrošnja kiseonika zbog nitrifikacije, kao prva aproksimacija, 4,57 puta povećanje u oksidovanom N.

Korigovana vrijednost za potrošnju kiseonika zbog C oksidacije se onda poredi sa $ThODNH_3$, kao što je izračunato u Dijelu II ove metode.

C.5. RAZGRADNJA - BIOHEMIJSKA POTROŠNJA KISEONIKA

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

Motoda razgradnje biohemijske potrošnje kiseonika je mjerenje biohemijske potrošnje kiseonika (u daljem tekstu: BPK) za čvrste i tečne organske supstance.

Podaci dobijeni u ovom ispitivanju odnose se na jedinjenja rastvorljiva u vodi. Ispituju se i jedinjenja koja su isparljiva, kao i jedinjenja koja su slabo rastvorljiva u vodi.

Metoda se primjenjuje samo za one organske supstance koje ne Dijeluju inhibitorno na bakterije u koncentracijama koje se koriste u ispitivanju. Ako ispitivana supstanca nije rastvorljiva u izabranim koncentracijama, dodatne mjere (kao što je ultrazvučna disperzija) se koriste kako bi se postigla dobra disperzija ispitivane supstance.

Podaci o toksičnosti ispitivane supstance su korisni pri tumačenju rezultata ispitivanja gdje su dobijene male vrijednosti za BPK, a pomažu i u izboru odgovarajućih koncentracija za ispitivanje date supstance.

1.2. Definicije i mjerne jedinice

Biohemijska potrošnja kiseonika (BPK) je masa rastvorenog kiseonika potrebna za proces biohemijske oksidacije u specifičnoj zapremini rastvora ispitivane supstance pod uslovima definisanim za ovo ispitivanje, rezultati se izražavaju u gramima kao g BPK/g ispitivane supstance.

1.3. Referentne supstance

Koristiti adekvatne referentne supstance da bi se provjerila aktivnost inokuluma.

1.4. Princip metode

Unaprijed određena količina ispitivane supstance, koja je rastvorena ili dispergovana u dobro aerisanom medijumumu, inokulira se sa mikroorganizmima i inkubira na tačno određenoj konstantnoj temperaturi u odsustvu svijetlosti.

BPK se određuje kao razlika sadržaja rastvorenog kiseonika na početku i na kraju ispitivanja. Ispitivanje traje najmanje pet dana, ali ne duže od 28 dana.

Kao slijepu probu koristiti rezultate naporednog ispitivanja bez prisustva ispitivane supstance.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Određivanje BPK nije validna mjera biorazgradljivosti ispitivane supstance. Ovo ispitivanje se posmatra samo kao skrining test.

1.6. Opis metode

Preliminarni rastvor ili disperzija pripremaju se tako da se postigne odgovarajuća koncentracija BPK kompatibilna sa metodom koja se koristi. BPK se zatim određuje primjenom bilo koje odgovarajuće standardizovane metode.

2. Podaci i procjena

BPK za preliminarni rastvor ispitivane supstance iizračunava se prema izabranoj standardizovanoj metodi i izražava se u gramima BPK po gramu ispitivane supstance.

3. Izvještaj

U izvještaju o ispitivanju navodi se koja metoda je korišćena u ispitivanju.

Vrijednost BPK predstavlja srednju vrijednost za najmanje tri validna mjerenja.

Navode se i svi podaci i napomene relevantne za tumačenje rezultata, a posebno podaci koji su u vezi sa nečistoćama, fizičkim karakteristikama, toksičnim efektom i sastavom ispitivane supstance.

U izvještaju se navodi i upotreba aditiva koji se koriste radi sprječavanja biološke nitrifikacije.

C.6. RAZGRADNJA - HEMIJSKA POTROŠNJA KISEONIKA

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

Metoda razgradnje (hemijska potrošnja kiseonika) je mjerenje hemijske potrošnje kiseonika (u daljem tekstu: HPK) za čvrste i tečne organske supstance, u tačno definisanim laboratorijaskim uslovima.

Poznavanje hemijske formule supstance korisno je za izvoĐenje metode ispitivanja kao i za tumačenje dobijenih rezultata (npr. soli halogenih elemenata, organske soli gvožĐa, organohlorna jedinjenja).

1.2. Definicije i merne jedinice

Hemijska potrošnja kiseonika (HPK) je mjera sposobnosti neke supstance da bude oksidovana, a izražava se kao ekvivalentna količina kiseonika oksidujućeg sredstva koja je potrebna za oksidaciju supstance u tačno definisanim laboratorijaskim uslovima, rezultat se izražava u gramima, kao g HPK/g ispitivane supstance.

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance se ne koriste u svim slučajevima prilikom testiranja novih supstanci.
Referentne supstance služe prvenstveno za periodičnu kalibraciju metode i omogućavaju poređenje rezultata ukoliko se primjenjuje neka druga metoda.

1.4. Princip metode

Unaprijed određena količina ispitivane supstance koja je rastvorena ili dispergovana u vodi, se oksiduje sa kalijum dihromatom u medijumumu zakiseljenom sa sumpornom kiselinom i sa srebrosulfatom kao katalizatorom, pod refluksom u toku 2 sata. Preostali dihromat se određuje titracijom pomoću standardizovanog gvožĐe-amonijum sulfata. U slučaju da ispitivane supstance sadrže hlor, dodati živu-sulfat[LX] da bi se smanjila interferencija hlorida.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Zbog arbitrarnog načina određivanja, HPK je "indikator sposobnosti oksidovanja", pa se ova metoda koristi kao praktičan postupak za određivanje sadržaja organske materije.

Hloridi utiču na ovo ispitivanje. Neorganska redukujuća ili oksidujuća sredstva takođe utiču na određivanje HPK.

Neka ciklična jedinjenja i mnoge isparljive supstance (npr. niže masne kiseline) ne oksiduju u potpunosti primjenom postupka opisanog u ovoj metodi.

1.6. Opis metode

Pripremi se preliminarni rastvor ili disperzija ispitivane supstance da se dobije HPK između 250 mg/l i 600 mg/l.

U slučaju da se radi o slabo rastvorljivim supstancama ili supstancama koje ne disperguju, odmjeri se količina praškaste supstance ili supstance u tečnom obliku koja odgovara količini od 5 mg HPK i staviti u posudu sa vodom.

HPK se u slučaju slabo rastvorljivih supstanci, određuje modifikacijom postupka, odnosno u zatvorenom sistemu sa izjednačavanjem pritiska. Primjenom ove modifikovane metode, supstance za koje nisu prikladne konvencionalne metode, kao npr. sirćetna kiselina, uspješno se kvantifikuju. U slučaju piridina ova metoda nije primjenljiva.

Ukoliko se koncentracija kalijum dihromata, poveća na 0,25 N (0,0416 M), olakšano je direktno mjerenje 5 mg do 10 mg supstance, što je neophodno za određivanje HPK za slabo rastvorljive supstance.

U ostalim slučajevima, HPK se određuje primjenom bilo koje odgovarajuće domaće ili međunarodne standardizovane metode ispitivanja.

2. Podaci i procjena

HPK u posudi iizračunava se prema izabranom normalizovanom postupku i presupstancaa se u grame HPK po gramu ispitivane supstance.

3. Izvještaj

U izvještaju o ispitivanju navodi se koja metoda je korišćena pri ispitivanju. HPK predstavlja srednju vrijednost najmanje tri mjerenja. Svi podaci i napomene mjerodavne za tumačenje rezultata se navode, naročito one koje se odnose na prisustvo nečistoća i svojstva ispitivane supstance (ako su poznata), koje utiču na rezultate. Navodi se i da li je korišćen živin sulfat u cilju smanjenja uticaja hlorida.

C.7. RAZGRADNJA - ABIOTIČKA RAZGRADNJA: HIDROLIZA KAO FUNKCIJA pH

Dio I

1. Metoda ispitivanja

Metoda razgradnje (abiotička razgradnja: hidroliza kao funkcija pH) se zasniva na OECD TG 111 (2004) uputstvu ispitivanja.

1.1. Uvod

Hemikalije dospijevaju u površinske vode direktnim unošenjem, raspršivanjem, izlivanjem, drenažom ili kao posljedica odlaganja otpada iz industrije, domaćinstava i poljoprivrede, iz otpadnih voda ili atmosfere. Dospjele hemikalije u površinskim vodama transformišu hemijski (npr. hidroliza, oksidacija), fotohemijski, odnosno mikrobiološki. Ova metoda opisuje laboratorijasku metodu ispitivanja za procjenu abiotičke hidrolitičke transformacije hemikalija u vodenim sistemima pri vrijednostima pH koje su uobičajeno karakteristične (pH 4-9) i bazira se na uputstvima.

Eksperimenti se izvode u cilju određivanja:

1) stepena hidrolize ispitivane supstance u funkciji pH i
2) prirode/načina i stepena obrazovanja i smanjenja produkata hidrolize kojima su organizmi izloženi.

Eksperimenti su obavezni za hemikalije koje se direktno primjenjuju na površinske vode ili za hemikalije za koje postoji veliki stepen vjerovatnoće da će dospjeti u životnu sredinu nekim od puteva unosa navedenim u ovom dijelu.

1.2. Definicije i mjerne jedinice

Ispitivana supstanca je bilo koja supstanca, odnosno polazna supstanca ili odgovarajući produkt hidrolize.

Produkti transformacije su sve supstance koje nastaju kao produkt u reakcijama biotičke ili abiotičke transformacije.

Produkti hidrolize su sve supstance koje nastaju kao produkti hidrolitičke transformacije ispitivane supstance.

Hidroliza je reakcija ispitivane supstance (u daljem tekstu: RX) sa vodom, sa zamjenom X grupe sa OH grupom: RX + XOX → POX + XX

Stopa kojom se koncentracija RX smanjuje u pojednostavljenom postupku predstavlja se formulama: stopa = $k[X_2O][RX]$, za reakcije drugog reda ili stopa = $k[RX]$, za reakcije prvog reda, u zavisnosti od koraka kojim se određuje stopa.

S obzirom na to da je voda prisutna u znatno većoj količini u odnosu na ispitivanu supstancu, ovaj tip reakcije se uobičajeno opisuje kao reakcija pseudo-prvog reda u kojoj je zabilježena konstanta data odnosom: $k_{obs} = k[X_2O]$

Ukoliko se na grafičkom prikazu log-transformisanih podataka u funkciji vremena ne uočava linearna povezanost (u skladu sa konstantom prvog reda), upotreba jednačine [3] nije adekvatna za određivanje konstante stepena hidrolize ispitivane supstance.

$\frac{1}{t} \frac{C^0}{C_t}$ gdje je: t vrijeme; C_0, C_t koncentracije RX u vremenu 0 i t. $K_{obs} = \ln$

Jedinica mjere ove konstante je (vrijeme). Poluvrijeme reakcije je vrijeme potrebno za reakciju

50% RX koje se određuje formulom: $t_{0.5} = \frac{\ln 2}{}$

K_{obs} Vrijeme poluživota ($t_{0,5}$) je vrijeme potrebno za 50% hidrolizu ispitivane supstance kada se hidroliza opisuje kinetikom prvog reda. Ova vrijednost je nezavisna od koncentracije.

Vrijeme nestajanja 50 (u daljem tekstu: DT_{50}) je vremenski period u okviru kojeg se koncentracija ispitivane supstance smanji za 50%, razlikuje se od parametra $t_{0,5}$ kada se hidroliza ne opisuje kao kinetika prvog reda.

Procjena k na različitim temperaturama

Kada su poznate konstante stepena hidrolize za dvije temperature, konstante stepena za druge temperature iizračunavaju se Arheniusovom jednačinom:

$$k=A\cdot e^{\frac{-E}{R\cdot T}} \text{ ili } \ln k=\ln A-\frac{E}{R\cdot T}$$

Grafički prikaz odnosa lnk prema 1/T daje pravu sa nagibom - E/R, gdje je: K konstanta stepena hidrolize, mjerena na različitim temperaturama; E energija aktivacije (kJ/mol); T apsolutna temperatura (T); R gasna konstanta (8.314 J/mol.K).

Energija aktivacije iizračunava se regresionom analizom jednačinom:

$$E=R\cdot\frac{\ln k_2-\ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1}-\frac{1}{T_2}\right)}$$ gdje je $T_2 > T_1$.

1.3. Primjena metode

Metoda se primjenjuje za hemijske supstance (obilježene ili neobilježene) za koje postoji dovoljno precizna i osjetljiva analitička metoda. Metoda se primjenjuje i za supstance koje nisu ili su u manjoj mjeri isparljive ukoliko su rastvorljive u vodi. Metodu ne primjenjivati za hemikalije koje su u vodenim rastvorima lako isparljive (npr. fumiganti, organski rassupstancaači) i koje ne obrazuju stabilne rastvore u ispitivanim uslovima propisanim za ovu metodu. Ova metoda nije prikladna za supstance slabo rastvorljive u vodi.

1.4. Princip metode

Sterilni vodeni rastvori pufera različitih pH vrijednosti (pH 4, 7 i 9) u kojima je rastvorena ispitivana supstanca inkubiraju se u mraku u kontrolisanim laboratorijaskim uslovima (na konstantnoj temperaturi). Nakon odgovarajućeg vremena, puferski rastvori se analiziraju na ispitivanu supstancu i na produkte hidrolize. Ukoliko se ispituju obilježene supstance (npr. C^{14}), lakše je uspostaviti maseni bilans.

Ova metoda ispitivanja izvodi se kao etapni pristup koji je dat u Dijelu II ove metode. Izbor naredne etape ispitivanja određen je rezultatima prethodne etape.

1.5. Podaci o ispitivanoj supstanci

Neobilježene ili obilježene supstance se koriste za mjerenje stepena hidrolize. Prednost za proučavanje puteva hidrolize i za uspostavljanje masenog balansa daje se obilježenim supstancama. U specijalnim slučajevima obilježevanje supstanci nije neophodno. Preporučuje se obilježavanje supstanci sa C^{14}, ali se upotrebljavaju i drugi izrastvori kao što su C^{13}, N^{15}, H^{3}. Koliko je god moguće, obilježiti najstabilniji dio molekula. Na primjer, ukoliko ispitivana supstanca sadrži jedan prsten, obilježavanje ovog prstena je obavezno; ukoliko supstanca sadrži dva ili više prstena, izvesti dodatne eksperimente da bi se procjenila sudbina svakog pojedinačnog prstena koji je obilježen da bi se dobili podaci o obrazovanju produkata hidrolize. Procenat čistoće supstance je najmanje 95%.

Prije izvoĐenja ispitivanja, za ispitivanu supstancu su potrebni sljedeći podaci o:

- rastvorljivost u vodi (Metoda A.6. koja je data u ovom pravilniku);
- rastvorljivost u organskim rassupstancaačima;
- naponu pare (Metoda A.4. koja je data u ovom pravilniku) i Henrijeva konstanta;
- podionom koeficijentu n-oktanol/voda (Metoda A.8. koja je data u ovom pravilniku
- konstantna disocijacije pKa
- stepen direktne i indirektne fototransformacije u vodi, ukoliko je potrebno.

Koriste se i podaci o analitičkim metodama za kvantifikaciju ispitivane supstance i ukoliko je relevantno, podaci o metodama za identifikaciju i kvantifikaciju produkata hidrolize u vodenim rastvorima (tačka 1.7.2. ove metode).

1.6. Referentne supstance

Referentne supstance, kada je moguće, se koriste za identifikaciju i kvanitifikaciju produkata hidrolize primjenom spektroskopskih i hromatografskih metoda ili neke druge dovoljno osjetiljive metode.

1.7. Kriterijumi kvaliteta

1.7.1. Efikasnost primjenjene analitičke metode

Analiza puferskih rastvora ili njihovih ekstrakata neposredno nakon dodavanja ispitivane supstance u najmanje dva ponavljanja daje prve indicije o efikasnosti analitičke metode i ujednačenosti primjene izabranog postupka za ispitivanu supstancu. Efikasnost za dalje faze eksperimenta određuje se na osnovu razlike mase (kada se koristi obilježeni materijal). Procenat efikasnosti iznosi od 90% do 110% za obilježene i neobijležene hemikalije. U slučaju da postoje tehničke poteškoće da se zadovolji ovaj kriterijum, efikasnost od 70% je prihvatljiva za neobilježene hemikalije, uz dodatno objašnjenje.

1.7.2. Ponovljivost i osjetljivost analitičke metode

Ponovljivost analitičke metode kojom se kvantifikuje ispitivana supstanca i kasnije produkti hidrolize se provjerava analizom puferskog rastvora (ili njihovih ekstrakata) u dva ponavljanja nakon što se obrazuju produkti hidrolize u dovoljnim količinama za kvantifikaciju.

Analitička metoda je dovoljno osjetljiva za kvantifikaciju do najviše 10% od početne koncentracije supstance. Ukoliko je relevantno, analitička metoda je dovoljno osjetljiva i za kvantifikaciju bilo kojih produkata hidrolize koji predstavljaju 10% ili više (u bilo kom vremenu u periodu ispitivanja) od primjenjene koncentracije, do 25% ili manje od najviše koncentracije.

1.7.3. Intervali povjerenja za kinetičke podatke o hidrolizi

Intervali povjerenja se iizračunavaju za sve koeficijente regresione prave, konstante, vrijeme poluživota i bilo koje druge kinetičke parametre (npr. DT_{50}).

1.8. Opis metode

1.8.1. Oprema i instrumenti

Eksperimenti se izvode u staklenim posudama (npr. epruvetama, tbočicama) u mraku i u sterilnim uslovima, ukoliko je neophodno, osim ukoliko preliminarni podaci (kao što je podioni koeficijentioktanol/voda) ukazuju na to da supstanca prijanja za staklene površine. U tim slučajevima, razmatra se upotreba drugih materijala (kao što je teflon). Problem prijanjanja (adhezije) na staklo se rješava i:

- određivanjem mase ispitivane supstance i produkata hidrolize koji su sorbovani na zidove posude;
- upotrebom ultrazvučnih kupatila;
- spiranjem sa zidova posude sa rassupstancaačem pri svakom uzimanju uzoraka za analizu;
- korišćenjem formulisanih proizvoda;
- upotrebom dodatnih rassupstancaača za uvođenje ispitivane supstance u sistem, dodatni rassupstancaač ne utiče na hidrolizu supstance.

Vodena kupatila sa miješalicom ili inkubatori sa termoregulacijom potrebni su za inkubaciju rastvora različitih koncentracija ispitivane supstance.

Potrebna je standardna laboratorijaska oprema koja sadrži:

- pH-metar;
- instrumente za analitička mjerenja kao što su GC, HPLC, TLC uključujući i odgovarajuće sisteme za detekciju supstanci obilježenih ili neobilježenih radioizrastvorima ili metoda inverznog razblaženja izotopa;
- instrumente za identifikaciju (npr. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, itd);
- tečni scintilatorski brojač;
- separacione ljevkove za tečno-tečnu ekstrakciju;
- opremu za koncentrovanje rastvora i ekstrakata (npr. rotirajući evaporator);
- opremu za održavanje temperature (npr. vodeno kupatilo).

Hemijski reagensi uključuju:

- organske rassupstancaače, analitičke čistoće, kao što je heksan, dihlorometan, itd;
- tečnost za scintilatorski brojač;
- puferski rastvori (tačka 1.8.3. ove metode).

Sve staklene posude, redestilovana voda i puferski rastvori koji se koriste su sterilni.

1.8.2. Uvođenje ispitivane supstance

Ispitivana supstanca se uvodi u puferski sistem u obliku vodenog rastvora (Deo IV ove metode).
Upotreba malih količina rastvora koji se dobro miješaju sa vodom (kao što je acetonitril, aceton, etanol) dozvoljena je za uvođenje i distribuciju ispitivane supstance, ali količina nije veća od 1% v/v. U slučaju da se razmatra upotreba veće količine rassupstancaača (npr. kod slabo rastvorljivih supstanci), ovo se dozvoljava samo ako se dokaže da rassupstancaač nema uticaj na hidrolizu ispitivane supstance.

Za rutinsku upotrebu ne preporučuju se formulisani proizvodi, jer se ne isključuje mogućnost da sastojci formulacije utiču na proces hidrolize. Za slabo rastvorljive supstance ili za supstance koje prijanjaju na staklene površine (dio 1.8.1. ove metode) upotreba formulisanih proizvoda je odgovarajuća alternativa.

Ispituje se samo jedna koncentracija ispitivane supstance. Koncentracija ne prelazi 0,01M ili polovinu koncentracije zasićenog rastvora.

1.8.3. Puferski rastvori

Ova metoda ispitivanja izvodi se pri vrijednostima pH od 4, 7 i 9. Za potrebe ovog ispitivanja, puferski rastvori se pripremaju sa hemikalijama analitičke čistoće i redestilovanom vodom. Neki od puferskih sistema koji se koriste dati su u Dijelu trećem ove metode. Puferski sistem može da utiče na hidrolizu i ukoliko se uoče promjene koristi se drugi puferski sistem.

Vrijednosti pH svakog puferskog rastvora provjeravati sa kalibrisanim pH-metrom sa preciznošću najmanje 0,1 u definisanim temperaturnim uslovima.

1.8.4. Uslovi ispitivanja

1.8.4.1. Temperatura

Ispitivanja hidrolize izvoditi na konstantnoj temperaturi. Radi ekstrapolacije rezultata, neophodno je održavati temperaturu sa minimalnim variranjem ± 0,5 °C.

Preliminarno ispitivanje (Etapa 1) izvodi se na temperaturi od 50 °C ukoliko se ne rapolaže podacima o načinu hidrolize supstance. Naredne etape kinetičkih ispitivanja izvode se na najmanje tri različite temperature (uključujući i ispitivanje na temperaturi od 50°C) osim ako je preliminirnim ispitivanjem (Etapa 1) dokazano da supstanca ne podleže hidrolizi. Preporučeni temperaturni opseg je 10 °C do 70 °C (najmanje jedno ispitivanje se izvodi na temperaturi manjoj od 25 °C) koji obuhvata ne samo temperaturu od 25 °C za koju se podnosi Izvještaj o ispitivanju, već i većinu vrijednosti temperatura zabilježenih u prirodnim uslovima.

1.8.4.2. Osvjetljenje i kiseonik

Za ispitivanje hidrolize izabrati odgovarajuću metodu za minimiziranje fotolitičkih efekata. Preduzimaju se odgovarajuće mjere za sprječavanje oksidacije (npr. uduvavanjem helijuma, azota ili argona 5 minuta pre pripreme rastvora).

1.8.4.3. Trajanje ispitivanja

Preliminarno ispitivanje (Etapa 1) traje 5 dana. Naredne etape ispitivanja traju sve dok se 90% ispitivane supstance ne hidrolizuje ili 30 dana, zavisno od toga koji uslov se pre ispuni.

1.8.5. IzvoĐenje ispitivanja

1.8.5.1. Preliminarno ispitivanje (Etapa 1)

Preliminarno ispitivanje se izvodi na temperaturi od 50 °C ± 0,5 °C pri vrijednostima pH od 4, 7 i 9. Ukoliko ispitivana supstanca hidrolizuje manje od 10% u toku perioda od 5 dana, (t0,5 25°C > 1 godine) za tu supstancu se smatra da ne podijleže hidrolizi i nije potrebno dalje ispitivanje. Ako je za supstancu dokazano da podliježe hidrolizi na ambijentalnoj temperaturi nije neophodno preliminarno ispitivanje. Analitička metoda je dovoljno precizna i osjetljiva da se detektuje 10% redukcije početne koncentracije ispitivane supstance.

1.8.5.2. Hidroliza nestabilnih supstanci (Etapa 2)

Sljedeća etapa ispitivanja izvodi se pri pH vrijednostima pri kojima je data ispitivana supstanca nestabilna, a što je dokazano preliminarnim ispitivanjem. Puferski rastvori ispitivane supstance temperiraju se na izabranoj temperaturi. Za ispitivanje kinetike prvog reda, svaki rastvor ispitivane supstance se analizira u određenim vremenskim intervalima što omogućava dobijanje najmanje šest pravilno raspoređenih vrijednosti u opsegu od 10% do 90% hidrolize ispitivane supstance. Po jedan uzorak supstance uzima se za mjerenje u šest vremenskih intervala (ukoliko je ispitivanje postavljeno u najmanje dva ponavljanja u odvojenim posudama) i izuzima iz ispitivanja (dobija se set podataka od najmanje dvanaest vrijednosti). Nije adekvatno postavljanje ispitivanja samo sa jedinstvenim uzorkom iz koga će se uzimati pojedinačne alikvote za mjerenja u vremenskim intervalima, jer ne omogućava analizu varijabilnosti podataka i može da dovede do kontaminacije rastvora ispitivane supstance. Ispitivanja kojima se utvrđuje da su eksperimentalni uslovi sterilni izvode se na kraju završnih etapa, odnosno nakon hidrolize 90% ispitivane supstance ili nakon 30 dana. Ako se ne uočava razgradnja (transformacija)supstance, nije neophodno izvoditi ova ispitivanja.

1.8.5.3. Identifikacija produkata hidrolize (Etapa 3)

Sve važnije produkte hidrolize, odnosno one produkte koji predstavljaju najmanje 10% primjenjene doze ispitivane supstance treba identifikovati odgovarajućim analitičkim metodama.

1.8.5.4. Dodatna ispitivanja

Za ispitivanje supstanci koji ne podliježu hidrolizi neophodna su dodatna ispitivanja koja se izvode pri različitim vrijednostima pH od 4, 7 i 9.

2. Podaci

Količina ispitivane supstance i produkata hidrolize izražava se u procentima u odnosu na primjenjenu početnu koncentraciju ispitivane supstance, i kada je prikladno, u mg/l za svaki vremenski interval mjerenja i pri svim pH vrijednostima i temperaturama. Kada se u ispitivanju koriste obilježene supstance maseni balans se izražava u procentima u odnosu na primjenjenu početnu koncentraciju.

Rezultati ispitivanja predstavljaju se grafički: log-transformisani podaci za koncentraciju ispitivane supstance u funkciji vremena. Identifikovati sve važnije produkte hidrolize, odnosno produkte koji predstavljaju najmanje 10% primjenjene doze ispitivane supstance. Podatke za koncentraciju produkata hidrolize transformisati u log-transformisane podatke (identično kao i za ispitivanu supstancu) da bi se uočio stepen obrazovanja i smanjenja produkata hidrolize.

2.1. Obrada podataka

Preciznije iizračunavanje vrijednosti poluživota ili vrijednosti DT_{50} postiže se primjenom odgovarajućih kinetičkih modela. Vrijednosti poluživota, odnosno vrijednosti DT_{50} (uključujući i intervale povjerenja) prikazuju se za svaku pH vrijednost i temperaturu sa opisom korišćenog modela, stepenom kinetike i koeficijenta korelacije (r^2). Ove računice se primjenjuju za produkte hidrolize.

Kada se ispitivanja izvode na različitim temperaturama, konstante hidrolize pseudo-prvog reda
(k_{obs}) opisati u funkciji temperature. Izračunavanja se zasnivaju na raščlanjivanju vrijednosti kobs na vrijednosti konstante za hidrolizu u kiseloj, neutralnoj i baznoj sredini (k_H, $k_{neutral}$ i k_{OH}) i

Arheniusovoj jednačini: $K_{obs}=k_H \square H \square . k_{neutral} k_{OH} \square OH \square \square \square A_i^{\frac{e}{T}}$ gdje su: A_i i B_i vrijednosti $i \square H, neutral, OH$

konstante za odsječak i konstante za nagib regresione prave dobijene regresionom analizom vrijednosti ln ki u funkciji recipročnih vrijednosti za apsolutnu temperaturu izraženih u Kelvinima
(T).

Preko Arheniusove jednačine koja izražava vezu između konstanti za hidrolizu u kiseloj, neutralnoj i baznoj sredini, iizračunavaju se vrijednosti konstante kinetike pseudo-prvog reda, a samim tim i vrijednosti poluživota za različite temperature za koje nije moguće direktno eksperimentalno određivanje konstanti.

2.2 Procjena i tumačenje rezultata

Većina reakcija hidrolize odigrava se po kinetici prvog reda, te je vrijeme poluživota nezavisno od koncentracije (jednačina 4 u Dijelu II ove metode). Ovo dozvoljava ekstrapolaciju rezultata dobijenih u laboratorijaskim eksperimentima određenih za koncentracije od 10^{-2}M do 10^{-3} M na uslove u životnoj sredini (≤ 10^{-6}).

Primjere dobre korelacije između stepena hidrolize izmjerenih u ispitivanjima u čistoj i u ambijentalnoj vodi za set hemikalije, uz uslov da se mjere pH vrijednosti i temperatura, dali su Mabej i Mil[34].

3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o: 1) ispitivanoj supstanci:

[34] Testing Method B.44. Skin Absorption: In vivo Method

- uobičajeni naziv, hemijski naziv, CAS broj, strukturna formula (sa naznačenom pozicijom molekula koji je obilježen radioizotopom) i relevantna fizička i hemijska svojstva (tačka 1.5. ove metode);
- stepen čistoće supstance;
- stepen čistoće oznake i označene supstance, kao i molarna aktivnost (gde je prikladno); - puferski rastvori;
- vrijeme i način pripreme;
- puferski rastvori i voda koji se koriste u ispitivanju; - molarna koncentracija i pH vrijednosti puferskih rastvora; 2) uslovima ispitivanja:
- datum izvoĐenja ispitivanja;
- količina ispitivane supstance;
- način uvođenja ispitivane supstance u rastvor pufera i vrsta rassupstancaača (kao i količina);
- zapremina puferskih rastvora koji se inkubiraju (pufeski rastvor u koji je rastvorena ispitivana supstanca); - opis sistema za inkubaciju;
- pH vrijednost i temperatura;
- vrijeme uzimanja uzoraka za analizu;
- način ekstrakcije;
- metode za kvantifikaciju i identifikaciju ispitivane supstance i produkata hidrolize u puferskim rastvorima;
- broj ponavljanja; 3) Rezultatima:
- ponovljivost i osjetljivost primjenjenih analitičkih metoda;
- efikasnost (kriterijumi za validnost ispitivanja dati su u dijelu 1.7.1. ove metode); - podaci za pojedinačna ponavljanja i njihove srednje vrijednosti izraženi u tabelama;
- maseni balans u toku i na kraju ispitivanja (kad se koriste obilježene supstance); - rezultati preliminarnog ispitivanja;
- tumačenje rezultata;
- svi originalni (sirovi) podaci i grafici.

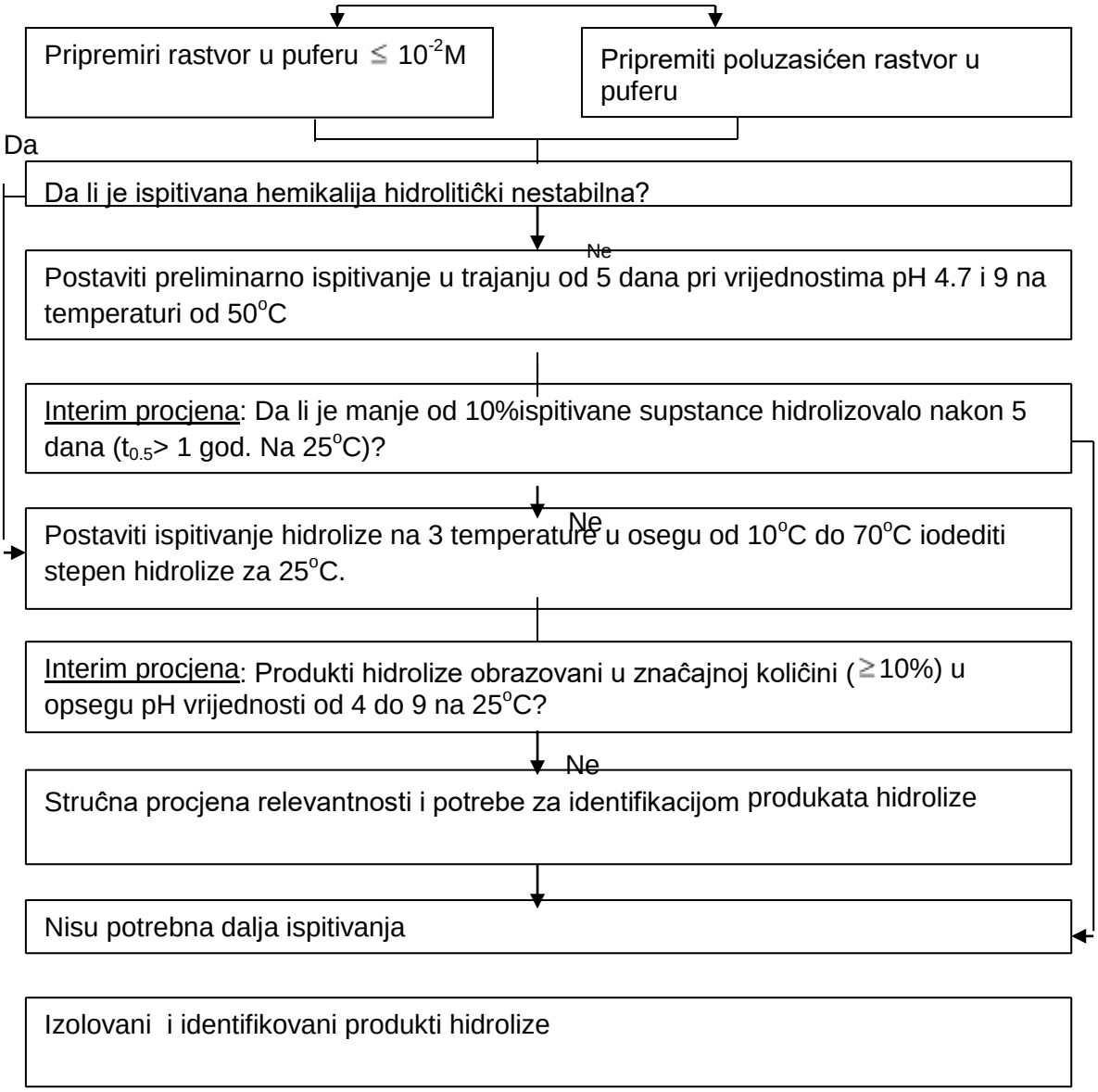
Kada je određen stepen hidrolize u izvještaju o ispitivanju navode se:

- grafički prikaz koncentracija ispitivane supstance u funkciji vremena, kada je moguće i za produkte hidrolize za svaku pH vrijednost i temperaturu;
- rezultati Arhenijusove jednačine za temperaturu 20°C/25°C sa pH vrijednostima, konstante (h-1 ili dan-1), vrijeme poluživota ili DT_{50}, temperature (°C) uključujući i intervale povjerenja i koeficijente korelacije (k_2); - predloženi put hidrolize.

SHEMA ETAPNOG ISPITIVANJA HIDROLIZE
DIO II

Da li je rastvorljivost ispitivane supstance >$2x10^{-2}$M?

Da | Ne



PUFERSKI SISTEMI
DIO III

Puferske smješe prema Klarku i Lubsu:

Sastav	pH[63]
0,2 N HCl and 0,2 N KCl na 20 °C	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl, rastvoriti od 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl, rastvoriti do 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl, rastvoriti do 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl, rastvoriti do 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl, rastvoriti do 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl, rastvoriti do 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl, rastvoriti do 100 ml	2,2

0,1 M kalijum biftalat + 0,1 N HCl na 20 °C	
46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml	3,8
0,1 M kalijum biftalat + 0,1 N NaOH na 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml	4,8
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata, dopuniti do 100 ml	6,0
0,1 M monokalijum fosfat + 0,1 N NaOH na 20 °C	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata, dopuniti do 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata, dopuniti do 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata, dopuniti do 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata, dopuniti do 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata, dopuniti do 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata, dopuniti do 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata, dopuniti do 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata, dopuniti do 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata, dopuniti do 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata, dopuniti do 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata, dopuniti do 100 ml	8,0
0,1 M H3BO3 u 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH na 20 °C	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borne kis, dopuniti do 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borne kis, dopuniti do 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borne kis, dopuniti do 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borne kis, dopuniti do 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borne kis, dopuniti do 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borne kis, dopuniti do 100 ml	8,8

21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borne kis, dopuniti do 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borne kis, dopuniti do 100 ml	9,2
32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borne kis, dopuniti do 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borne kis, dopuniti do 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borne kis, dopuniti do 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borne kis, dopuniti do 100 ml	10,0

Citratni puferi prema Kolthofu i Vlišhoveru:

Sastav	pH
0,1 M monokalijum citrat i 0,1 N HCl na 18 °C (*)	
49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml	3,6
0,1 M monokalijum citrat i 0,1 N NaOH na 18°C[64]	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata, dopuniti do 100 ml	6,0

64 Dodati mali kristal tinola ili slične supstance da se spriječi rast plijesni.

Boratne smješe prema Sorensenu:

Sastav		Sorensen, pH na 18 °C	Valbum, pH na		
boraks (ml)	HCl/NaOH (ml)		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M boraks + 0,1 N HCl					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95

6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56.	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50.	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
0,05 M boraks + 0,1 N NaOH					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,5	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9.76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

Fosfatne smješe prema Sorensenu:

Sastav	pH
0,0667 M monokalijum fosfat + 0,0667 M dinatrijum fosfat na 20 °C	
99,2 ml KH2PO4 + 0,8 ml Na2HPO4	5,0
98,4 ml KH2PO4 + 1,6 ml Na2HPO4	5,2
97,3 ml KH2PO4 + 2,7 ml Na2HPO4	5,4
95,5 ml KH2PO4 + 4,5 ml Na2HPO4	5,6
92,8 ml KH2PO4 + 7,2 ml Na2HPO4	5,8
88,9 ml KH2PO4 + 11,1 ml Na2HPO4	6,0
83,0 ml KH2PO4 + 17,0 ml Na2HPO4	6,2
75,4 ml KH2PO4 + 24,6 ml Na2HPO4	6,4
65,3 ml KH2PO4 + 34,7 ml Na2HPO4	6,6
53,4 ml KH2PO4 + 46,6 ml Na2HPO4	6,8
41,3 ml KH2PO4 + 58,7 ml Na2HPO4	7,0
29,6 ml KH2PO4 + 70,4 ml Na2HPO4	7,2
19,7 ml KH2PO4 + 80,3 ml Na2HPO4	7,4
12,8 ml KH2PO4 + 87,2 ml Na2HPO4	7,6
7,4 ml KH2PO4 + 92,6 ml Na2HPO4	7,8
3,7 ml KH2PO4 + 96,3 ml Na2HPO4	8,0

C.8. TOKSIČNOST ZA KIŠNE GLISTE: METODA ISPITIVANJA SA VEŠTAČKIM ZEMLJIŠTEM

Dio I

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

U ovoj laboratorijaskoj metodi ispitivanja, ispitivana supstanca dodaje se u vještačko zemljište u koje se smještaju kišne gliste. Nakon 14 dana (ili po izboru nakon 7 dana) ispituje se letalno dejstvo supstance na kišne gliste. Ovo ispitivanje predstavlja postupak kojim se u relativno kratkom roku stiče uvid u dejstvo hemikalija na kišne gliste, kod dermalnog i oralnog unosa supstance.

1.2. Definicija

LC_{50} je koncentracija supstance koja izaziva smrt 50% ispitivanih jedinki u toku unaprijed utvrĐenog perioda izlaganja.

1.3. Referentne supstance

Referentna supstanca se koristi povremeno kao sredstvo kojim se pokazuje da nije došlo do značajnih promjena osjetljivosti test sistema. Kao referentna supstanca koristi se hloracetamid analitičke čistoće.

1.4. Princip metode

Zemljište je promjenljiv medijumum, te se za ovu metodu koristi precizno definisano vještačko zemljište koje sadrži ilovaču. Odrasle jedinke kišnih glista vrste Eisenia foetida (Dio II ove metode) drže se u definisanom vještačkom zemljištu tretiranom različitim koncentracijama ispitivane supstance. Četrnaest dana (može i 7 dana) nakon početka ispitivanja, sadržaj posude iz svake esperimentalne grupe istrese se u plitku laboratorijasku kadicu i prebroje se preživjele kišne gliste.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Metoda je osmišljena tako da je maksimalno ponovljiva, s obzirom na zemljišni supstrat i ispitivane organizme. Da bi ispitivanje bilo prihvaćeno, smrtnost u kontrolama ne prekoračuje 10% na kraju ispitivanja.

1.6. Opis metode

1.6.1. Materijal

1.6.1.1. Zemljišni supstrat

Kao osnovni ispitivani supstrat koristi se tačno definisano vještačko zemljište.

Osnovni supstrat (procenti na bazi suve mase) sadrži:

- 10% treseta (vrijednosti pH što je bliže 5,5 do 6,0, bez vidljivih ostataka biljaka, sitno mljeven);
- 20% kaolinska glina sa po mogućnosti više od 50% kaolina;
- oko 69% industrijskog kvarcnog pijeska (pretežno sitni pijesak sa više od 50% čestica veličine 0,05 mm do 0,2 mm). Ako supstanca ne disperguje dovoljno dobro u vodi, ostaviti 10 g po sanduku da bi se kasnije pomiješalo sa ispitivanom supstancom;
- oko 1% kalcijum karbonata ($CaCO_3$), sprašenog, hemijski čistog, dodaje se za korekciju pH vrijednosti na 6,0 ± 0,5.

Ispitivani supstrat sadrži:

- osnovni supstrat, - ispitivanu supstancu i - dejonizovanu vodu.

Sadržaj vode iznosi oko 25% do 42% suve mase osnovnog supstrata. Sadržaj vode u supstratu određuje se sušenjem uzorka do stalne težine na temperaturi od 105 °C. Ključni kriterijum je da vještačko zemljište ovlaženo do tačke u kojoj nema zadržavanja vode. Tokom miješanja se pazi da se dobije ravnodnosna raspodjela ispitivane supstance i supstrata. Opisati način na koji se ispitivana supstanca dodaje u supstrat.

Kontrolni supstrat sadrži osnovni supstrat i vodu. Ako se koristi aditiv, dodatna kontrola sadrži istu količinu aditiva.

1.6.1.2. Eksperimentalne posude

Staklena posuda zapremine oko 1 L (propisno pokrivena plastičnim poklopcem, sahatnim staklom ili plastičnom folijom sa otvorima za ventilaciju) napunjena ispitivanim i kontrolisanim supstratom u količini ekvivalentnoj 500 g suve mase supstrata.

1.6.2. Uslovi u toku ispitivanja

Eksperimentalne posude držati u klima komorama na temperaturi od 20°C ± 2 °C sa stalnim osvjetljenjem. Intenzitet svijezemljišta je između 400 lux i 800 lux.

Ispitivanje traje 14 dana, ali se smrtnost procjenjuje i 7 dana nakon početka ispitivanja.

1.6.3. Postupak metode ispitivanja

Ispitivane koncentracije

Koncentracije ispitivane supstance izražavaju se kao masa supstance po suvoj masi supstrata (mg/kg).

Preliminarna studije za utvrĐivanje opsega koncentracija

Opseg koncentracija koje dovode do smrtnosti od 0% do 100% određuje se studijom za utvrĐivanje opsega da bi se dobila informacija o opsegu koncentracija koje će se koristiti u definitivnom ispitivanju.

Supstanca se ispituje u sljedećim koncentracijama: 1.000 mg; 100 mg; 10 mg; 1 mg i 0,1 mg supstance po kilogramu supstrata (suva masa).

Ako se radi konačno ispitivanje, po jedna ispitivana grupa od po 10 glista po koncentraciji i jedna grupa po kontroli, su dovoljne za studiju utvrĐivanja opsega koncentracija.

Konačno ispitivanje Rezultati studije za utvrĐivanje opsega koncentracija koriste se za izbor najmanje 5 koncentracija u geometrijskom nizu sa faktorom ne većim od 1,8. Izabrane koncentracije obuhvataju opseg smrtnosti od 0% do 100%.

Ispitivanje serija koncentracija omogućava što precizniju procjenu vrijednosti LC_{50} i odgovarajućih intervala povjerenja.

U definitivnom ispitivanju koriste se najmanje četiri eksperimentalne grupe od po 10 glista po koncentraciji i kontroli. Rezultati tretmana prikazuju se kao srednja vrijednost iz 4 grupe sa standardnom devijacijom.

Kad dvije uzastopne koncentracije, pri faktoru od 1,8 rezultiraju 0% i 100% smrtnošću, te dvije vrijednosti su dovoljne da pokažu opseg u kojem se nalazi LC_{50}.

Miješavina osnovnog ispitivanog supstrata i ispitivane supstance

Ispitivani supstrat kad god je moguće priprema se izuzimajući vodu, bez i jednog dodatnog agensa. Neposredno prije početka ispitivanja, emulzija ili disperzija ispitivane supstance u dejoniziovanoj vodi ili drugom rassupstancaaču miješa se sa osnovnim ispitivanim supstratom ili se ravnodnosno raspršiva po supstratu pomoću hromatografskog ili sličnog raspršivača za fino raspršivanje.

Ako nije rastvorljiva u vodi, ispitivana supstanca se rassupstancaa u najmanjoj mogućoj zapremini odgovarajućeg organskog rassupstancaača (npr. heksana, acetona ili hloroforma). Samo sredstva koja brzo isparavaju se koriste za rastvaranje, disperziju ili emulgovanje ispitivane supstance. Ispitivana supstanca se prije upotrijebe provjetrava. Količina vode koja ispari se nadoknađuje. Kontrola sadrži istu količinu svakog upotrijebljenog dodatnog sredstva.

Ako ispitivana supstanca nije rastvorljiva ili ne disperguje ili emulguje u organskim rassupstancaačima, 10 g miješavine sitno samljevenog kvarcnog pijeska i količina ispitivane supstance potrebna za tretman 500 g suve mase vještačkog zemljišta pomiješa se sa 490 g suve mase ispitivane supstance.

U svakoj grupi, u svaku posudu stavlja se vlažan ispitivani supstrat u količini ekvivalentnoj 500 g suve mase, a zatim se na površinu supstrata stavlja po 10 kišnih glista po posudi. Gliste su prethodno aklimatizovane u toku 24 sata u slično vlažnom, osnovnom suptratu, a zatim isprane. Prije stavljanja u ispitivani supstrat, suvišna voda sa glista upije se filter papirom.

Eksperimentalne posude pokriju se perforiranim plastičnim poklopcima, sahatnim staklom ili folijom, da bi se spriječilo sušenje supstrata. Posude se drže 14 dana u uslovima propisanim metodom.

Smrtnost se procjenjuje 14 (opciono 7) dana nakon početka. Supstrat se prospe u plitak slakleni sud od nerđajućeg čelika. Kišne gliste se pregledaju i odredi se broj preživjelih glista. Kišne gliste smatraju se mrtvim ako ne odgovaraju na nježan mehanički nadražaj na prednjem kraju.

Kada se smrtnost procjenjuje nakon 7 dana, posuda se ponovno napuni supstratom i preživjele gliste se vrate na površinu istog ispitivanog supstrata.

1.6.4. Ispitivani organizmi

Ispitivani organizmi su odrasle jedinke Eisenia foetida (Dio II ove metode), stare najmanje dva mjeseca sa klitelumom, pune težine između 300 mg i 600 mg (za postupak uzgajanja Dio II ove metode).

2. Podaci

2.1. Obrada i procjena rezultata

Koncentracija ispitivane supstance navodi se u odnosu na odgovarajuće procente mrtvih kišnih glista.

Kad su podaci dobri, vrijednost LC_{50} sa intervalima povjerenja (p = 0,05) se određuje pomoću standardnih metoda. LC_{50} se izražava u mg ispitivane supstance po kilogramu ispitivanog supstrata (suva masa).

U slučajevima kada je nagib krive dozne zavisnosti strm da bi se mogla izračunati LC_{50}, dovoljna je grafička procjena te vrijednosti.

Kad dvije uzastopne koncentracije pri faktoru od 1,8 dovode samo do 0% i 100% smrtnosti, te dvije vrijednosti su dovoljne da pokažu opseg u kojem se nalazi LC_{50}.

3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži:

- izjavu da je ispitivanje izvedeno u skladu sa navedenim kriterijumima kvaliteta;
- podatak koje je ispitivanje izvedeno (preliminarna studija za utvrĐivanje opsega koncentracija ili definitivno ispitivanje);
- tačan opis uslova u toku ispitivanja ili izjavu da je ispitivanje bilo izvedeno u skladu sa postupkom (mora se navesti svako odstepene);
- tačan opis načina na koji je ispitivana supstanca umiješana u osnovni supstrat;
- podatke o ispitivanim organizmima (vrsta, starost, srednja vrijednost i opseg težine, uslovi držanja i uzgajanja, snabdevač);
- podatak o metodi korišćenoj za određivanje LC_{50};
- rezultate ispitivanja, uključujući sve upotrijebljene podatke;
- opis primjećenih simptoma ili promjena u ponašanju ispitivanih organizama; - smrtnost u kontrolama;
- LC_{50} ili najvišu ispitivanu koncentraciju bez smrtnosti i najnižu ispitivanu koncentraciju sa smrtnošću od 100%, 14 dana (i po izboru 7 dana) od početka ispitivanja;
- grafički prikaz krive koncentracija/odgovor;
- rezultate dobijene sa referentnom supstancom (u vezi sa ovim ispitivanjem ili iz prethodnih ispitivanja kontrole kvaliteta.

UZGAJANJE I ČUVANJE GLISTA PRIJE ISPITIVANJA
DIO II

Za uzgajanje životinja, 30 do 50 odraslih glista stavi se u sanduk za uzgajanje sa svježim supstratom iz koga se izvade nakon 14 dana. Gliste se upotrijebljavaju za uzgajanje daljih odgajivačkih grupa. Kišne gliste koje se izlegu iz kokona koriste se u ispitivanjima kad odrastu (u prepisanim uslovima nakon dva do tri mjeseca).

Uslovi za držanje i uzgoj životinja su:

Klima komora: temperatura 20 °C ± 2 °C sa stalnim osvjetljenjem (intenziteta 400 lux do 800 lux).

Sanduci za uzgoj: pogodni plitki sanduci zapremine od 10 L do 20 L.

Supstrat: Eisenia foetida se uzgaja u ekskrementu različitih životinja. Kao supstrat se koristi miješavina treseta (50% zapremine) i kravlje ili konjske balege (50% zapremine). Supstrat ima vrijednost pH oko 6 do 7 (reguliše se kalcijum karbonatom) i nisku jonsku provodljivost (manje od 6 mmhos ili 0,5% koncentracije soli). Supstrat je vlažan, ali ne previše mokar.

Uz opisani postupak uspješno se koriste i druge procedure.

Postoje dva tipa glista Eisenia foetida koje su taksonomi razdvojili u dvije vrste (Vouche, 1972).
Morfološki su slične, ali jedna vrsta (Eisenia foetidafoetida) ima na segmentima tipične poprečne pruge ili prstenove, dok ih druga vrsta (Eisenia foetida andrei) nema, odnosno ima crvenkaste šare. Koristiti vrsti Eisenia foetida andrei. Ostale vrste se koriste ako je na rapolaganju potrebna metodologija.

C.9. BIORAZGRADNJA - ZAHN-WELLENS METODA ISPITIVANJA

DIO I

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

Metoda biorazgradnje (Zahn-Wellens) je procjena mogućnosti potpune biorazgradljivosti dobro rastvorljivih, neisparljivih organskih supstanci na koje Dijeluju mikroorganizmi u relativno visokim koncentracijama u ispitivanju u statičkim uslovima.

Prilikom tumačenja rezultata uzeti u obzir mogućnost fizičko-hemijske adsorpcije na suspendovane materije (dio 3.2. ove metode).

Za koncentracije ispitivane supstance uzimaju se koncentracije koje korespondiraju vrijednostima za koncentraciju rastvorenog organskog ugljenika (u daljem tekstu: DOC) u opsegu od 50 mg/l do
400 mg/l ili vrijednostima za hemijsku potrošnju kiseonika (u daljem tekstu: HPK) u opsegu od 100 mg/ldo 1.000 mg/l. Ispitivanje ovako visokih koncentracija povećava analitičku pouzdanost. Jedinjenja sa toksičnim svojstvima usporavaju proces razgradnje.

U ovoj metodi, DOC ili HPK koristi se za procjenu potpune biorazgradljivosti ispitivane supstance.

Uporedno izvoĐenje specifičnih analitičkih metoda daje procjenu primarne biorazgradljivosti supstanci (nestanak polazne supstance).

Metoda se primjenjuje samo za organske supstance koje, pri koncentracijama koje se koriste u ispitivanju:

- jesu rastvorljive u vodi u uslovima definisanim ovom metodom;
- imaju neznatan napon pare u uslovima definisanim ovom metodom - ne Dijeluju inhibitorno na bakterije;
- koje se adsorbuju se unutar sistema samo u ograničenoj mjeri; - ne obrazuju penu.

Podaci o proporcionalnom uDijelu glavnih sastojaka ispitivane supstance korisni su pri tumačenju dobijenih rezultata, naročito u slučajevima gdje su vrijednosti dobijenih rezultata niske ili ekstremne. Podaci o toksičnosti ispitivane supstance na mikroorganizme poželjni su

za tumačenje niskih dobijenih vrijednosti i prilikom izbora odgovarajućih koncentracija za potrebe ispitivanja.

1.2. Definicije i mjerne jedinice

Stepen razgradnje koji se dostigne na kraju ispitivanja opisuje se kao biorazgradljivost u ZahnWellensispitivanju: D_t=□□1 _____ $_C CA^T{}_C{}^C BA^B$ □□□100gdje je: D_t procenat biorazgradnje (%) u vremenu T; C_A

DOC (ili HPK) vrijednost izmjerena u ispitivanoj smješi 3 sata nakon početka ispitivanja (mg/l); C_t DOC ili HPK vrijednosti izmjerene u ispitivanoj smješi u vremenu t (mg/l); C_B DOC ili HPK vrijednosti izmjerene u kontroli u vremenu t (mg/l); C_{BA} DOC ili HPK vrijednosti izmjerene u kontroli, tri sata nakon početka ispitivanja (mg/l).

Stepen razgradnje izražava se u procentima bez decimala. Procenat razgradnje je procenat smanjenja vrijednosti DOC (ili HPK) za datu supstancu.

Razlika između vrijednosti izmjerene nakon tri sata i izračunate vrijednosti, ili po mogućnosti izmjerene početne vrijednosti, daje koristan podatak o eliminaciji supstance (dio 3.2. ove metode).

1.3. Referentne supstance

Korišćenje referentnih supstanci je od koristi kada se ispituju nove supstance. Još uvjek se ne preporučuju određene referentne supstance.

1.4. Princip metode

Aktivni mulj, neorganski nutrijenti i ispitivana supstanca u vodenom rastvoru kao jedini izvor ugljenika sjedinjuju se, stavljaju u staklenu posudu zapremine jedan do četiri litra sa mješalicom i aeratorom. Ova smješa se miješa i aeriše na temperaturi od 20 °C do 25 °C pod difuznim osvjetljenjem ili u mračnoj komori u toku 28 dana. Proces razgradnje prati se određivanjem vrijednosti DOC (ili HPK) u filtratu smješe sa jednodnevnom ili odgovarajućom redovnom dinamikom. Odnos vrijednosti DOC (ili HPK) izmjerene nakon svakog vremenskog intervala i vrijednosti DOC (ili HPK) izmjerene tri sata nakon početka ispitivanja izražava se kao procenat biorazgradnje i služi kao mjera stepena razgradnje u datom vremenu. Ova vrijednost se grafički prikazuje u funkciji vremena kako bi se dobila kriva biološke razgradnje.

Kad se koristi specifična analitička metoda, mjere se promjene u koncentraciji polazne supstance do kojih dolazi usled biorazgradnje (primarna biorazgradljivost).

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Ponovljivost metode ispitivanja je dokazana interkalibracijskim ispitivanjima. Osjetljivost metode je u velikoj mjeri određena varijabilnošću rezultata slijepe probe i u manjoj mjeri, preciznošću određivanja koncentracije rastvorenog organskog ugljenika i količini rastvorene ispitivane supstance.

1.6. Opis metode

1.6.1. Pripreme

1.6.1.1. Reagensi

Voda: voda za piće sa sadržajem organskog ugljenika < 5 mg/l. Zbirna koncentracija jona kalcijuma i magnezijuma nije veća od 2,7 mmol/l; u suprotnom, napraviti odgovarajuće razblaživanje sa dejonizivanom ili destilovanom vodom.

Sumporna kiselina, analitičke čistoće: 50 g/l.

Rastvor natrijum-hidroksida, analitičke čistoće: 40 g/l.

Rastvor neorganskih nutrijenata (rastvoriti u 1 L dejonizovane vode):

- NH_4Cl (amonijum-hlorid), analitičke čistoće: 38,5 g;
- $NaH_2PO_4x2H_2O$ (natrijum dihidrogenfosfat), analitičke čistoće:33,4 g; - KH_2PO_4(kalijum-hidrogenfosfat), analitičke čistoće: 8,5 g;
- K_2HPO_4 (dikalijum-hidrogenfosfat), analitičke čistoće: 21,75 g.

Smješa služi kao rastvor nutrijenata i kao puferski rastvor.

1.6.1.2. Oprema

Oprema za ispitivanje sadrži:

- staklene posude zapremine od 1 L do 4 L (npr. cilindrične posude);
- miješalicu sa staklenom ili metalnom lopaticom na odgovarajućoj osovini (lopatica se rotira na 5 cm do 10 cm iznad dna posude). Koristi se i magnetna miješalica sa magnetom za miješanje 7 cm do 10 cm;
- staklenu cijevčicu sa unutrašnjim prečnikom 2 mm do 4 mm za aeraciju. Otvor cijevčice je postavljen na oko 1 cm iznad dna posude;
- centrifugu (oko 3.550 g);
- pH-metar;
- oksimetar;
- filter papir;
- uređaj za membransku filtraciju;
- membranske filtere, prečnika pora 0,45 µm. Membranski filteri su pogodni ukoliko je onemogućeno oslobađanje ugljenika iz filter papira ili adsorbovanje ispitivane supstance u toku filtracije;
- analitičku opremu za određivanje sadržaja organskog ugljenika i hemijske potrošnje kiseonika.

1.6.1.3. Priprema inokuluma

Aktivni mulj iz postrojenja za biološku obradu ispira se (u više ponavljanja) centrifugiranjem ili taloženjem u vodi koja se koristi za potrebe ispitivanja.

Aktivni mulj je u odgovarajućem stanju. Takav mulj se dobija iz postrojenja za obradu otpadnih voda koja ispravno rade. Da bi se dobilo što više različitih vrsta ili sojeva bakterija, inokulum se miješa iz različitih izvora (npr. iz različitih postrojenja za obradu, iz ekstrakata zemljišta, iz vode iz rijeka itd). Miješavina inokuluma dalje se tretira na navedeni način. Provjera aktivnosti aktivnog mulja je u skladu sa "Funkcionalna kontrola" iz ove metode.

1.6.1.4. Priprema ispitivanih rastvora

U posudu dodati: 500 ml vode koja se koristi za potrebe ispitivanja, 2,5 ml/l rastvora neorganskih nutrijenata i aktivni mulj u količini koja korespondira 0,2 do 1,0 g suve materije/l u krajnjoj smješi. Dodati dovoljnu količinu osnovnog rastvora ispitivane supstance tako da se uspostavi vrijednost DOC 50 mg/ldo 400 mg/l u krajnjoj smješi. Korespondirajuće vrijednosti za HPK su 100 mg/l do 1.000 mg/l. Dopuniti posudu sa vodom koja se koristi za potrebe ispitivanja do zapremine 1 L ili 4 L (u zavisnosti od zapremine posude). Zapremina rastvora zavisi od broja uzoraka potrebnih za određivanje vrijednosti DOC ili HPK, kao i zapremina uzoraka potrebnih za analitička mjerenja.

Zapremina od 2 L je zadovoljavajuća. Za svaku koncentraciju ispitivane supstance paralelno se postavi minimum jedna kontrola, koja sadrži samo aktivni mulj i rastvor neorganskih nutrijenata u jednakoj zapremini vode kao u ostalim posudama.

1.6.2. IzvoĐenje ispitivanja

Rastvori ispitivane supstance miješaju se na magnetnoj miješalici ili miješalici sa lopaticom pod difuznim osvjetljenjem ili u mračnoj komori na temperaturi 20 °C do 25 °C. Aeracija se obavlja pomoću komprimovanog vazduha koji se prečišćava pomoću staklene vune i pomoću špric-boce ukoliko se ukaže potreba. Onemogući se taloženje mulja i pad koncentracija kiseonika ispod 2 mg/l.

Vrijednost pH se provjerava u jednakim vremenskim intervalima (npr. dnevno) i po potrebi se podešava na pH vrijednosti od 7 ili 8.

Gubici usled isparavanja nadoknaĐuju se dodavanjem potrebne količine dejoniziovane ili destilovane vode neposredno prije svakog uzimanja uzoraka. Prije početka ispitivanja označiti nivo tečnosti u posudi. Nove oznake nivoa tečnosti stavljaju se na posudu nakon svakog uzimanja uzoraka (bez aeracijskog suvog miješanja). Prvi uzorci se uvjek uzimaju tri sata nakon početka ispitivanja da bi se odredilo da li se ispitivana supstanca adsorbuje na aktivni mulj. Razgradnja ispitivane supstance prati se određivanjem vrijednosti DOC koje se radi svakodnevno ili u određenim redovnim vremenskim intervalima. Uzorci iz eksperimentalnih posuda i kontrolnih posuda filtriraju se kroz opran filter papir. Prvih 5 ml filtrata rastvora se odbacuje. Aktivni mulj koji je teško filtrirati se prethodno ukloni centrifugiranjem 10 minuta. Određivanje vrijednosti DOC ili HPK radi se najmanje u dva ponavljanja. Ispitivanje se izvodi u trajanju do 28 dana. Filtrati koji ostaju zamućeni dalje se filtriraju kroz membranske filtere. Membranski filteri ne otpuštaju ili adsorbuju nijednu vrstu organskog materijala.

Kontrola aktivnog mulja

Uporedo sa svakom serijom koncentracija ispitivane supstance postavlja se paralelno ispitivanje da bi se provjerila aktivnost aktivnog mulja. Za ovu namjenu se dietilenglikol pokazao korisnim.

Adaptacija

Ukoliko se mjerenja obavljaju u relativno kratkim intervalima (npr. svakodnevno), adaptiranost se uočava iz krive razgradnje (Slika 2). Ispitivanje ne započinjati neposredno pred vikend.

Ako adaptiranost nastupi na kraju perioda, ispitivanje se produžava sve dok se ne završi razgradnja. Ako je potrebno znati više o ponašanju adaptiranog mulja, isti aktivni mulj se još

jednom tretira istom ispitivanom supstancom u skladu sa postupkom: isključiti miješalicu i aerator i ostaviti da se aktivni mulj istaloži. Odstraniti supernatant, napuniti posudu do 2 L zapremine sa vodom, miješati 15 minuta i ponovno ostaviti mulj da se istaloži. Nakon što se supernatant ponovno odstrani, istaloženi mulj se ponovo tretira istom ispitivanom supstancom u skladu sa odeljcima 1.6.1.4. i 1.6.2. ove metode. Aktivni mulj se taloži i centrifugiranjem.

Adaptirani mulj se miješa sa svježim muljem do koncentracije 0,2 g do 1 g suve težine/l.

Oprema za analitička mjerenja

Uzorci se filtriraju kroz oprani filter papir (za pranje se koristi dejonizovana voda).

Filtrati koji ostaju zamućeni filtriraju se kroz membranske filtere prečnika 0,45 µm.

Vrijednost DOC određuje se u dva ponavljanja u filtratima uzoraka (prvih 5 ml se odbacuje) pomoću TOC instrumenta. Ako se filtrat ne analizira istog dana, čuva se u frižideru do sljedećeg dana. Ne preporučuje se čuvanje materijala duže vrijeme.

2. Podaci i procjena

Vrijednost DOC, odnosno HPK se određuje najmanje u dva ponavljanja u uzorcima u skladu sa smjernicama datim u dijelu 1.6.2. Razgradnja u vremenu t iizračunava se prema formuli (sa definicijama) datim u dijelu 1.2.Stepen razgradnje koji se dostigne na kraju ispitivanja se opisuje kao "biorazgradljivost u Zahn-Wellens ispitivanju". [35]

3. Izvještaj

3.1. Izvještaj o ispitivanju Izvještaj o ispitivanju sadrži:

- početnu koncentraciju ispitivane supstance;
- sve ostale podatke i rezultate ispitivanja supstance, referentne supstance(ukoliko je korišćena) i slijepe probe;
- koncentraciju ispitivane supstance nakon tri sata;
- biorazgradnju (kriva sa opisom);
- datum i mjesto gde su uzeti organizmi koji su korišćeni u ispitivanju, nivo adaptiranosti aktvinog mulja, korišćene koncentracije, itd;
- naučno ubazirajune razloge za eventualne promjene u izvoĐenju ispitivanja.

3.2. Tumačenje rezultata

Postepeno smanjenje vrijednosti DOC (HPK) koje se registruje u toku nekoliko dana ili sedmica je pokazatelj da je ispitivana supstanca biorazgradljiva.

[35] Ako se potpuna razgradnja dostigne pre kraja ispitivanja i ako se ovaj rezultat potvrdi i u drugom navratu narednog dana, ispitivanje se moţe prekinuti.

Na ispitivanje utiče fizičko-hemijska adsorpcija. To je slučaj kada se u toku prva tri sata ispitivanja, registruje potpuno ili djelimično smanjenje vrijednosti DOC (HPK), a razlika u nivou tečnosti između ispitivane grupe i kontrolne grupe ostaje neznatna.

Izvesti dodatna ispitivanja za razgraničavanje procesa biorazgradnje (ili parcijalne biorazgradnje) od procesa adsorpcije. Najpouzdaniji način da se to uradi je da se u postavci ispitivanja (najbolje respirometrijsko ispitivanje), kao inokulum upotrebe supernatant ili mulj.

Supstance su potencijano biorazgradljive, ako se u ispitivanju registruje značajno smanjenje vrijednosti DOC (HPK) koje nije poslijedica adsorpcije. Dijelimično smanjenje vrijednosti DOC (HPK), koje nije poslijedica adsorpcije, ukazuje na to da je ispitivana supstanca biorazgradljiva u određenoj mjeri. Neznatno ili nulta vrijednost smanjenja DOC (HPK) je posljedica inhibitornog djelovanja ispitivane supstance na mikroorganizme, što se primjećuje po zamućenju supernatanta. U tom slučaju ispitivanje ponoviti sa nižim koncentracijama ispitivane supstance.

Precizniji rezultati dobijaju se upotrebom najpodesnije analitičke metode. Kada se u ispitivanju koristi obilježavanje izotopom C^{14}, obrazovanje $C^{14}O_2$ potvrđuje da je došlo do biorazgradnje ispitivane supstance.

Kad su rezultati dati u smislu primarne biorazgradnje, po mogućnosti, objasniti promjenu hemijske strukture koja uzrokuje smanjenje količine polazne supstance.

Potvrda analitičke metode se prikazuje zajedno sa odgovorom dobijenim sa slijepom probom (samo medijumum, bez aktivnog mulja).

PRIMJER PROCJENE
DIO II

Organsko jedinjenje: 4-etoksibenzoeva kiselina

Teorijska koncentracija: 600 mg/l

Teorijska DOC vrijednost: 390 mg/l

Inokulum postrojenje za obradu otpadne vode iz domaćinstava

Koncentracija: 1 g/l suve materije

Adaptiranost: nije adaptiran

Ispitivanje: određivanje DOC vrijednosti

Količina uzorka: 3 ml

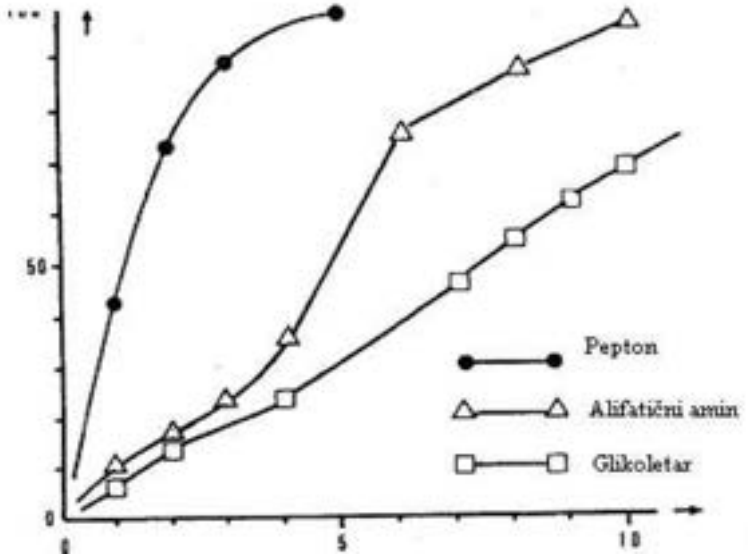
Kontrolna supstanca: dietilenglikol

Toksičnost jedinjenja: Nema toksičnog efekta u koncentraciji ispod 1.000 mg/l

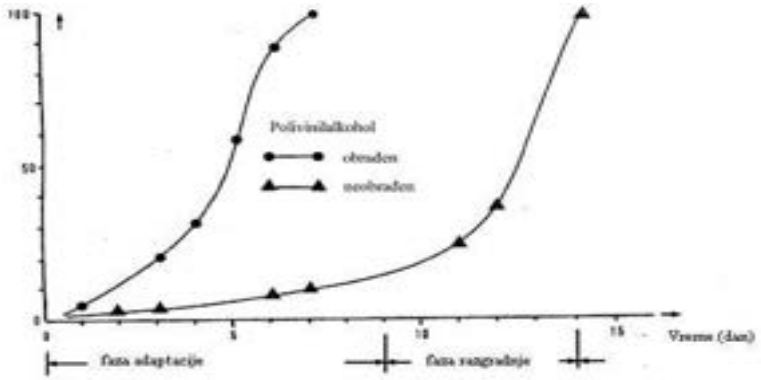
Primjenjeno ispitivanje: test fermentacije

Trajanje ispitivanja	Kontrolna supstanca				Ispitivana supstanca		
	Slijepa proba DOC (1) (mg/l)	DOC (1) (mg/l)	DOC neto (mg/l)	Razgradnja (%)	DOC (1) (mg/l)	DOC neto (mg/l)	Razgradnja (%)
0	-	-	300,0	-	-	390,0	-

3 sata	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 dan	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dana	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dana	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dana	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dana	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dana	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dana	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dana	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99
(1) Srednja vrijednost od tri mjerenja							



Slika 1: Primjer krive biorazgradnje



Slika 2. Primjer adaptacije aktivnog mulja

C.10. BIORAZGRADNJA - ISPITIVANJE SIMULACIJE AKTIVNOG MULJA

DIO I

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

1.1.1. Opšte napomene

Metoda se primjenjuje na organske supstance u koncentracijama koje se koriste u ispitivanju:

- rastvorljive u vodi za pripremu rastvora;
- imaju neznatan napon pare u uslovima definisanim ovom metodom; - ne dijeluju inhibitorno na bakterije.

Podaci o procentualnom udijelu glavnih sastojaka ispitivane supstance korisni su za tumačenje dobijenih rezultata, gdje su vrijednosti dobijenih rezultata niske ili ekstremne.

Potrebni su i podaci o toksičnosti ispitivane supstance za tumačenje niskih dobijenih vrijednosti i prilikom izbora odgovarajućih koncentracija za potrebe ispitivanja.

1.1.2. Određivanje potpune biorazgradljivosti (DOC/HPK analiza)

Metoda određivanje potpune biorazgradljivosti je određivanje potpune biološke razgradljivosti što je određeno uklanjanjem ispitivane supstance i njenih metabolita iz sistema koji simulira postrojenje sa aktivnim muljem, pri koncentraciji koja odgovara vrijednosti > 12 mg DOC/l (ili približno 40 mg HPK/l). Optimalnom vrijednošću smatra se 20 mg DOC/l (DOC je koncentracija rastvorenog organskog ugljenika, HPK je hemijska potrošnja kiseonika). Potrebno je utvrditi sadržaj organskog ugljenika (ili HPK) ispitivanog materijala.

1.1.3. Određivanje primarne biorazgradljivosti (specifična analiza)

Metode određivanja primarne biorazgradljivosti (specifična analiza) je određivanje primarne biorazgradljivosti ispitivane supstance u sistemu koji simulira postrojenje sa aktivnim muljem, pri koncentraciji ispitivane supstance od približno 20 mg/l, pomoću specifične analitičke metode (niža ili viša koncentracija ispitivane supstance se koristi ukoliko je moguće primjeniti izabranu analitičku metodu i ukoliko ispitivana supstanca u datim koncentracijama ne ipoljava toksično dejstvo). Ova analiza omogućava procjenu primarne biorazgradljivosti ispitivane supstance (nestanak polazne hemijske supstance). Cilj metode nije određivanje mineralizacije ispitivane supstance. Dostupna je odgovarajuća analitička metoda za odabranu ispitivanu supstancu.

1.2. Definicije i merne jedinice

1.2.1. DOC/HPK analiza

Stepen uklanjanja ispitivane supstance se iizračunava formulom: $DR = \frac{TEE^0}{T}$ 100% gdje je:

DR jste stepen uklanjanja ispitivane supstance izražen u procentima DOC (ili HPK) nakon unaprijed određenog retencionog perioda; T koncentracija ispitivane supstance u influentu izražena u mg DOC/l (ili u mg HPK/l); E koncentracija DOC (ili HPK) u efluentu izražena u mg DOC/l (ili u mg HPK/l); E_o koncentracija DOC (ili HPK) u efluentu u kontroli izražena u mg DOC/l (ili u mg HPK/l).

Razgradnja je procenat smanjenja DOC (ili HPK) ispitivane supstance nakon unaprijed određenog retencionog perioda

1.2.2. Specifična analiza

Procenat uklanjanja ispitivane supstance iz vodene faze (R_w) nakon unaprijed određenog vremena retencije iizračunava se formulom: Rw= _____$C^{I\ C0}$ □100% gdje je: C_I koncentracija ispitivane C_I

supstance u influentu sistema (izražena u mg/l, određeno specifičnom analizom); C_o koncentracija ispitivane supstance u efluentu sistema (izražena u mg/l, određeno specifičnom analizom).

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance za ovu metodu ispitivanja nisu određene.

1.4. Princip metode ispitivanja

Za određivanje potpune biorazgradljivosti, uporedo se izvode dva ispitivanja u dva sistema (OECD potvrdno ispitivanje ili ispitivanje sa poroznim posudama). Ispitivana supstanca dodaje se influentu jednog sistema (sintetička otpadna voda ili komunalna otpadna voda), dok se udrugi sistem uvodi samo influent. Za određivanje primarne biorazgradnje specifičnom analizom u influentu i efluentu, koristi se samo jedan sistem.

DOC (ili HPK) koncentracije mjere se u efluentu ili se koncentracija ispitivane supstance određuje specifičnim analizama.

DOC iz ispitivanog materijala se ne mjeri, već se samo navede.

Kad se određuju vrijednosti DOC (ili HPK) smatra se da razlika između srednje vrijednosti koncentracija u efluentu u kontroli i efluentu u tretmanu potiče od nerazgraĐene ispitivane supstance.

Kad se izvode specifične analize, mjeri se promjena u koncentraciji polazne supstance (primarna biorazgradljivost).

Sistemi se postave kao sistemi jedinjenjeenih jedinica, uz proceduru transinokulacije.

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Početna koncentracija ispitivane supstance zavisi od vrste primjenjene analize i njenih ograničenja.

1.6. Opis metode ispitivanja

1.6.1. Priprema

1.6.1.1. Oprema

Potrebno je rapolagati sa par sistema istog tipa, osim kad se izvode specifične analize. Koriste se dva tipa sistema:

OECD potvrdno ispitivanje

Oprema (Dio II ove metode) se sastoji od rezervoara (A) za sintetičke otpadne vode, pumpe za doziranje (B), aeratora (C), separatora (D), pumpe za recirkulaciju aktivnog mulja (E) i kolektora za tretirani efluent (F).

Posude (A) i (F) su od stakla ili pogodnog plastičnog materijala, zapremine najmanje 24 L. Pumpa za doziranje (B) obezbjeđuje stalan dotok sintetičkih otpadnih voda u aerator. Koristi se bilo koji pogodni sistem ako su obezbjeĐeni konstantan dotok i koncentracija. Tokom normalnog rada sistema otvor separatora (D) je pozicioniran tako da aerator prima zapreminu od 3 l ispitivane smješe. Perforirani difuzer vazduha (G) je postavljen u aerator (C) na sredini konusnog dna. Količina vazduha koja se uduvava u aerator prati se pomoću mjerača protoka.

Pumpa za recirkulaciju aktivnog mulja (E) postavljena je tako da se aktivni mulj iz separatora neprekidno recirkuliše u posudu za aeraciju (C).

"Porozna posuda"
Porozna posuda je napravljena od ploča poroznog polietilena (2 mm debljine, maksimalni promer pore je 95 µm), koje su oblikovane u cilindre prečnika 14 cm sa konusnom bazom pod uglom od 45° (Deo drugi Slike 1 i 2). Porozna posuda nalazi se u nepropusnoj posudi od odgovarajuće plastike, prečnika 15 cm, sa otvorom na visini od 17,2 cm na cilindričnom delu, koji određuje zapreminu (3 L) u loncu. Čvrsti potporni prsten, napravljen od odgovarajuće plastike, postavljen je oko vrha unutrašnje posude, tako da između unutarašnje i poljašnje posude postoji prostor od 0,5 cm.

Porozna posuda se postavlja u vodeno kupatilo. U osnovi unutrašnje posude su postavljeni difuzeri koji obezbjeđuju dotok vazduha.

Posude (A) i (E) su od stakla ili odgovarajuće plastike, zapremine najmanje 24 L. Pumpa za recirkulaciju aktivnog mulja (B) omogućava stalni tok sintetičke otpadne vode u aerator. Koristi se bilo koji pogodan sistem ako su obezbijeĐeni stalan dotok i koncentracija.

Potrebne su rezervne unutarašnje porozne posude ukoliko u toku rada sistema doĐe do zapušenja. Zapušene posude prastvaraju se u rastvor hipohlorita, a zatim se temeljno isperu vodom iz česme.

1.6.1.2. Filtracija

Koristi se oprema za membransku filtraciju i membranski filteri prečnika 0,45 µm. Vodi se računa da se ugljenik ne oslobađa iz membranskih filtera i da se ispitivana supstanca ne adsorbuje u toku filtracije.

1.6.1.3. Otpadna voda

Koristiti se pogodna sintetička ili komunalna otpadna voda.

Primjer sintetičke otpadne vode

U jednom litru vode iz česme rastvori se:
- 160 mg peptona,
- 10 mg mesnog ekstrakta,

- 30 mg uree,
- 7 mg NaCl,
- 4 mg $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, - 2 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ i - 28 mg K_2HPO_4.

Komunalna otpadna voda
Uzima se otpadna voda koja se preliva iz primarnog taložnika iz postrojenja koja dominantno preraĐuju komunalne otpadne vode.

1.6.1.4. Osnovni rastvor ispitivane supstance Osnovni rastvor ispitivane supstance, npr. 1%, priprema se prije izvoĐenja ispitivanja. Koncentracija ispitivane supstance je definisana, kako bi se dodala odgovarajuća zapremina osnovnog rastvora u otpadnu vodu ili direktno u sistem.

1.6.1.5. Inokulum

Kad se koristi komunalna otpadna voda, ne koristi se inokulum sa niskom koncentracijom bakterija, ali koristi aktivni mulj.

Koriste se razni inokulumi. U ovoj metodi data su tri primjera pogodnih inokuluma: inokulum iz sekundarnog efluenta, kompozitni i inokulum aktivnog mulja.

Inokulum iz sekundarnog efluenta

Inokulum se uzima iz sekundarnog efluenta zadovoljavajućeg kvaliteta prikupljenog iz postrojenja za obradu dominantno komunalnih otpadnih voda. Tokom perioda od uzimanja efluenta do njegove upotrebe, efluent se čuva u aerobnim uslovima. Za pripremu inokuluma, uzorak efluenta se filtrira kroz grubi filter, a prvih 200 ml se baca. Filtrat se čuva u aerobnim uslovima do upotrebe. Inokulum se upotrebljava isti dan po uzimanju uzorka sekundarnog efluenta. Za inokulaciju se koristi najmanje 3 ml efluenta.

Kompozitni inokulum

Za pripremu kompozitnog inokuluma koriste se tri parcijalna inokuluma:

1) inokulum iz sekundarnog efluenta; 2) inokulum iz zemljišta:

- 100 g baštenskog zemljišta (plodnog, ne sterilnog) suspenduje se u 1.000 ml nehlorisane vode za piće. (Zemljište sa izuzetno velikim udjelom gline, pijeska ili humusa nije pogodno.) Nakon miješanja, suspenzija se ostavi 30 minuta da se istaloži. Supernatant se filtrira kroz grubi filter papir, a prvih 200 ml se baca. Filtrat se aeriše odmah sve do upotrebe. Inokulum se upotrijebljava isti dan po uzorkovanju;

1) inokulum iz površinske vode:

- dio za kompozitni inokulum uzima se iz mezo-saprobne površinske vode. Uzorci se filtriraju kroz grubi papir, a prvih 200 ml se baca. Filtrat se čuva u aerobnim uslovima sve do upotrebe. Inokulum se upotrebljava isti dan po uzorkovanju.

Kompozitni inokulum se uzima iz miješavine tri parcijalna inokuluma tako što se jednake zapremine sjedine i dobro promiješaju. Za inokulaciju se upotrebljava najmanje 3 ml.

Inokulum aktivnog mulja

Uzima se najviše 3 L aktivnog mulja (sadržaj suspendovanih materija do 2,5 g/l) uzetog iz aeracionog bazena postrojenja za obradu dominantno komunalnih otpadnih voda.

1.6.2. Postupak

Ispitivanje se izvodi na sobnoj temperaturi, koja je između 18 °C i 25 °C.

Ispitivanje se izvodi i na nižim temperaturama (do 10 °C). Ako se supstanca razgrađuje, ne nastavljati ispitivanje. Ako se supstanca ne razgrađuje, ispitivanje se obavlja na stalnoj temperaturi između 18 °C i 25 °C.

1.6.2.1. Period stabilizacije: obrazovanje mulja/stabilizacija sistema

Period rasta/stabilizacije mulja je period u toku kojeg koncentracija suspendovanih materija aktivnog mulja kao i rad sistema dostiže stabilno stanje u uslovima definisanim ovom metodom. Period stabilizacije je period koji traje od trenutka uvođenja ispitivane supstance u sistem do trenutka kad proces uklanjanja supstance dostigne plato, (relativno konstantnu vrijednost). Ovaj period nije duži od šest sedmica.

Period evaluacije traje tri sedmice i to od trenutka kad uklanjanje ispitivane supstance dosegne relativno stalnu i najčešće visoku vrijednost. Za one supstance koje se u prvih šest sedmica slabo ili uopšte biološki ne razgrade, za period evaluacije se uzimaju naredne tri sedmice.

Na početku se inokulum pomiješan sa influentom uvodi u sisteme potrebne za jedno ispitivanje. Zatim se uključuje aerator (u slučaju kad se koristi sistem OECD potvrdnog ispitivanja), a uključi se i pumpa za recirkulaciju (E) aktivnog mulja) i pumpa za doziranje (B). Influent bez ispitivane supstance prolazi kroz aerator (C) brzinom 1 litar na sat ili 0,5 litara na sat, što omogućava retenciono vrijeme od 3 sata odnosno 6 sati. Stepen aeracije namjestiti tako da se onemogući taloženje sadržaja u posudi (C), dok sadržaj rastvorenog kiseonika najmanje 2 mg/l.

Stvaranje pjene se onemogućava odgovarajućim sredstvima, ali samo ukoliko ne Dijeluju ihibitorno na aktivni mulj.

Mulj koji se nakupi pri vrhu aeratora (C) (u slučaju sistema OECD potvrdnog ispitivanja pri dnu separatora (D) i u sistemu za recirkulaciju) se struganjem ili na neki drugi odgovarajući način vraće u suspenziju najmanje jednom dnevno, svaki dan.

Ako se mulj ne taloži, povećava se njegova gustina dodavanjem 2 ml 5% rastvora gvožđe-hlorida. Ovaj postupak se po potrebi ponavlja.

Efluent se prikuplja u posudi (E ili F) u toku 20 do 24 sata, a uzorak se uzima nakon temeljnog miješanja. Posuda (E ili F) se pažljivo očisti. Da bi se nadgledala i kontrolisala efikasnost postupka, mjere se hemijska potrošnja kiseonika (HPK) ili rastvoreni organski ugljenik (DOC) u filtratu nakupljenog efluenta najmanje dva puta sedmično, kao i u filtratu influenta (koristeći membrane prečnika 0,45 μm, a prvih ≈ 20 ml filtrata se baca).

Kad se uspostavi približno ujednačena dnevna razgradnja, smanjenje DOC ili HPK je ujednačeno. Sadržaj suve materije aktivnog mulja (g/l) u aeratoru određuje se dvaput sedmično. Sistemi rade na jedan od dva načina:

1) sadržaj suve materije u aktivnom mulju određuje se dvaput sedmično, pa ukoliko ga ima više od 2,5 g/l višak aktivnog mulja se odbacuje, ili
2) svakodnevno se ispušta 500 ml ispitivane smješe iz svake posude da se dobije srednje vrijeme retencije mulja od 6 dana.

Kada su izmjereni i procijenjeni parametri dva sistema dovoljno stabilni (efikasnost uklanjanja DOC ili HPK, mulj, koncentracija, taloženje mulja, zamućenost efluenta, itd.), ispitivana supstanca se dodaje influentu koji ulazi u jedan od sistema, kako je opisano u dijelu 1.6.2.2. ove metode.

Alternativno, ispitivana supstanca se dodaje na početku perioda rasta mulja (dio 1.6.2.1. ove metode), naročito kad se mulj dodaje kao inokulum.

1.6.2.2. Procedura ispitivanja

U periodu stabilizacije održavaju se konstantni uslovi rada sistema. Odgovarajuća količina rastvora ispitivane supstance (oko 1%) dodaje se u influent koji ulazi u sistem, tako da se dobije željena koncentracija ispitivane supstance (10 mg do 20 mg DOC/l ili 40 mg HPK/l) u influentu. To se postiže svakodnevnim miješanjem osnovnog rastvora ispitivane supstance sa influentom ili pomoću sekundarne pumpe. Željena koncentracija se postiže postepeno. Ukoliko ispitivana supstanca ne ipoljava toksično dejstvo na aktivni mulj, testira se i viša koncentracija.

U sistemu koji služi kao kontrola uvodi se samo influent bez ispitivane supstance. Odgovarajuće zapremine efluenta uzimaju se za analizu i filtriraju kroz membranske filtere (0,45 µm). Prvih (otprilike) 20 ml filtrata se baca.

Filtrirani uzorci se analiziraju istog dana; u suprotnom se čuvaju pogodnom metodom, npr. korišćenjem 0,05 ml 1% rastvora žive-hlorida ($HgCl_2$) na svakih 10 ml filtrata ili čuvanjem na temperaturi od 2 °C do 4 °C, najviše 24 sata ili na temperaturi nižoj od -18°C u toku dužeg vremena.

Period stabilizacije, uz dodatak ispitivane supstance, ne traje duže od 6 sedmica i period evaluacije nije kraći od 3 sedmice, odnosno za iizračunavanje konačnog rezultata potrebno je oko 14 do 20 rezultata mjerenja.

IzvoĐenje sa jedinjenjeenim sistemima

Jedinjenjeeni sistemi rade tako da jednom dnevno između dva sistema dolazi do razmjene 1,5 L ispitivane smješe (uključujući mulj) iz aeratora za aktivni mulj. U slučaju da ispitivana supstanca podliježe adsorpciji, uzima se 1,5 L tečnog supernatanta iz taložnika jednog sistema i presipa u posude sa aktivnim muljem drugog sistema.

1.6.2.3. Analiza

U cilju praćenja osobina supstance vrše se dvije vrste analiza: DOC i HPK.

Koncentracije DOC određuju se u dva ponavljanja pomoću analizatora ugljenika, odnosno vrijednosti HPK prema literaturi[36].

Specifična analiza

Koncentracije ispitivane supstance određuju se odgovarajućim analitičkim postupkom. Odrediti i količinu supstance koja se adsorbuje na aktivni mulj.

2. Podaci i procjena

2.1. Jedinjenjeeni sistemi

Kad se koriste jedinjenjeeni sistemi, dnevni stepen uklanjanja (u daljem tekstu: DR) iizračunava se na način opisan u dijelu 1.2.1. ove metode. DR se formulom (2) koriguje na DRc zbog prenosa ispitivane supstance na opisani način za srednje vrijeme retencije od 3 sata ili formulom (3) za srednje vrijeme retencije od 6 sati.

$$DRc = \frac{4}{3} DR \frac{100}{3}$$

$$DRc = \frac{8}{7} DR \frac{100}{7}$$

iizračunava se srednja vrijednost i standardne devijacije za seriju vrijednosti DRc

prema jednačini (4): $S_{DRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (DRc - DRci)^2}{n-1}}$ gdje je: $\frac{S_{DRC}}{DR}$ je standardna defijacija za niz DRc vrijednosti; c = srednja vrijednost DRc; n broj određivanja.

Ekstremne vrijednosti u nizu vrijednosti DRc odbacuju se odgovarajućim statističkim postupkom, npr. Nalimovim postupkom, uz nivo vjerovatnoće od 95%, pa se srednja vrijednost i standardna devijacija ponovo iizračunavaju za skup podataka DRc bez ekstremnih vrijednosti.

Konačan rezultat iizračunava se prema jednačini: $DRc = DRc \pm t_{n-1;\alpha} \frac{DRc}{\sqrt{n}}$ gdje je: $t_{n-1;\alpha}$ jeste tabelarna vrijednost t za n vrijednost parova E i E_o i statistička pouzdanost P (P = 1- α) i time je P na 95%[1].

Rezultat se izražava kao srednja vrijednost sa 95% intervalima povjerenja, standardnim devijacijama i brojem podataka u skupu podataka DRc bez ekstremnih vrijednosti, te brojem ekstremnih podataka, npr:

DRc = 98,6 ± 2,3% uklonjenog DOC; c je 4,65% uklonjenog DOC; n jeste 18; x jeste broj ekstremnih vrijednosti.

[36] OECD, (2002) Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris

2.2. Odvojeni sistemi

Rad sistema se provjerava pomoću sljedećeg izraza: procenat uklanjanja ili DOC= *CODiliDOC*inf *luenta CODiliDOCefluenta*
_____ 100 *CODiliDOC*inf *luenta*

Ove vrijednosti za dnevno uklanjanje DOC ili HPK se prikazuju grafički da bi se uočilo postojanje nekog trenda, npr. aklimatizacije.

2.2.1. Određivanje HPK/DOC

Kako se iizračunava DR dato je u dijelu 1.2.1.

Izračuna se srednja vijrednost za serije vrijednosti DR. Uz to se računa i standardna devijacija

prema sljedećem izrazu: $S_{DR}=\sqrt{\frac{\sum_{i\ 1}^{n} DR \quad DR_i^{\ 2}}{n \quad 1}}$ gdje su: SDR srednja devijacija serije DRc vrijednosti, DR srednja vrijednost DRc vrijednosti:n broj određivanja.

Ekstremne vrijednosti u nizu vrijednosti DRc se odbacuju odgovarajućim statističkim postupkom, npr. Nalimovim postupkom, uz nivo vjerovatnoće od 95%, pa se srednja vrijednost i standardna devijacija ponovo iizračunavaju za skup podataka DRc bez ekstremnih vrijednosti. Konačan rezultat se zatim izračuna prema formuli kao:

$t^{n1,}$; *DR* gdje je: t_{n-1};α - tabelarna vrijednost t za n vrijednost parova E i E_o i statistička DR=DR $\frac{\quad}{\sqrt{n}}$
pouzdanost P (P = 1- α) čime je P postavljen na 95%[1].

Rezultat se izražava kao srednja vrijednost sa 95% intervalima povjerenja, standardnim devijacijama i brojem podataka u skupu DR bez ekstremnih vrijednosti, te brojem ekstremnih vrijednosti, npr: DR = (98,6 ± 2,3)% uklonjenog DOC; c = (4,65)% uklonjenog DOC; n = 18; x = broj odstupajućih vrijednosti.

2.2.2. Primjena specifične analize

Kako se iizračunava procenat uklanjanja ispitivane supstance iz vodene faze (R_w) dato je u dijelu 1.2.2.

3. Izvještaj

3.1. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj sadrži sljedeće:

- obrazac dat u Dijelu III, sa opisanim uslovima u ispitivanju;
- odabrani sistem (OECD potvrdno ispitivanje ili "porozna posuda");
- odabrani način rada, jedinjenjeeni sistem ili neki drugi;

- vrstu otpadnih voda: sintetičke ili komunalne otpadne vode (u slučaju komunalne otpadne vode navesti datum i mjesto uzorkovanja);
- vrstu inokuluma, sa datumom i mjestom uzorkovanja;
- opis primjenjenog analitičkog postupka, ukoliko su se obavljale specifične analize;
- grafički prikaz vrijednosti uklanjanja HPK ili DOC u funkciji vremena, uključujući period stabilizacije i period evaluacije;
- efikasnost analitičke metode za određivanja sadržaja ispitivane supstance preko

vrijednosti HPK ili DOC za osnovni rastvor ispitivane supstance;

- ukoliko su rađene specifične analize, grafički prikaz vrijednosti procenta uklanjanja ispitivane supstance iz vodene faze u funkciji vremena (period stabilizacije i period evaluacije);
- srednja vijrednost i standardna devijacija uklanjanja DOC ili HPK ispitivane supstance iizračunavaju se iz podataka za period evaluacije, odnosno kad postoji ravnodnosno

uklanjanje ispitivane supstance ili period ustaljenog rada jedinica sistema;

- grafički prikaz koncentracije aktivnog mulja u funkciji vremena;
- sve napomene u vezi sa aktivnim muljem (odbacivanje suviška mulja, pojave agregacije,

$FeCl_3$ itd);

- koncentracije ispitivane supstance korišćene u ispitivanju;
- svi rezultati u vezi sa aktivnim muljem;
- svi podaci i rezultati ispitivanja u vezi sa ispitivanom i referentnim supstancama, ako su korišćene;
- naučno opravdani razlozi za eventualne izmjene postupka ispitivanja.

3.2. Tumačenje rezultata

Nizak stepen uklanjanja ispitivane supstance iz vodene faze je poslijedica inhibitornog djelovanje ispitivane supstance na mikroorganizame aktivnog mulja. Ovo se, dokazuje opažanjem lize ćelija mikroorganizama i gubitka mulja, što daje zamućeni supernatant, kao i smanjenja efikasnosti rada postrojenja u uklanjanju HPK (ili DOC).

Ponekad imaju uticaja fizičko-hemijska adsorpcija. Razlike između biološkog djelovanja na molekul i fizičko-hemijske adsorpcije se otkrivaju analizom mulja nakon odgovarajuće desorpcije.

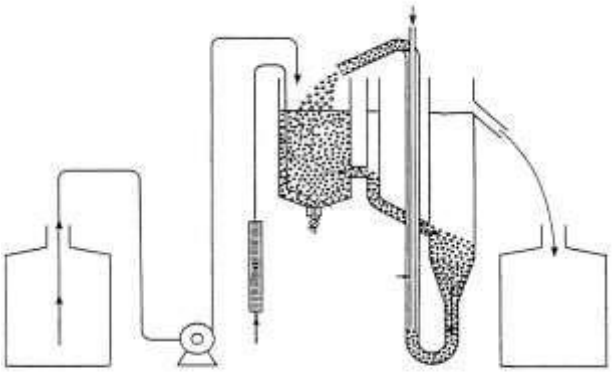
Dodatna ispitivanja su potrebna ukoliko se žele razlučiti procesi biološke razgradnje (ili djelimične biološke razgradnje) od adsorpcije.

To se radi na nekoliko načina, ali najbolje je koristiti supernatant za inokulum u bazičnom ispitivanju (najbolje respirometrijsko ispitivanje).

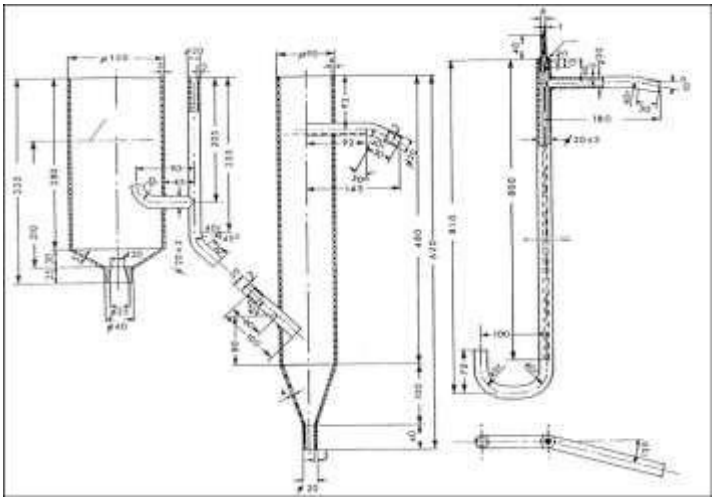
Ako se primjeti visok stepen uklanjanja DOC ili HPK, onda je to poslijedica biorazgradnje. Pri nižem stepenu uklanjanja, proces biorazgradnje ne razlikuje se od procesa eliminacije. Na primjer, ako jedinjenje rastvorljivo u vodi pokazuje visok stepen adsorpcije od 98%, a dnevna stopa potrošnje mulja veća je za 10%, moguća je eliminacija do 40%; pri višku stope potrošnje mulja od 30%, eliminacija zbog adsorpcije na suvišak mulja i uklanjanja zajedno sa tim suviškom mulja naraste i na 65%[4].

Kad se izvode specifične analize, obratiti pažnju na odnos strukture supstance i vrste analiza koje se rade. U ovom slučaju, uočeni fenomen ne tumači se kao mineralizacija supstance.

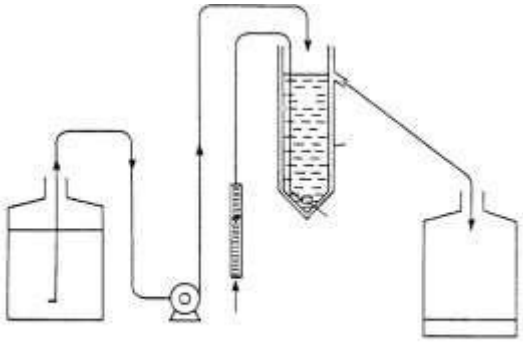
DIO II



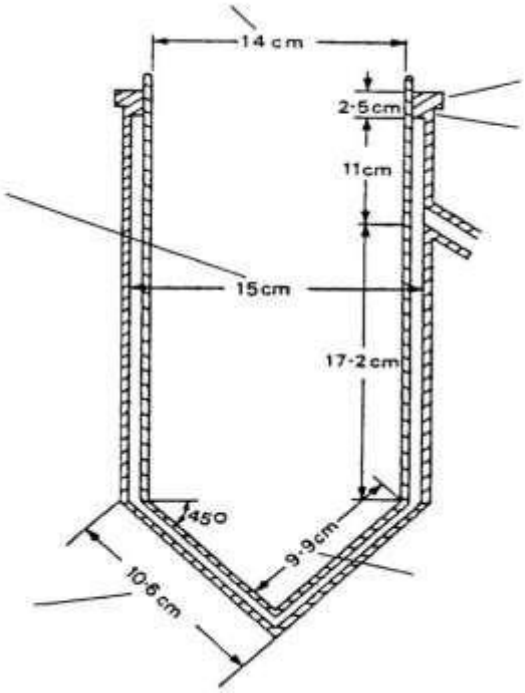
A rezervoar, B pupma za doziranje, C aerator, D taložnik, E pumpa za recirkulaciju mulja, F kolektor, G difuzer vazduha, H mjerač protoka vazduha



DIO III



Slika 1: Oprema koja se koristi za procjenu biorazgradljivosti A rezervoar; B pumpa za doziranje; C porozna posuda za aeraciju; D poljni nepropustljivi ventil; E kolektor; F difuzer vazduha; H – rotometar (opciono)



Slika 2: Shema trolitarske porozne posude za aeraciju

DIO IV
USLOVI U ISPITIVANJU SIMULACIJE AKTIVNOG MULJA

Upisati za svaku grupu

Oprema-vrsta sistema

OECD potvrdno ispitivanje
„porozna posuda||

Način izvoĐenja ispitivanja

Pojedinačni
Jedinjenjeeni sistemi
Ne jedinjenjeeni sistemi

Transinokulacija

Ne
Aktivan mulj
Supernatant

Srednje retenciono vrijeme

3 sata
6 sati

Otpadna voda

Komunalna otpadna voda
Sintetička otpadna voda

Inokulum

Sekundarni efluent
Kompozit
Aktivni mulj

Uvođenje ispitivane supstance

Na početku ispitivanja
Postepeno uvođenje
Nakon stabilizacije aktivnog mulja

Analize

Specifične analize
Određivanje HPK
Određivanje DOC

C.11. AKTIVNI MULJ, ISPITIVANJE INHIBICIJE RESPIRACIJE (OKSIDACIJA UGLJENIKA I AMONIJAKA)

1. UVOD

Ova metoda ispitivanja ekvivalentna je smjernici OECD-a za ispitivanje (TG) 209 (2010). Ova metoda ispitivanja opisuje metodu za određivanje efekata hemikalije na mikroorganizme iz aktivnog mulja (uglavnom bakterije) mjerenjem njihove stope respiracije (oksidacija ugljenika i/ili amonijaka) pod definisanim uslovima u prisustvu različitih koncentracija hemikalije koja se ispituje. Metoda ispitivanja zasniva se na ispitivanju ETAD-a (Ekološko i toksikološko udruženje industrije za proizvodnju boja) (1) (2), na prethodnoj smjernici OECD-a TG 209 (3) i revidovanom ISO standardu 8192 (4). Svrha ispitivanja je da se obezbijedi brza orijentaciona metoda da bi se ocijenili efekti hemikalija na mikroorganizme aktivnog mulja iz biološke (aerobne) faze postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda. Rezultati ispitivanja mogu poslužiti i kao indikator za odgovarajuće

neinhibitorne koncentracije ispitivanih hemikalija koje će se upotrebljavati u ispitivanjima biorazgradljivosti (na primjer poglavlja C.4 A-F, C.9, C.10, C12 i C.29 ovog aneksa, OECD TG302C). U tom slučaju, ispitivanje se može izvršiti kao skrining test, slično kao test za određivanje raspona ili granično ispitivanje (v. stav 39), uzimajući pritom u obzir samo sveukupnu respiraciju. Međutiim, te informacije treba obazrivo koristiti za testove brze biorazgradljivosti (poglavlja C.4 A-F i C.29 ovog aneksa) za koje je koncentracija inokuluma značajno niža on one koja se koristi u ovoj metodi ispitivanja. Zapravo, odsustvo inhibicije u ovom ispitivanju respiracije ne dovodi automatski do neinhibitornih uslova u testu brze biorazgradljivosti iz poglavlja C.4 A-F ili C.29 ovog aneksa.

Sve u svemu gledano, čini se da se ispitivanje inhibicije respiracije uspješno primjenjuje otkada je prvi put objavljeno, ali u nekim prilikama dobijani su netačni rezultati, npr. (2) (4) (5). Tako su ponekad krive respiracije koje su povezane sa koncentracijom dvofazne, grafici koji predstavljaju odnos doza-odgovor su iskrivljene, dok su vrijednosti EC50 bile neočekivano niske (5). Istraživanja su pokazala da su takvi rezultati dobijani onda kada dođe do značajne nitrifikacijie aktivnog mulja koji se koristi u ispitivanju i kada hemikalija koja se ispituje ima veći uticaj na oksidaciju amonijaka nego na opštu heterotrofnu oksidaciju. Stoga se ti netačni rezultati mogu prevazići izvođenjem dodatnog ispitivanja uz upotrebu specifičnog inhibitora nitrifikacije. Mjerenjem brzine potrošnje kiseonika u prisustvu odnosno odsustvu takvog inhibitora, npr. N-alliltiouree (ATU), mogu se posebno izračunati brzina ukupne potrošnje kiseonika, brzina heterotrofne potrošnja kiseonika i brzina potrošnje kiseonika nitrifikacijom (4) (7) (8). Na taj način mogu se odrediti inhibitorni efekti hemikalije koja se ispituje na oba procesa i na uobičajen način izračunati vrijednosti EC50 za oksidaciju organskog ugljenika (heterotrofnu) i za oksidaciju amonijaka (nitrifikaciju). Treba napomenuti da u nekim rijetkim slučajevima inhibitorni efekat N-alliltiouree može biti djelimično ili potpuno poništen kao rezultat ssupstancaanja složenih jedinjenja sa hemikalijama koje se ispituju ili sa suplementima za medijumum, npr. Cu++ joni (6). Cu++ joni su od suštinske važnosti za Nitrosomonas, ali su u većim koncentracijama toksični.

Potreba za nitrifikacijom u aerobnom prečišćavanju otpadnih voda, kao koraka u postupku uklanjanja jedinjenja azota iz otpadnih voda koji se putem denitrifikacije prevode u gasovite proizvode, postala je hitna naročito u evropskim zemljama; EU je sada utvrdila niže granične vrijednosti za koncentraciju azota u prečišćenim efluentima koji se ispuštaju u recipijent.

U većini slučajeva dovoljna je metoda procjene uticaja samo na oksidaciju organskog ugljenika. Međutiim, u nekim slučajevima je za tumačenje rezultata i razumijevanje efekata potrebno proučavanje efekta samo na nitrifikaciju ili posebno na nitrifikaciju i posebno na oksidaciju
organskog ugljenika.

1.1. Načelo metode ispitivanja

Stope respiracije uzoraka aktivnog mulja hranjenog sintetičkim otpadnim vodama mjere se u zatvorenoj ćeliji koja sadrži kiseonikovu elektrodu nakon vremena kontakta od 3 sata. U zavisnosti od ssupstancanog scenarijuma izloženosti, može biti potrebno i duže vrijeme kontakta. Ako se ispitivana hemikalija brzo razgrađuje, npr. abiotički preko hidrolize, ili je isparljiva, pa se koncentracija ne može na odgovarajući način održati, tada se može upotrijebiti i kraći period izlaganja, od npr. 30 minuta. Osjetljivost svake šarže aktivnog mulja treba provjeriti uz pomoć odgovarajuće referentne hemikalije na dan izlaganja. Ispitivanje se obično koristi za određivanje vrijednosti ECx (npr. EC50) hemikalije koja se ispituje i/ili najveće koncentracije bez vidljivog efekta (NOEC).

Inhibicija potrošnje kiseonika od strane mikroorganizama koji oksidiraju organski ugljenik može se posebno izraziti od inhibicije potrošnje kiseonika od strane mikroorganizama koji oksidiraju amonijak i to putem mjerenja stope potrošnje kiseonika u odsustvu odnosno prisustvu N-aliltiouree, specifičnog inhibitora oksidacije amonijaka u nitrite koju u prvoj fazi vrše nitrifikacione bakterije. U tom slučaju, procenat inhibicije stope potrošnje kiseonika računa se poređenjem stope potrošnje kiseonika u prisustvu hemikalije koja se ispituje sa srednjom vrijednošću stope potrošnje kiseonika u odgovarajućim kontrolisanim grupama koje uopšte ne sadrže hemikaliju koja se ispituje, kako u prisustvu tako i u odsustvu specifičnog inhibitora N-aliltiouree.

Svaka potrošnja kiseonika koja potiče od abiotičkih procesa može se otkriti određivanjem stope potrošnje kiseonika u smješama koje se sastoje od ispitivane hemikalije, medijumuma od sintetičkih otpadnih voda i vode, bez aktivnog mulja.

1.2. Informacije o hemikaliji koja se ispituje

Za ispravno tumačenje rezultata do kojih će se doći potrebno je znati identifikaciju (po mogućstvu CAS broj), naziv (IUPAC), čistoću, rastvorljivost u vodi, pritisak pare i adsorpcione karakteristike hemikalije koja se ispituje. Najčešće se isparljive hemikalije ne mogu na odgovarajući način ispitivati bez preduzimanja posebnih mjera predostrožnosti.

1.3. Primjenljivost metode ispitivanja

Metoda ispitivanja može se primijeniti na hemikalije koje su rastvorljive u vodi, slabo rastvorljive u vodi i na isparljive hemikalije. Međutiim, nije uvijek moguće dobiti vrijednosti EC50 sa hemikalijama ograničene rastvorljivosti, dok se sa isparljivim hemikalijama validni rezultati mogu dobiti samo pod uslovom da na kraju perioda izlaganja veliki dio (recimo >80%) hemikalije koja se ispituje ostane u
reakcionoj smješi. Ako postoji ikakva nesigurnost u pogledu postojanosti ili isparljivosti hemikalije koja se ispituje, potrebno je dostaviti dodatne prateće analitičke podatke kako bi se bliže odredila koncentracija ECx.

1.4. Referentne hemikalije

Referentne hemikalije treba periodično testirati kako bi se osiguralo da su metoda i uslovi ispitivanja pouzdani i da bi se provjerila osjetljivost svake šarže aktivnog mulja koji se koristi kao mikrobski inokulum na dan izlaganja. Hemikalija 3,5-dihlorofenol (3,5-DCP) preporučuje se kao referentna inhibitorna hemikalija, pošto je to poznati inhibitor respiracije i koristi se u mnogim vrstama ispitivanja inhibicije/toksičnosti (4). TakoĐe se kao referentna hemikalija za inhibiciju ukupne respiracije može koristiti bakar (II) sulfat pentahidrat (9). N-metilanilin se može koristiti kao specifični referentni inhibitor nitrifikacije.

1.4.1. Kriterijumi validnosti i reproduktivnosti

Stopa potrošnje kiseonika u slijepim probama (bez hemikalije koja se ispituje ili referentne hemikalije) ne treba da bude manja od 20 mg kiseonika po jednom gramu aktivnog mulja (suva masa suspendovanih čvrstih čestica) na sat. Ako je stopa manja, ispitivanje treba ponoviti sa ispranim aktivnim muljem ili sa muljem iz drugog izvora. Koeficijent varijacije stope potrošnje kiseonika u ponavljanjima kontrolne grupe ne treba da bude veći od 30% na kraju konačnog testa.

U meĐulaboratorijaskom uporednom ispitivanju koje je organizovala ISO 2004. godine, u kojem je korišćen aktivni mulj dobijen iz komunalnih otpadnih voda, utvrĐeno je da se EC50 za 3,5-DCP kreće u rasponu od 2 mg/l do 25 mg/l za ukupnu respiraciju, od 5 mg/l do 40 mg/l za heterotrofnu respiraciju i od 0,1 mg/l do 10 mg/l za respiraciju povezanu sa nitrifikacijom. Ako se EC50 za 3,5DCP ne kreće u očekivanom rasponu, ispitivanje treba

ponoviti sa aktivnim muljem iz drugog izvora. Vrijednost EC50 za bakar (II) sulfat pentahidrat trebalo bi da se kreće u rasponu od 53-155 mg/l za ukupnu respiraciju (9).

1.4.2. Opis metode ispitivanja

1.4.2.1. Ispitne posude i aparatura

Potrebno je koristiti uobičajenu laboratorijasku opremu i sljedeće:

(a) ispitne posude — na primjer, laboratorijaske čaše od 1 000 ml u koje će se sipati 500 ml reakcione smješe;

(b) ćeliju i dodatke za mjerenje koncentracije rastvorenog kiseonika; odgovarajuću kiseonikovu elektrodu; zatvorenu ćeliju za držanje uzorka bez slobodnog prostora iznad njega i uređaj za bilježenje (npr. 7, 8, 9 na sl.1 Dodatka 2); umjesto toga, može se koristiti BPK boca sa odgovarajućim cjevastim adapterom za zaptivanje kiseonikove elektrode uz grlo boce (v. sl. 2 Dodatka 3). Kako ne bi došlo do gubitka istisnute tečnosti po ubacivanju kiseonikove elektrode, savjetuje se da se kroz cjevasti adapter prvo ubaci lijevak ili staklena cjevčica, ili da se koriste posude s obodom izvijenim napolje. U oba slučaja potrebno je koristiti magnetnu mješalicu ili neko drugo sredstvo za miješanje, npr. samomiješajuću sondu;

(c) magnetne mješalice i magnetni štapići, obloženi inertnim materijalom, za korišćenje u mjernoj komori i/ili u ispitnim posudama;

(d) uređaj za aeraciju: ako je neophodno, komprimovani vazduh treba propustiti kroz odgovarajući filter da bi se otklonili prašina i ulje i kroz boce za ispiranje koje sadrže vodu da bi se vazduh ovlažio. Potrebno je izvršiti aeraciju sadržaja posuda uz pomoć Pasterovih pipeta ili drugih uređaja za aeraciju koji ne adsorbuju hemikalije. Orbitalna treskalica koja radi na orbitalnim brzinama između 150 i 250 obrtaja u minutu sa staklenim bocama zapremine od npr. 2000 ml može se koristiti kako bi se zadovoljila potreba mulja za kiseonikom i prevazišle teškoće sa hemikalijama koje proizvode previše pjene, koje su isparljive pa se zato gube ili se teško disperguju ako se aeracija vrši raspršivanjem vazduha. Sistem za ispitivanje obično se sastoji od određenog broja laboratorijaskih čaša u kojima se neprekidno vrši aeracija, postavljenih sekvencijalno (npr. u razmacima od oko 10-15 minuta), a koje se potom sekvencijalno analiziraju. Mogu se koristiti i provjereni instrumenti koji omogućavaju da se aeracija vrši istovremeno sa mjerenjem stope potrošnje kiseonika;

(e) pH-metar;

(f) centrifugu, klasičnu stonu centrifuge za mulj koja može postići 10 000 m/s2.

Reagensi

Stalno treba koristiti reagense analitičkog stepena čistoće.

Voda

. Potrebno je koristiti destilovanu ili dejonizovanu vodu, koja sadrži manje od 1 mg/l DOC, osim kada je naznačeno da se koristi voda iz slavine koja ne sadrži hlor.

Sintetičke otpadne vode

Potrebno je pripremiti medijumum koji sadrži sljedeće sastojke u navedenim količinama:

— pepton 16 g
— mesni ekstrakt (ili uporedivi biljni ekstrakt) 11 g
— urea 3 g
0,7 g
0,4 g
— natrijum hlorid (NaCl) 0,2 g
— kalcijum hlorid dihidrat (CaC12, 2H2O) 2, 8 g

— magnezijum sulfat heptahidrat (MgSO4, 7H2O)
— bezvodni kalijum monohidrogenfosfat (K2HPO4) — destilovana ili dejonizovana voda do 1l

Potrebno je da pH ovog rastvora bude 7,5 ± 0,5. Ako se pripremljeni medijumum ne koristi odmah, potrebno ga je čuvati na tamnom mjestu na temperaturi od 0 °C do 4 °C najduže 1 sedmicu, ili u uslovima koji neće izmijeniti njegov sastav. Treba napomenuti da je ova sintetička otpadna voda stostruki koncentrat otpadnih voda opisanih u Tehničkom izvještaju OECD-a —Predložena metoda za određivanje biorazgradljivosti surfaktanata koji se koriste u sintetičkim deterdženima|| od 11. juna 1976. godine, sa dodatkom dikalijum hidrogenfosfata.

Druga mogućnost je da se sastojci medijumuma pojedinačno sterilišu prije skladištenja, ili da se pepton i mesni ekstrakt dodaju neposredno prije izvoĐenja ispitivanja. Prije upotrebe, medijumum
treba dobro promiješati i po potrebi korigovati vrijednost pH na 7,5 ± 0,5.

1.4.2.2. Hemikalija koja se ispituje

Potrebno je pripremiti osnovni rastvor za supstance koje se ispituju a koje se lako rassupstancaaju u vodi, ali samo do maksimalne rastvorljivosti u vodi (taloženje nije prihvatljivo). Supstance koje se slabo rassupstancaaju u vodi, smješe sa komponentama različite rastvorljivosti u vodi i adsorptivne supstance treba direktno odmjeriti u ispitne posude. U tim slučajevima upotreba osnovnih rastvora može biti alternativno rješenje, ako su rastvorene koncentracije hemikalija koje se ispituju analitički određene u ispitnim posudama (prije dodavanja aktivnog mulja). Ako se pripremaju frakcije WAF, analitičko određivanje rastvorenih koncentracija hemikalija koje se ispituju, u ispitnim posudama, takoĐe je od suštinske važnosti. Treba izbjegavati upotrebu organskih rassupstancaača, sredstava za dispergovanje/emulgatora za poboljšanje rastvorljivosti. Obrada ultrazvukom osnovnih rastvora i suspenzija koje nijesu promiješane, npr. preko noći, moguća je ako postoji dovoljno rapoloživih informacija o postojanosti hemikalije koja se ispituje u takvim uslovima.

Hemikalija koja se ispituje može nepovoljno uticati na vrijednost pH u sistemu za ispitivanje. Vrijednost pH u smješama tretiranim hemikalijom koja se ispituje treba odrediti prije započinjanja ispitivanja, i to putem preliminarne probe, da bi se provjerilo da li će biti neophodno korigovati vrijednost pH prije glavnog ispitivanja i ponovo na dan glavnog testa. Ako je neophodno, rastvore/suspenzije u vodi hemikalije koja se ispituje treba neutralisati prije dodavanja inokuluma. Međutiim, obzirom da neutralizacija može izmijeniti hemijska svojstva hemikalije, u zavisnosti od cilja studije može se izvršiti dodatno ispitivanje, da bi se ocijenio efekat ispitivane hemikalije na mulj bez korigovanja pH vrijednosti.

Toksični efekti isparljivih hemikalija, naročito u ispitivanjima u kojima se vazduh uvodi u sistem u obliku mjehurića, mogu biti različite jačine zbog gubljenja supstance u toku perioda izloženosti. Takve supstance iziskuju oprez na način što se kontrolne smješe koje sadrže tu supstancu podvrgnu analizi specifičnoj za tu supstancu i prilagodi režim aeracije.

1.4.2.3. Referentna hemikalija

Ako se kao referentna hemikalija koristi 3,5-dihlorofenol, potrebno je pripremiti rastvor 1,00 g 3,5dihlorofenola u 1 000 ml vode (15). Treba koristiti toplu vodu i/ili obradu ultrazvukom kako bi se ubrzalo rastvaranje i kako bi rastvor dobio konačnu zapreminu kada se ohladi na sobnu temperaturu. Međutiim, potrebno je obezbijediti da se struktura referentne hemikalije ne promijeni. Vrijednost pH rastvora treba provjeriti i prema potrebi korigovati uz pomoć NaOH ili H2SO4 tako da pH bude 7 - 8.

Ako se kao referentna hemikalija koristi bakar(II)sulfat pentahidrat, tada se koriste koncentracije od
58 mg/l, 100 mg/l i 180 mg/l (faktor 1,8). Supstanca se direktno odmjerava u ispitne posude (29 - 50 - 90 mg za 500 ml ukupne zapremine). Potom se rassupstancaa sa 234 ml vodom sa slavine sterilizovanom u autoklavu. Bakar(II)sulfat pentahidrat lako se rassupstancaa. Kada ispitivanje počne, dodaje se 16 ml sintetičke otpadne vode i 250 ml aktivnog mulja.

1.4.2.4. Specifični inhibitor nitrifikacije

Potrebno je pripremiti osnovni rastvor N-aliltiouree (ATU) u koncentraciji od 2,32 g/l. Kada se 2,5 ml ovog osnovnog rastvora doda u inkubacionu smješu konačne zapremine od 500 ml, dobija se konačna koncentracija od 11,6 mg ATU/l (10– 4 mol/l), za koju je poznato da je dovoljna (4) da prouzrokuje 100-procentnu inhibiciju nitrifikacije u nitrifikujućem aktivnom mulju koji sadrži 1,5 g/l suspendovanih čvrstih čestica.

Abiotička kontrola

U nekim uslovima koji se rijetko javljaju, hemikalija koja se ispituje sa jakim redukujućim svojstvima može prouzrokovati mjerljivu abiotsku potrošnju kiseonika. U takvim slučajevima neophodno je izvršiti abiotičke kontrole da bi se napravila razlika između abiotičke potrošnje kiseonika od strane hemikalije koja se ispituje i mikrobne respiracije. Abiotičke kontrole mogu se pripremiti tako što se iz ispitnih smješa izostavi inokulum. Slično tome, abiotičke kontrole bez inokuluma mogu se uvesti i pri vršenju pratećih analitičkih mjerenja radi određivanja postignute koncentracije u toku ispitne faze izloženosti, npr. kada se koriste osnovni rastvori hemikalija slabo rastvorljivih u vodi sa komponentama različite rastvorljivosti u vodi. U posebnim slučajevima može biti neophodno pripremiti abiotičku kontrolu sa sterilizovanim inokulumom (npr. obradom u autoklavu ili dodavanjem sterilišućih toksikanata). Neke hemikalije mogu proizvoditi ili trošiti kiseonik sa mo ako je površina dovoljno velika za reakciju, iako im je za to obično potrebna mnogo veća temperatura ili pritisak. S tim u vezi, posebnu pažnju treba posvetiti peroksi-supstancama. Sterilizovani inokulum obezbjeđuje veliku površinu.

Inokulum

Za opštu upotrebu, aktivni mulj treba prikupiti sa izlaza iz bazena za aeraciju ili u blizini izlaza iz bazena postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda koje dobro funkcioniše i koje pretežno prečišćava komunalne otpadne vode. U zavisnosti od cilja ispitivanja, mogu se koristiti i druge odgovarajuće vrste ili izvori aktivnog mulja, npr. mulj uzgajan u laboratorijai, i to pri odgovarajućim koncentracijama suspendovanih čvrstih čestica u od 2 g/l do 4 g/l. Međutiim, muljevi iz različitih postrojenja za prečišćavanje vjerovatno će pokazivati različite karakteristike i osjetljivost.

Mulj se može koristiti onakav kakav je prikupljen, ali je potrebno odstraniti grube čestice kratkotrajnim taloženjem od npr. 5 do 15 minuta i pretakanjem gornjeg sloja koji sadrži sitnije čvrste čestice, ili prosijavanjem (npr. kroz sito veličine okca od 1 mm2). Drugi način je da se mulj homogenizuje u blender oko 15 sekundi ili duže, ali je potrebno biti obazriv u pogledu sila smicanja i temperaturne promjene do koje bi moglo doći pri dugotrajnom blendiranju.

Mulj se ispere, npr. ako je stopa endogene respiracije mala. Mulj prvo treba centrifugirati onoliko dugo koliko je potrebno da se dobije bistar površinski sloj tečnosti i granulat čvrstih čestica komunalnih otpadnih voda, npr. 10 minuta na oko 10 000 m/s2. Površinski sloj tečnosti treba ukloniti, a mulj ponovo suspendovati mućkanjem u vodi sa slavine, koja ne sarži hlor, a potom vodu koja je poslužila za ispiranje treba odstraniti ponovnim centrifugiranjem i baciti je. Ako je potrebno, postupak ispiranja i centrifugiranja treba ponoviti. Potrebno je odrediti suvu masu poznate zapremine ponovo suspendovanog mulja, a mulj koncentrisati odstranjivanjem tečne frakcije ili dodatno razblažiti vodom sa slavine koja ne sadrži hlor kako bi se dobila potrebna koncentracija čvrstih čestica mulja od 3 g/l. Aktivni mulj treba neprekidno aerisati (npr. 2l/minut) na ispitnoj temperaturi i, ako je moguće, upotrijebiti ga onog dana kada je prikuljen. Ako to nije moguće, mulj treba još dva dana svakodnevno prihranjivati sintetičkom otpadnom vodom (50 ml sintetičke otpadne vode/l aktivnog mulja). Mulj se tada upotrebljava za ispitivanje a rezultati se prihvataju kao valjani, pod uslovom da nije došlo do nikakve značajne promjene u njegovoj aktivnosti, što se procjenjuje na osnovu njegove stope endogene heterotrofne respiracije i stope respiracije povezane sa nitrifikacijom.

Poteškoće mogu nastati ukoliko u toku inkubacije doĐe do tolikog pjenušanja da se pjena i njome nošene čvrste čestice mulja izliju iz posuda za aeraciju. Povremeno, pjenušanje je jednostavno posljedica prisustva sintentičke otpadne vode, ali pjenušanje treba predvidjeti ako je hemikalija koja se ispituje surfaktant ili ga sadrži u sebi. Gubljenje čvrstih čestica mulja iz ispitivanih smješa dovodi do vještački sniženih stopa respiracije koje se pogrešno mogu protumačiti kao rezultat inhibicije. Uz to, aeracija rastvora surfaktanta dovodi do koncentracije surfaktanta u sloju sastavljenom od pjene; gubitak pjene iz ispitnog sistema smanjuje koncentracije izlaganja.
Pjenušanje se može kontrolisati jednostavnim mehaničkim metodama (npr. povremenim ručnim miješanjem staklenim štapićem) ili dodavanjem agensa protiv pjenušanja u obliku silikonske emulzije bez surfaktanata i/ili upotrebom metoda aeracije mućkanjem u staklenom balonu. Ako je problem povezan sa prisustvom sintetičke otpadne vode, sastav otpadne vode treba izmijeniti dodavanjem reagensa protiv pjenušanja u količini od npr. 50 µl/l. Ako je pjenušanje prouzrokovano hemikalijom koja se ispituje, količina potrebna za suzbijanje pjenušanja određuje se pri maksimalnoj ispitnoj koncentraciji, a potom se sve pojedinačne posude za aeraciju tretiraju identično (uključujući i posude u kojima nema pjene, npr. posude za slijepe probe i referentne posude). Ako se koriste agensi za sprječavanje pjenušanja, ne smije doći do interakcije sa inokulumom i/ili hemikalijom koja se ispituje.

1.4.2.5. Postupak ispitivanja

Može se odrediti inhibicija tri različite vrste potrošnje kiseonika, i to ukupne, samo heterotrofne ili potrošnje kiseonika zbog nitrifikacije. Obično je dovoljno izmjeriti inhibiciju ukupne potrošnje kiseonika. Potreba za utvrĐivanjem efekata na heterotrofnu potrošnju kiseonika povezanu sa oksidacijom organskog ugljenika i oksidacijom amonijaka javlja se u slučajevima kada se za određenu hemikaliju posebno zahtijeva određivanje ta dva zasebna parametra praćenja ili (neobavezno) da bi se objasnile atipične krive koje predstavljaju odnos doza-odgovor a koje su dobijene mjerenjem inhibicije ukupne potrošnje kiseonika.

Uslovi ispitivanja

Ispitivanje treba izvršiti na temperaturi koja se kreće u rasponu 20 ± 2 °C.

Ispitne smješe

Ispitne smješe (FT kao u tabeli 1) koje sadrže vodu, sintetičku otpadnu vodu i hemikaliju koja se ispituje pripremaju se tako da se dobiju različite nominalne koncentracije hemikalije koja se ispituje
(v. u tabeli 1 primjere zapremina sastojaka). Ako je neophodno, pH vrijednost treba korigovati na 7,5 ± 0,5; potrebno je razblažiti smješe vodom i dodati inokulum tako da se u posudama dobiju jednake konačne zapremine i da se počne sa aeracijom.

Referentne smješe

Smješe (FR) se pripremaju na isti način kao i ispitne smješe, s tim da se hemikalija koja se ispituje zamijeni referentnom hemikalijom, npr. 3,5-dihlorofenolom.

Slijepe probe

Slijepe probe (FB) pripremaju se na početku i na kraju perioda izloženosti, u ispitivanjima u kojima su ispitne laboratorijaske čaše pripremljene jedna za drugom u određenim vremenskim intervalima. U ispitivanjima koja se vrše uz upotrebu opreme koja omogućava istovremena mjerenja potrošnje kiseonika potrebno je u svaku seriju istovremene analize uvrstiti najmanje dvije slijepe probe.
Slijepe probe sadrže jednaku zapreminu aktivnog mulja i sintetičkog medijumuma, ali ne sadrže hemikaliju koja se ispituje niti referentnu hemikaliju. Treba ih razblažiti vodom tako da se dobije ista zapremina kao zapremina ispitne i referentne smješe.

Abiotička kontrola

Ako je neophodno, na primjer ako je za hemikaliju koja se ispituje poznato ili se sumnja da ima jaka redukujuća svojstva, priprema se smješa FA kako bi se izmjerila abiotička potrošnja kiseonika. Ta smješa treba da sadrži iste količine hemikalije koja se ispituje i sintetičke otpadne vode, kao i istu zapreminu kao ispitna smješa, ali ne smije sadržati aktivni mulj.

Opšti postupak i mjerenja

Ispitne smješe, referentne smješe, kao i slijepe i abiotičke kontrole, inkubiraju se na ispitnoj temperaturi i pod uslovima vještačke aeracije (0,5 do 1 l/min), kako bi se koncentracija rastvorenog kiseonika održala na nivou iznad 60 - 70 % zasićenosti i da bi se u suspenziji zadržale pahulje mulja. Takođe je neophodno promiješati kulture da bi se u suspenziji zadržale pahulje mulja. Smatra se da je inkubacija počela od prvog kontakta inokuluma od aktivnog mulja sa ostalim sastojcima konačne smješe. Na kraju inkubacije, nakon preciziranog vremena izlaganja, koje obično iznosi 3 sata, uzimaju se uzorci da bi se u ćeliji koja je namijenjena za tu svrhu (sl. 2 u Dodatku 3) ili u do kraja napunjenoj BPK boci izmjerila stopa smanjenja koncentracije rastvorenog kiseonika. Način na koji se započinje inkubacija takođe zavisi od kapaciteta opreme koja se koristi za mjerenje stope potrošnje kiseonika. Na primjer, ako se ta oprema sastoji od samo jedne kiseoničke sonde, mjerenja se vrše posebno. U tom slučaju, različite smješe potrebne za ispitivanje treba pripremiti sa sintetičkom otpadnom vodom ali bez dodavanja inokuluma, a potrebne količine mulja potom se dodaju u svaku posudu dotične serije. Inkubacije treba započeti jednu za drugom, u odgovarajućim vremenskim razmacima od npr. 10 do 15 minuta. Drugi način je kada se sistem za mjerenje sastoji od više sondi koje omogućavaju više istovremenih mjerenja; u tom slučaju inokulum se može istovremeno dodati određenoj grupi posuda.

Nominalna vrijednost koncentracije aktivnog mulja u svim ispitnim smješama, referentnim smješama i smješama za slijepu probu (ali ne i za abiotičku kontrolu) iznosi 1,5 g/l

suspendovanih čvrstih čestica. Potrošnju kiseonika treba izmjeriti nakon 3 sata izloženosti. Po potrebi se vrše dodatna mjerenja nakon 30-minutne izloženosti, onako kako je prethodno opisano u stavu 5.

Nitrifikacioni potencijal mulja

Da bi se odlučilo da li i kojom brzinom dolazi do nitrifikacije mulja, treba pripremiti smješe (FB) kao u slijepoj kontroli i dodatne „kontrolne— smješe (FN) ali koje sadrže i N-alilltioureu u količini od 11,6 mg/l. Smješe treba aerisati i inkubirati na 20 °C ± 2 °C u trajanju od 3 sata. Potom treba izmjeriti stope potrošnje kiseonika i izračunati stopu potrošnje kiseonika zbog nitrifikacije.

Plan ispitivanja

Test za određivanje raspona

Kada je neophodno, koristi se preliminarno ispitivanje da bi se procijenio raspon koncentracija hemikalije koja se ispituje, a koji je u glavnom ispitivanju potreban za određivanje inhibicije potrošnje kiseonika. S druge strane, kada se u preliminarnom ispitivanju utvrdi da hemikalija koja se ispituje ne vrši inhibiciju potrošnje kiseonika, to može pokazati da je glavno ispitivanje nepotrebno, ali se pritom moraju izvesti tri ponavljanja pri najvišoj ispitnoj koncentraciji preliminarnog ispitivanja (obično 1 000 mg/l, ali to zavisi od toga kakvi su zahtjevi u pogledu podataka).

Tabela 1 Primjeri smješa za preliminarno ispitivanje

Reagens	**Originalna koncentracija**				
Osnovni rastvor hemikalije kojaje se ispitu	10 g/l				
Osnovni rastvor sintetičkog medijumuma	V. stav 16				
Osnovna suspenzija aktivnog mulja	3 g/l suspendovanih čvrstih čestica				
Komponente smješa	**Doziranje u ispitne posude[37]**				
	FT1	**FT2**	**FT3-5**	**FB1-2**	**F_A**
Osnovni rastvor hemikalije kojaje (ml) se ispitu (st. 19 do 21)	0,5	5	50	0	50
Osnovni rastvor sintetičke (ml) otpadne vode	16	16	16	16	16
Suspenzija aktivnog mulja (ml) (st. 26 do 29)	250	250	250	250	0
Voda	233,5	229	184	234	434
Ukupna zapremina smješa (ml)	500	500	500	500	500

[37] Isti postupak treba primijeniti i s referentnom hemikalijom da bi se dobili baloni FR1-3

Koncentracija u smjesi					
Ispitna suspenzija (mg/l) Aktivni mulj	10	10	1 000	0	1 000
(suspendovane čvrste čestice) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

Ispitivanje treba ssprovesti sa najmanje tri koncentracije hemikalije koja se ispituje, na primjer 10 mg/l, 100 mg/l i 1 000 mg/l i uz vršenje slijepe probe i, ako je neophodno, najmanje tri abiotičke kontrole sa najvećim koncentracijama hemikalije koja se ispituje (v. kao primjer tabelu 1). U idealnom slučaju, najniža koncetracija ne bi trebalo da ima ikakav efekat na potrošnju kiseonika. Potrebno je izračunati stope potrošnje kiseonika i stopu nitrifikacije ako je relevantna; potom se računa procenat inhibicije. U zavisnosti od svrhe ispitivanja, takođe je moguće jednostavno odrediti toksičnost granične koncentracije, npr. 1 000 mg/l. Ako se pri toj koncentraciji ne jave nikakvi statistički značajni toksični efekti, dalje ispitivanje pri višim ili nižim koncentracijama nije potrebno. Treba napomenuti da se supstance koje su slabo rastvorljive u vodi, smješe čije komponente imaju različitu rastvorljivost u vodi i adsorptivne supstance odmjeravaju direktno u ispitne posude. U tom slučaju, zapremina predviđena za osnovni rastvor hemikalije koja se ispituje zamjenjuje se vodom za razblaživanje.

Glavno ispitivanje

Inhibicija ukupne potrošnje k iseonika

Ispitivanje treba vršiti uz upotrebu raspona koncentracija utvrđenom u preliminarnom ispitivanju. Da bi se dobili NOEC i EC_x (npr. EC_{50}), u većini slučajeva preporučuje se šest kontrola i pet ispitnih koncetracija u geometrijskom nizu, sa pet ponavljanja. Abiotička kontrola se ne mora ponavljati ako u preliminarnom ispitivanju nije bilo nikakve potrošnje kiseonika, ali ako se javila značajna potrošnja, tada za svaku koncentraciju hemikalije koja se ispituje treba uključiti abiotičke kontrole. Osjetljivost mulja treba provjeriti upotrebom referentne hemikalije 3,5-dihlorofenol. Osjetljivost mulja provjerava se za svaku ispitnu seriju, pošto se zna da je osjetljivost kolebljiva. U svim slučajevima, uzorci se uzimaju iz ispitnih posuda nakon 3 sata i, ako je potrebno, nakon dodatnih 30 minuta, radi mjerenja stope potrošnje kiseonika u ćeliji sa kiseonikovom elektrodom. Iz prikupljenih podataka računaju se specifične stope disanja kontrolnih i ispitnih smješa; potom se iizračunava procenat inhibicije na osnovu jednačine 7 koja je data u nastavku.

Razlikovanje inhibicije heterotrofne respiracije i nitrifik acije

Upotreba specifičnog inhibitora nitrifikacije, ATU, omogućava direktnu procjenu inhibitornih efekata hemikalije koja se ispituje na heterotrofnu oksidaciju, tako da se efekti na stopu nitrifikacije mogu izračunati oduzimanjem stope potrošnje kiseonika u prisustvu ATU od stope ukupne potrošnje (bez prisustva ATU). Potrebno je pripremiti dva seta reakcionih smješa u skladu sa planovima ispitivanja za EC_x ili za NOEC, s tim da se uz to ATU dodaje u svaku smješu jednog seta do postizanja konačne koncentracije od 11,6 mg/l, za koju je dokazano da u potpunosti inhibira nitrifikaciju u mulju sa koncentracijom čvrstih čestica do 3 000 mg/l (4). Stope potrošnje kiseonika mjere se nakon perioda izloženosti; te direktne

vrijednosti predstavljaju samo heterotrofnu respiraciju, dok razlika između njih i odgovarajućih stopa ukupne respiracije predstavlja nitrifikaciju. Potom se računaju različiti stepeni inhibicije.

Mjerenja

Nakon jednog ili više perioda izloženosti, uzorak iz prve posude za aeraciju prenosi se u ćeliju sa kiseonikovom elektrodom (sl. 1 u Dodatku 2), a koncentracija rastvorenog kiseonika mjeri se odmah. Ako je sistem sa više elektroda na rapolaganju, mjerenja se tada mogu vršiti istovremeno. Od suštinske je važnosti da se miješanje (uz pomoć obloženog magneta) vrši brzinom istom kao kada je elektroda baždarena, kako bi se obezbijedilo da sonda reaguje uz najmanje moguće kašnjenje na promjene koncentracije kiseonika i da bi se omogućila redovna i reproduktivna mjerenja kiseonika u posudi za mjerenje. Obično je pogodan samomiješajući sondni sistem od nekoliko kiseonikovih elektroda. Ćeliju je potrebno isprati vodom između mjerenja. Drugi način je da se uzorak ubaci u BPK bocu (sl. 2 u Dodatku 3) opremljenu magnetnom mješalicom. Potom se kiseonikova sonda sa cjevastim adapterom ubacuje u grlo boce i pokreće se magnetna mješalica. U oba slučaja potrebno je neprekidno mjeriti i bilježiti koncentraciju rastvorenog kiseonika u toku jednog perioda, obično 5 do 10 minuta, ili dok koncentracija kiseonika ne padne ispod 2 mg/l. Elektrodu treba izvaditi, smješu vratiti u posudu za aeraciju i nastaviti sa aeracijom i miješanjem ukoliko je potrebno mjerenje nakon dužih perioda izloženosti.

Provjera koncentracije hemikalije koja se ispituje

Za neke svrhe može biti potrebno da se u ispitnim posudama izmjeri koncentracija hemikalije koja se ispituje. Treba napomenuti da ako se koriste osnovni rastvori:

— supstanci slabo rastvorljivih u vodi,
— smješa koje sadrže komponente različite rastvorljivosti u vodi, ili
—supstanci dobro rastvorljivih u vodi, ali je koncentracija osnovnog rastvora blizu maksimalne rastvorljivosti u vodi,

rastvorena frakcija je nepoznata, kao i ssupstancana koncentracija hemikalije koja se ispituje, a koja je prebačena u ispitne posude. Da bi se iylaganje okarakterisalo, neophodno je izvršiti analitičku procjenu koncentracija hemikalije koja se ispituje u ispitnim posudama. Radi veće jednostavnosti, analitičku procjenu treba izvršiti prije dodavanja inokuluma. Izmjerene koncentracije mogu biti veoma niske zbog činjenice da se u ispitne posude prebacuju samo rastvorene frakcije.

Da bi se izbjegla dugotrajna i skupa analitika, preporučuje se da se hemikalija koja se ispituje jednostavno odmjeri direktno u ispitne posude i da se u kasnijim proračunima polazi od početne ponderisane nominalne koncentracije. Pravljenje razlike između rastvorenih, nerastvorenih ili adsorbovanih frakcija hemikalije koja se ispituje nije neophodno jer se sve te frakcije isto tako javljaju u ssupstancanim uslovima u postrojenjima za prečišćavanje otpadnih voda, pri čemu te frakcije mogu varirati u zavisnosti od sastava otpadnih voda. Cilj ove metode ispitivanja je da se realno procijeni koncentracija koja ne dovodi do inhibicije i nije pogodna za detaljno istraživanje o tome koje frakcije doprinose inhibiciji organizama u aktivnom mulju. Najzad, adsorbtivne supstance takođe treba odmjeriti direktno u ispitne posude; potrebno je da posude budu silanizovane da bi se gubici zbog adsorpcije sveli na najmanju moguću mjeru.

1. Podaci i izvještavanje

Iizračunavanje stopa potrošnje kiseonika

Stope potrošnje kiseonika računaju se iz srednje vrijednosti izmjerenih veličina, npr. iz linearnog dijela grafika koncentracije kiseonika u funkciji vremena, pri čemu se proračuni ograničavaju na koncentracije kiseonika između 2,0 mg/l i 7,0 mg/l, pošto veće i niže koncentracije mogu same po sebi uticati na stope potrošnje. Izleti u opsege koncentracija ispod ili iznad tih vrijednosti ponekad su neizbježni i neophodni, kao na primjer kada je respiracija jako potisnuta i stoga veoma spora ili ako neki određeni aktivni mulj ima vrlo brzu respiraciju. To je prihvatljivo pod uslovom da su dodatni dijelovi grafikona potrošnje pravi i da se njihovi gradijenti ne mijenjaju dok prolaze kroz granične vrijednosti od 2,0 mg/l ili 7,0 mg/l O_2. Svi eventualni zakrivljeni dijelovi grafikona ukazuju na to da se sistem mjerenja stabilizuje ili da se stopa potrošnje mijenja, pa ih ne treba koristiti za iizračunavanje stopa respiracije. Stopa potrošnje kiseonika izražava se u miligramima po litru na sat (mg/lh) ili u miligramima po gramu suvom mulja na sat (mg/gh). Stopa potrošnje kiseonika, R, u mg/lh, može se izračunati ili interpolacijom dobiti iz linearnog dijela grafika zabilježenog opadanja nivoa kiseonika prema jednačini 1:

$$R = (Q1 – Q2)/\Delta t \times 60$$

gdje je:

Q1 koncentracija kiseonika na početku izabranog dijela linearne faze (mg/l);

Q2 koncentracija kiseonika na kraju izabranog dijela linearne faze (mg/l); Δt vremenski interval između ta dva mjerenja (u min.)

Specifična stopa respiracije (R_S) izražava se kao količina kiseonika potrošenog po g suve mase mulja na sat (mg/gh) prema jednačini 2:

$$R_S = R/SS$$

gdje je SS koncentracija suspendovanih čvrstih čestica u ispitnoj smješi (g/l).

Mogu se kombinovati različiti indeksi za R, i to:

S specifična stopa
T stopa ukupne respiracije
N stopa respiracije povezane sa nitrifikacijom H stopa heterotrofne respiracije
A stopa povezana sa abiotičkim procesima
B stopa na osnovu slijepih proba (srednja vrijednost)

Iizračunavanje stope potrošnje kiseonika zbog nitrifikacije

Odnos između ukupne respiracije (R_T), respiracije povezane sa nitrifikacijom (R_N) i heterotrofne respiracije (R_H) dat je u jednačini 3:

$$R_N = R_T – R_H \qquad (3)$$

gdje je:

R_N je stopa potrošnje kiseonika zbog nitrifikacije (mg/lh);
R_T je stopa potrošnje kiseonika izmjerena slijepom probom (bez ATU; F_B) (mg/lh).
R_H je stopa potrošnje kiseonika izmjerena slijepom probom uz dodavanje ATU (F_N) (mg/lh).

Ovaj odnos važi za vrijednosti slijepih proba (R_{NB}, R_{TB}, R_{HB}), abiotičkih kontrola (R_{NA}, R_{TA}, R_{HA}) i za oglede sa hemikalijama koje se ispituju (R_{NS}, R_{TS}, R_{HS}) (mg/gh). Specifične stope respiracije računaju se iz:

$$R_{NS} = R_N/SS \quad (4)$$
$$R_{TS} = R_T/SS \quad (5)$$
$$R_{HS} = R_H/SS \quad (6)$$

Ako je R_N neznatna (npr. < 5 % R_T-a slijepih proba) u preliminarnom ispitivanju, može se pretpostaviti da je heterotrofna potrošnja kiseonika jednaka ukupnoj potrošnji i da ne dolazi do nitrifikacije. Ako bi u ispitivanjima trebalo uzeti u obzir efekte na heterotrofne i nitrifikujuće mikroorganizme, tada bi bio potreban alternativni izvor aktivnog mulja. Glavno ispitivanje vrši se ako postoji dokaz o supresiji stopa potrošnje kiseonika različitim koncentracijama hemikalije koja se ispituje.

Iizračunavanje procenta inhibicije

Procenat inhibicije ukupne potrošnje kiseonika, I_T, pri svakoj koncentraciji hemikalije koja se ispituje računa se prema jednačini 7:

$$I_T = [1 – (R_T – R_{TA})/R_{TB}] \times 100\ \% \quad (7)$$

Slično tome, procenat inhibicije heterotrofne potrošnje kiseonika, I_H, pri svakoj koncentraciji hemikalije koja se ispituje računa se prema jednačini 8:

$$I_H = [1 – (R_H – R_{HA})/R_{HB}] \times 100\ \% \quad (8)$$

Najzad, inhibicija potrošnje kiseonika zbog nitrifikacije, I_N, pri svakoj koncentraciji računa se prema jednačini 9:

$$I_N = [1 – (R_T – R_H)/(R_{TB} – R_{HB})] \times 100\ \% \quad (9)$$

Procenat inhibicije potrošnje kiseonika grafički se prikazuje u odnosu prema logaritmu koncentracije hemikalije koja se ispituje (kriva inhibicije, v. sl. 3 u Dodatku 4). Krive inkubacije grafički se prikazuju za svaki tročasovni period aeracije ili dodatno nakon 30 min. Koncentracija hemikalije koja se ispituje a koja inhibira potrošnju kiseonika za 50% (EC_{50}) iizračunava se ili se dobija interpolacijom iz grafika. Ako su dostupni odgovarajući podaci, mogu se izračunati ili interpolirati 95-procentne granice pouzdanosti za EC_{50}, nagib krive i odgovarajuće vrijednosti za označavanje početka raspona inhibicije (na primjer EC_{10} ili EC_{20}) i kraja raspona inhibicije (na primjer EC_{80} ili EC_{90}).

Treba napomenuti da što se tiče varijabilnosti rezultata koja se često primjećuje, u mnogim slučajevima može biti dovoljno dodatno izraziti rezultate prema redu veličine, na primjer:

EC_{50} < 1 mg/l
EC_{50} 1 mg/l do 10 mg/l
EC_{50} 10 mg/l do 100 mg/l EC_{50} > 100mg/l

Tumačenje rezultata

EC_x

57. Vrijednosti EC_x uključujući njihovu donju i gornju granicu pouzdanosti od 95% za parametar računaju se uz pomoć odgovarajućih statističkih metoda (npr. probit analizom, logističkom ili Vejbulovom (Weibull) funkcijom, modifikovanom Spirman-Karberovom (Spearman-Karber) metodom ili prostom interpolacijom (11)). Vrijednost EC_x dobija se tako što se u dobijenu jednačinu ubaci vrijednosti koja odgovara x% srednje vrijednosti kontrolne grupe. Za računanje EC_{50} ili neke druge EC_x, srednje vrijednosti izračunate za svaki tretman (x) podvrgavaju se regresionoj analizi.

Procjena najveće koncentracije bez vidljivog efekta (NOEC)

Ako se namjerava da se NOEC odredi statističkom analizom, neophodni su statistički podaci za svaku posudu (pojedinačne posude smatraju se ponavljanjima). Treba koristiti odgovarajuće statističke metode u skladu sa OECD-ovim Dokumentom o savremenim pristupima u statističkoj analizi podataka o ekotoksičnosti: uputstvo za primjenu (*Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*) (11). Uopšteno govoreći, nepovoljni efekti hemikalije koja se ispituje u poreĐenju sa kontrolnom grupom ispituju se uz upotrebu jednosmjernog (manjeg) ispitivanja hipoteze za $p \leq 0,05$.

Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju treba da sadrži sljedeće informacije:

Hemikalija koja se ispituje

— uobičajeni naziv, hemijski naziv, CAS broj, čistoća;
—fizičko-hemijska svojstva hemikalije koja se ispituje (npr. log K_{ow}, rastvorljivost u vodi, pritisak pare, Henrijeva konstanta (H) i eventualne informacije o sudbini hemikalije koja se ispituje, npr. adsorpciji na aktivni mulj); *Sistem ispitvanja*

—izvor, uslovi rada postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda i ulivne vode koje ono prima, koncentracija, prethodno tretiranje i održavanje aktivnog mulja; *Uslovi ispitivanja*

— temperature ispitivanja, pH vrijednost tokom ispitivanja i trajanje faze/a izloženosti;

Rezultati

— specifična potrošnja kiseonika u kontrolisanim grupama (mg O2/(g mulja × h);
— svi izmjereni podaci, kriva/e inhibicije i metoda proračuna EC_{50};

—EC_{50} i, ako je moguće, 95-procentne granice pouzdanosti, po mogućstvu EC_{20}, EC_{80}; po mogućstvu NOEC i primijenjena statistička metoda, ako se EC_{50} ne može odrediti;

— rezultati za ukupnu i, ako je moguće, heterotrofnu inhibiciju i inhibiciju vezanu za nitrifikaciju;

— abiotička potrošnja kiseonika u fizičko-hemijskoj kontroli (ako je korišćena);

—naziv referentne hemikalije i rezultati dobijeni s tom hemikalijom;

— sva zapažanja i odstepena od standardnog postupka, koja su mogla uticati na rezultat.

Dodatak 1

Definicije

Za svrhe ove metode ispitivanja primjenjuju se sljedeće definicije.

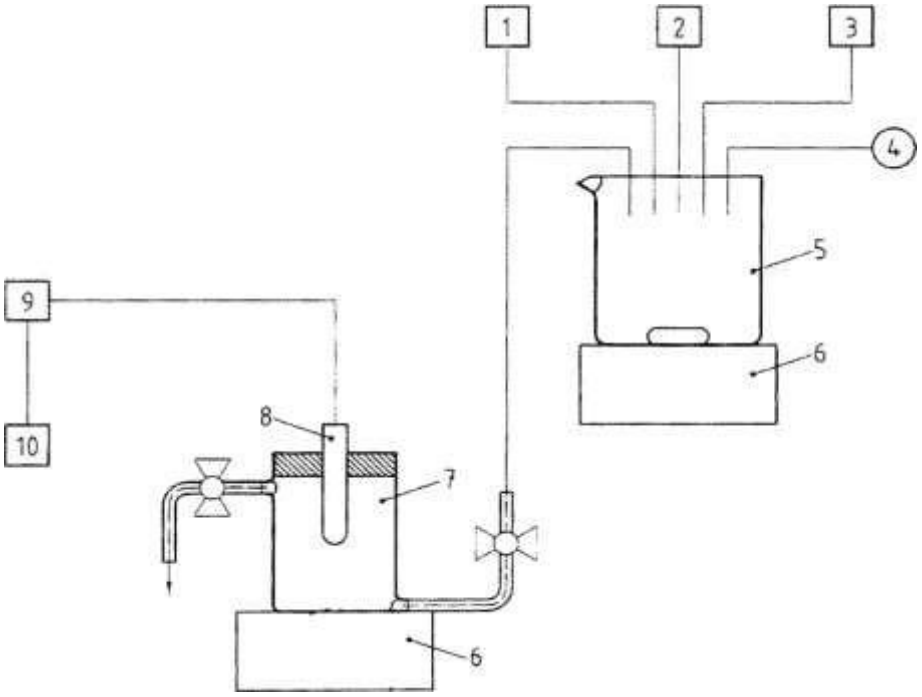
EC_x (efektna koncentracija sa efektom od x %) je koncentracija koja prouzrokuje x-procentni efekat na ispitivanim organizmima u okviru datog perioda izlaganja u poređenju sa kontrolnom grupom. Na primjer, EC_{50} je koncentracija za koju je procijenjeno da prouzrokuje efekat na parametar praćenja nekog ispitivanja kod 50% izložene populacije u definisanom periodu izloženosti.

NOEC (najveća koncentracija bez vidljivog efekta) je koncentracija hemikalije koja se ispituje pri kojoj se ne uočava nikakav efekat. U ovom ispitivanju, koncentracija koja odgovara NOEC-u nema statistički značajan efekat ($p < 0,05$) u datom period izloženosti u poređenju sa kontrolnom grupom.

Hemikalija koja se ispituje je bilo koja supstanca ili smješa koja se ispituje primjenom ove metode ispitivanja.

Dodatak 2

***Sl. 1*: Primjeri uređaja za mjerenje**

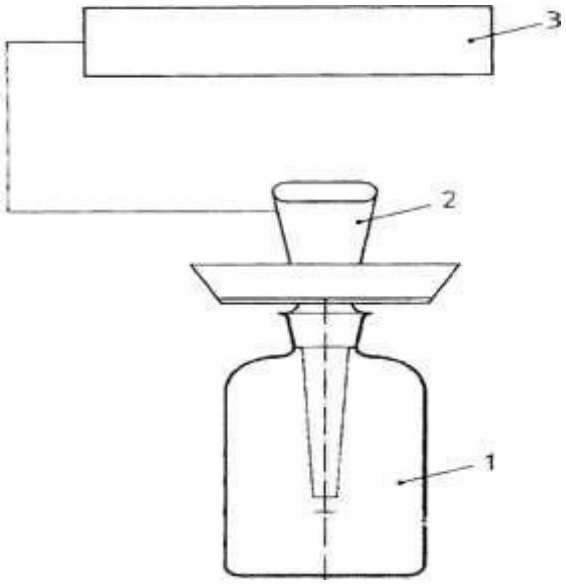


Legenda:

1 aktivni mulj 2 sintetički medijumum
3 hemikalija koja se ispituje 4 vazduh
5 posuda za miješanje
6 magnetna mješalica
7 ćelija za mjerenje kiseonika
8 kiseonikova elektroda
9 instrument za mjerenje kiseonika
10 zapisivač

Dodatak 3

***Sl. 2*: Primjer uređaja za mjerenje koji koristi BPK bocu**

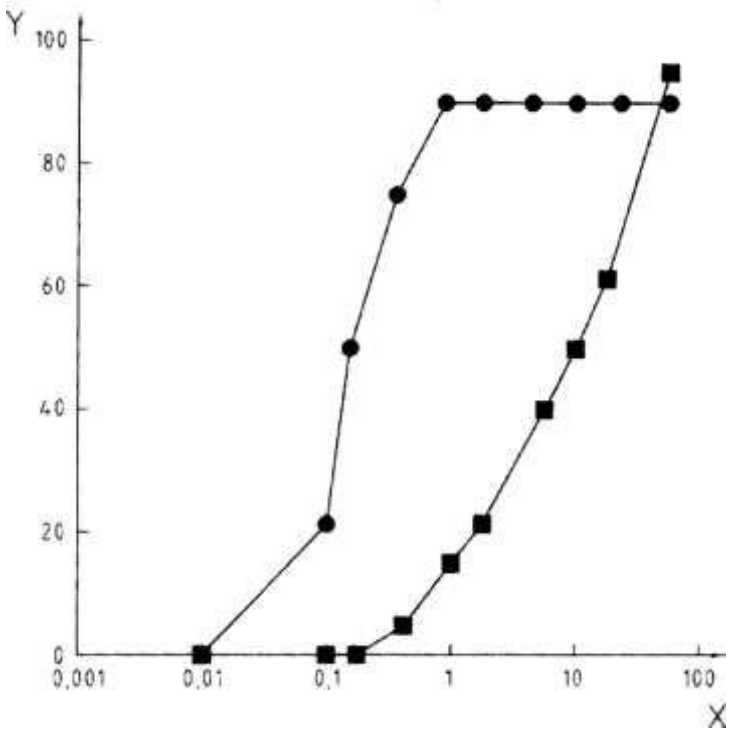


Legenda:

1 ispitna posuda
2 kiseonikova elektroda
3 instrument za mjerenje kiseonika

Dodatak 4

***Sl. 3*: Primjer krivih inhibicije**



Legenda:

X koncentracija 3,5-dihlorofenola (mg/l)
Y inhibicija (%) ■ inhibicija heterotrofne respiracije uz pomoć nitrifikujućeg mulja ● inhibicija nitrifikacije uz pomoć nitrifikujućeg mulja

C.12. BIORAZGRADNJA - MODIFIKOVANA SCAS METODA ISPITIVANJA

DIO I

1. Metoda ispitivanja

1.1. Uvod

Cilj modifikovane SCAS metode ispitivanja je procjena mogućnosti potpune biorazgradljivosti neisparljivih, organskih materija dobro rastvorljivih u vodi, ako su izložene relativno visokim koncentracijama mikroorganizama u toku dužeg vremenskog perioda. Životna aktivnost mikroorganizama održava se u toku tog perioda svakodnevnim dodavanjem taloga komunalne otpadne vode za prehranu. (Tokom vikenda, otpadna voda se čuva na temperaturi od 4°C. Koristi se i sintetička otpadna voda OECD potvrdnog ispitivanja.)

Prilikom tumačenja rezultata uzeti u obzir mogućnost fizičko-hemijske adsorpcije na suspendovane materije. (dio 3.2. ove metode).

Zbog dugog vremena zadržavanja tečne faze (36 sati) i diskontinualnog dodavanja nutrijenata, metoda ne simulira uslove kakvi postoje u postrojenju za prečišćavanje otpadnih voda. Rezultati ispitivanja sa različitim supstancama pokazuju da ova metoda ima veliki potencijal biorazgradljivosti.

Uslovi u ovom ispitivanju izrazito su povoljni za izbor, odnosno adaptaciju mikroorganizama sposobnih da razgrade ispitivano jedinjenje. (Postupak se koristi i za proizvodnju aklimatizovanih inokuluma za korišćenje u drugim ispitivanjima.)

Pomoću ove metode, potpuna biorazgradljivost ispitivanih supstanci procjenjuje se na osnovu izmjerene koncentracije rastvorenog organskog ugljenika. DOC je bolje odrediti nakon zakiseljavanja i čišćenja nego ga izračunati kao razliku Cukupni - Cneorganski.

Istovremeno korišćenje specifičnog analitičkog postupka omogućava procjenu primarne biorazgradljivosti supstanci (nestanak početne hemijske strukture).

Postupak se primjenjuje samo na organske supstance koje su, u koncentraciji primjenjenoj u ispitivanju:

- rastvorljive u vodi (najmanje 20 mg/lDOC);
- imaju zanemarljiv napon para;
- nemaju inhibitorni efekat na bakterije;
- ne adsorbuju se u značajnoj mjeri unutar test sistema;

- ne gube se stvaranjem pjene iz test rastvora.

Utvrditi sadržaj organskog ugljenika u ispitivanom materijalu.

Podaci o relativnom udijelu glavnih sastojaka ispitivanog materijala korisni su pri tumačenju dobijenih rezultata, posebno u slučajevima kad su dobijene vrijednosti niske ili granične.

Podaci o toksičnosti supstanci za mikroorganizme su korisni u tumačenju niskih vrijednost i izboru odgovarajuće ispitivane koncentracije.

1.2. Definicije i jedinice mjere

C_T je koncentracija ispitivane supstance izražena kao organski ugljenik prisutan u ili dodat talogu otpadne vode na početku perioda aeracije (mg/l).

C_t je koncentracija rastvorenog organskog ugljenika u tečnom supernatantu iz ispitivane grupe na kraju perioda aeracije (mg/l).

C_c je koncentracija rastvorenog organskog ugljenika u tečnom supernatantu iz kontrole na kraju perioda aeracije (mg/l).

U ovoj metodi biorazgradljivost je nestanak organskog ugljenika, izražava se kao: procenat razgradnje one količine supstance koja se svakodnevno dodaje - D_{da} (degradation/daily addition) računa se prema formuli:

$$Dda = \frac{CT\ (Ct\ Cc\ )\ \square 100}{C_T}$$

Procenat razgradnje one količine supstance koja je prisutna na početku svakog dana - D_{ssd} (degradation/substance start of day) računa se prema formuli:

$$D_{ssd} = \frac{2CT\ Cti\ Cci\ 3Cti1\ 3Cci1 \square\ 2C_T\ CC_t\ C_c \square 100}{2CT\ Cti\ Cci \qquad\qquad 2CT\ Ct\ Cc}$$

Pokazatelji i i (i + 1) odnose se na dan mjerenja. Prva jednačina koristi se ako DOC u izlaznoj vodi (efluentu) varira svakodnevno, dok se druga jednačina koristi kad DOC izlazne vode ima relativno stalne vrijednosti.

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance se koriste kada se ispituje nova supstanca. Za ovu metodu nije preporučena neka određena referentna supstanca.

Podaci o nekoliko jedinjenja procenjenih u međulaboratorijaskom ispitivanju (ringtest) ponuđeni su (Dio II ove metode) u cilju povremene kalibracije postupka i da se omogući poređenje rezultata dobijenih nekim drugim postupkom.

1.4. Načelo metode ispitivanja

Aktivni mulj iz postrojenja za obradu otpadnih voda stavlja se u jedinicu za polukontinualnu obradu aktivnog mulja (u daljem tekstu: SCAS). Dodaju se ispitivana supstanca i talog komunalne otpadne vode. Ova miješavina se aeriše u toku 23 sata. Aeracija se nakon toga prekida, mješavina se ostavlja da se istaloži mulj, a tečni suprenatant se ukloni.

Preostali talog se miješa sa narednom količinom ispitivanog jedinjenja i otpadne vode u aeracionoj komori i postupak se ponavlja na isti način.

Biorazgradljivost se utvrđuje određivanjem količine rastvorenog organskog ugljenika u tečnom supernatantu. Ova vrijednost se poredi sa vrijednošću izmjerenom u tečnoj fazi iz kontrole, u koju je dodat samo talog otpadne vode.

Kada se koristi specifični analitički postupak, mjeriti promjene u koncentraciji izvornog molekula izazvane biorazgradnjom (primarna biorazgradnja).

1.5. Kriterijumi kvaliteta

Ponovljivost metode koja se bazira na uklanjanju rastvorenog organskog ugljenika nije utvrđena (kad se uzme u obzir primarna biorazgradljivost, dobiju se precizni podaci za materijale koji se dobro razgrađuju).

Osjetljivost postupka zavisi od varijabilnosti slijepe probe i u manjoj mjeri od preciznosti određivanja rastvorenog organskog ugljenika i koncentraciji test jedinjenja u tečnoj fazi na početku svakog ciklusa.

1.6. Opis metode

1.6.1. Priprema

Potreban je dovoljan broj čistih jedinica za aeraciju, alternativno se koristi originalna SCAS test jedinica zapremine 1,5 L i cijevi za dovod vazduha (Slika 1) za svaku test supstancu i kontrole. Komprimovani vazduh pročišćen kroz vatu koji se dovodi u test jedinice ne sadrži organski ugljenik i prethodno je zasićen vodom da se smanje gubici isparavanjem.

Uzorak tečne miješavine, koja sadrži od 1 g do 4 g suspendovanih materija po litru, dobija se iz postrojenja za obradu aktivnog mulja koje obrađuje pretežno komunalnu otpadnu vodu. Za svaku aeracionu jedinicu potrebno je oko 150 mg tečne mješavine.

Osnovni rastvori ispitivane supstance pripremaju se u destilovanoj vodi. Potrebna je koncentracija od 400 mg/l organskog ugljenika, što daje koncentraciju ispitivane supstance od 20 mg/l ugljenika na početku svakog ciklusa aeracije, ako ne dolazi do biološke razgradnje. Koriste se i više koncentracije ako ne uzrokuju toksičan efekat na mikroorganizme. U osnovnom rastvoru mjeri se sadržaj organskog ugljenika.

1.6.2. Uslovi ispitivanja

Ispitivanje se izvodi na temperaturi od 20 °C do 25 °C. Koristi se visoka koncentracija aerobnih mikroorganizama (najviše 1 g/l do 4 g/l suspendovanih materija), a djelotvoran period zadržavanja je 36 sati. Materijal koji sadrži ugljenik u najvećoj mjeri se oksiduje u hranljivoj podlozi od otpadnih voda, obično unutar osam sati nakon početka svakog ciklusa aeracije. Nakon toga, mulj diše endogeno za vrijeme preostalog perioda aeracije, u toku kojeg je ispitivano jedinjenje jedini rapoloživi supstrat, osim u slučaju da se i ono brzo razgrađuje. Ove osobine, u kombinaciji sa dnevnom reinokulacijom kad se kao podloga koristi komunalna otpadna voda, obezbjeđuju povoljne uslove za aklimatizaciju i za visoki stepen biološke razgradnje.

1.6.3. Postupak

Uzima se uzorak tečne miješavine iz uređaja laboratorijaskog tipa ili pogodnog postrojenja za obradu aktivnog mulja iz pretežno komunalne otpadne vode i čuva u aerobnim uslovima do korišćenja u laboratorijai. Svaka aeraciona jedinica kao i kontrolna jedinica pune se sa po 150 mg tečne miješavine (ako se koristi originalna SCAS test jedinica, ta se zapremina množi sa 10) i započinje se sa aeracijom. Nakon 23 sata, aeracija se prekida i mulj se ostavlja 45 minuta da se istaloži. Naizmjenično se osupstancaaju slavine svake posude i izvlači se po 100 mg tečnog supernatanta. Uzorak istaložene komunalne otpadne vode uzima se neposredno prije upotrebe, a 100 mg se dodaje mulju koji je preostao u svakoj aeracionoj jedinici. Ponovo se započinje sa aeracijom. U ovoj fazi ne dodaje se ispitivani materijal, a u jedinice se svakodnevno dodaje komunalna otpadna voda sve dok se nakon taloženja ne dobije supernatant u obliku bistre tečnosti. Za to je obično potrebno dvije nedelje, a do kraja tog perioda rastvoreni organski ugljenik u tečnom supernatantu na kraju svakog aeracionog ciklusa približava se konstantnoj vrijednosti. Na kraju ovog perioda, pojedini istaloženi muljevi se pomiješaju i u svaku jedinicu se doda po 50 mg ovako pripremljenog kompozita.

U kontrolne jedinice dodaje se po 95 mg istaložene otpadne vode i 5 mg vode, a u ispitivane jedinice 95 mg istaložene otpadne vode i 5 mg odgovarajućeg osnovnog rastvora ispitivanog jedinjenja (400 mg/l). Ponovo se započinje sa aeracijom koja traje 23 sata. Mulj se zatim ostavi 45 minuta da se slegne, izvuče se supernatant i analizira se sadržaj rastvorenog organskog ugljenika.

Opisani postupak ponavlja se svakodnevno u toku trajanja ispitivanja. Prije taloženja, očistiti čestice koje su se nakupile na zidovima jedinica iznad nivoa tečnosti. Za čišćenje svake jedinice koristi se posebna strugalica ili četka da se spriječi meĐusobna kontaminacija.

U idealnom slučaju, rastvoreni organski ugljenik u tečnom supernatantu određuje se svakog dana, ali analize su i reĐe. Tečnosti se prije analize filtriraju kroz isprane membranske filtere od 0,45 µm ili se centrifugiraju. Odgovarajući membranski filteri su oni koji ne otpuštaju ugljenik niti apsorbuju supstance u toku filtracije. Temperatura uzorka za vrijeme centrifugiranja nije veća od 40 °C.

Dužina ispitivanja za jedinjenja koja se slabo ili uopšte biološki ne razgraĐuju nije određena, ali na osnovu iskustva, je najmanje 12, a najviše 26 nedjelja.

2. Podaci i procjena

Vrijednosti rastvorenog organskog ugljenika u tečnom supernatantu ispitivanih i kontrolnih jedinica grafički se prikazuju u funkciji vremena.

Kad se postigne biološka razgradnja, nivo te razgradnje u ispitivanim jedinicama približava se nivou razgradnje u kontrolisanim jedinicama. Kad se razlika između dva nivoa u tri uzastopna mjerenja ustali, broj daljih mjerenja je dovoljan da omogući statističku obradu podataka i iizračunavanje procenata biološke razgradnje (D_{da} ili D_{ssd}, dio 1.2. ove metode).

3. Izvještaj

3.1. Izvještaj o ispitivanju Izvještaj o ispitivanju sadrži:

- sve podatke o vrsti otpadne vode, tipu upotrijebljene jedinice i rezultatima koji se tiču ispitivane supstance, referentne supstance - ako je korišćena, i slijepe probe; - temperaturu;
- krivu uklanjanja sa opisom, način izračunavanja (tačka 1.2. ove metode);
- datum i mjesto gde su uzeti uzorci aktivnog mulja i otpadne vode, status adaptacije, koncentracija, itd;
- naučno ubazirajune razloge za moguće izmjene ispitivanja lnog postupka; - potpis i datum.

3.2. Tumačenje rezultata

Supstanca koja se ispituje ovom metodom nije biološki lako razgradljiva, te se do uklanjanja DOC izazvanog jedino biološkom razgradnjom dolazi postepeno u toku više dana ili nedjelja, osim u slučaju kad naglo nastupi aklimatizacija na šta ukazuje nagli nestanak nakon nekoliko nedjelja.

Fizičko-hemijska adsorpcija je nekada važna, što se vidi iz potpunog ili dijelimičnog uklanjanja dodatog DOC na početku ispitivanja. Ono što se dogodi nakon toga zavisi od faktora kao što je stepen adsorpcije i koncentracija suspendovanih materija u odbačenom efluentu. Obično se početno niska razlika između koncentracije DOC u kontrolisanim i ispitivanim tečnim supernatantima postupno povećava i zatim se zadržava na novoj vrijednosti do kraja ispitivanja, osim u slučaju aklimatizacije.

Ako se biorazgradljivost (ili djelimična biorazgradljivost) želi razlikovati od adsorpcije, ssprovesti dodatna ispitivanja. Najbolje je za ovo koristiti tečni supernatant ili mulj kao inokulum u osnovnom eksperimentu (uraditi respirometrijsko ispitivanje).

Kad se u ovom ispitivanju dobije visok stepen uklanjanja DOC bez adsorpcije, ispitivana supstanca se smatra potencijalno biorazgradljivom. Djelimično neadsorptivno uklanjanje ukazuje na djelimičnu biorazgradljivost ispitivane supstance.

Ako je uklanjanje DOC nisko ili do njega ne dolazi, uzrok je inhibitorno dejstvo ispitivane supstance na mikroorganizame. To se otkriva lizom i gubitkom mulja, što daje zamućen supernatant. Ispitivanje ponoviti pomoću nižih koncentracija ispitivane supstance.

Upotreba posebnog analitičkog postupka ili ispitivane supstance obilježene izotopom ugljenika C_{14} može povećati osjetljivost.

Ako se koriste ispitivana jedinjenja označena sa C_{14}, pronalazak C_{14} potvrđuje da je došlo do biorazgradnje.

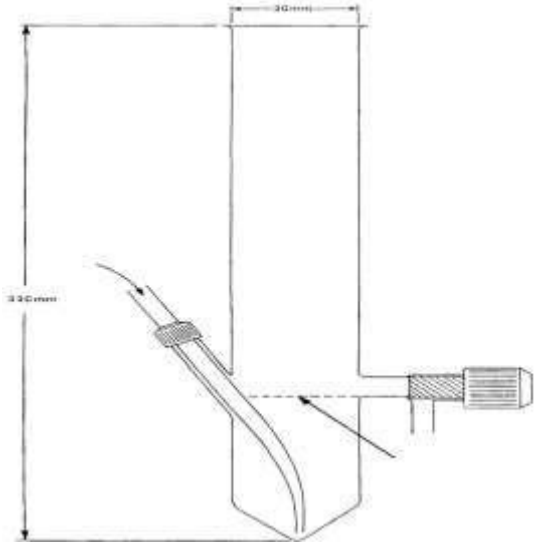
Kad se rezultati prikazuju na osnovu primarne biorazgradnje, dati objašnjenje o promjeni hemijske strukture koja dovodi do gubitka odgovora izvorne ispitivane supstance.

Validacija analitičkog postupka daje se zajedno sa odgovorom dobijenim na ispitnoj podlozi koja je služila kao slijepa proba.

DIO II
SCAS MOTODA ISPITIVANJA: PRIMJER REZULTATA

Supstanca	CT(mg/l)	Ct-Cc(mg/l)	Procenat biorazgradnje - Dda	Dužina ispitivanja (br.dana)
4 acetil-aminobenzen sulfonat	17.2	2.0	85	40
tetrapropilen benzen sulfinat	17.3	8.4	51.4	40
4-nitrofenol	16.9	0.8	95.3	40
dietilen glikog	16.5	0.2	98.8	40
Anilin	16.9	1.7	95.9	40
Ciklopentan tetrakarboksilat	17.9	3.2	81.1	120

DIO III
PRIMJER OPREME ZA ISPITIVANJE



C.13. BIOKONCENTRACIJA: ISPITIVANJE NA RIBAMA U PROTOČNOM SISTEMU

DIO I

1. Metoda ispitivanja

Metoda ispitivanja na ribama u protočnom sistemu se zasniva na OECD TG 305 (1996) uputstvu ispitivanja.

1.1. Uvod

Metodom ispitivanja određuje se potencijal biokoncentracije ispitivane supstance u ribama kada se one drže u protočnom sistemu. Iako je protočni sistem najpogodniji, ispitivanje se izvodii u polustatičnom sistemu pod uslovom da su zadovoljeni kriterijumi kvaliteta.

U metodi su date precizne instrukcije za izvoĐenje ispitivanja, ali se dozvoljavaju modifikacije postupka ispitivanja u zavisnosti od laboratorijaskih uslova, odnosno osobina ispitivane supstanci. Metoda je namijenjena za ispitivanje stabilnih organskih supstanci sa vrijednostima log P_{ow} između 1,5 i 6,0[1], ali ispituju i superlipofilne supstance (koje imaju vrijednost log P_{ow} > 6,0). Preliminarna procjena faktora biokoncentracije (bioconcentration faktor, u daljem tekstu: BCF), koji se ponekad označava sa KB, za takve superlipofilne supstance je veća od vrijednosti faktora biokoncentracije u ravnotežnom stanju (steady-state bioconcentration factor, u daljem tekstu: BCF_{SS}) do kojih se dolazi izvoĐenjem laboratorijaskih ispitivanja. Preliminarne procjene faktora biokoncentracije za organske supstance sa visokim vrijednostima log P_{ow} čak do 9,0 dobijaju se pomoću jednačine.

Parametri koji određuju biokoncentracioni potencijal uključuju konstantu brzine unosa (k_1), konstantu brzine eliminacije (k_2) i faktor biokoncentracije u ravnotežnom stanju BCF_{SS}.

Ispitivanje sa obilježenim ispitivanim supstancama olakšava analizu uzoraka vode i uzoraka tkiva ribe, ali pomaže i u planiranju sljedećih koraka - da li je potrebno identifikovati i kvantifikovati produkte razgradnje. Ukoliko se mjere ukupni radioaktivni rezidijumi (npr. sagorijevanjem ili rastvaranjem tkiva), BCF se odnosi na polaznu supstancu, preostale metabolite, kao i asimilirani ugljenik. Faktori biokoncentracije koji se baziraju na ukupnim

radioaktivnim rezidijumima ne porede se direktno sa faktorima biokoncentracije koji su dobijeni specifičnim hemijskim analizama samo za polaznu supstancu.

Postupci čišćenja se koriste u ispitivanjima sa radioobilježenim supstancama da bi se odredila vrijednost BCF za polaznu supstancu, a po potrebi se mogu okarakterisati i glavni metaboliti. Moguće je kombinovati studije proučavanja metabolizma riba i ispitivanja biokoncentracije putem analize i identifikacije rezidiuma u tkivima.

1.2. Definicije i jedinice mjere

Biokoncentracija/bioakumulacija je povećanje koncentracije ispitivane supstance u ili na organizmu (ili određenim tkivima) u odnosu na koncentraciju ispitivane supstance u odgovarajućem medijumumu.

Faktor biokoncentracije (BCF ili K_B) je odnos koncentracije ispitivane supstance u ili na ribi, ili određenim tkivima ribe (C_f se izražava u µg/g (ppm)) i koncentracije te supstance u okružujućem medijumumu (C_w se izražava u µg/ml (ppm)), u bilo kom trenutku faze unosa tokom ispitivanja akumulacije supstance.

Faktor biokoncentracije u ravnotežnom stanju (BCF_{SS} ili K_B) se ne mijenja značajno u toku dužeg vremenskog perioda. Koncentracija ispitivane supstance u medijumumu u toku ovog perioda je stalna.

Plato ili ravnotežno stanje se uočava kod grafičkog prikaza koncentracije ispitivane supstance u ribi (C_f) u funkciji vremena kao ravna linija paralelna sa x-osom. Ravnotežnim stanjem se smatra kada se rezultati tri uzastopna mjerenja koncentracije ispitivane supstance C_f u uzorcima uzetim u intervalima od najmanje dva dana međusobno razlikuju do ± 20% i kad ne postoje značajne razlike između tri perioda uzorkovanja. Kad se analiziraju združeni uzorci uraditi najmanje četiri uzastopne analize. Za ispitivane supstance koje sporo usvajaju, pogodniji su intervali od sedam dana.

Faktor biokoncentracije koji se iizračunava direktno preko vrijednosti konstanti brzine unosa i eliminacije (k_1/k_2) je kinetički faktor biokoncentracije (u daljem tekstu: BCF_K).

Koeficijent raspodjele u sistemu n-oktanol/voda (P_{ow}) je odnos vrijednosti za rastvorljivost hemijske supstance u n-oktanolu i vrijednosti za rastvorljivost u vodi u ravnotežnom stanju (Metoda A.8. koja je data u ovom pravilniku). Logaritam od P_{ow} koristi se kao indikator biokoncentracionog potencijala hemijske supstance u akvatičnim organizmima.

Faza izloženosti ili unosa je vrijeme u toku kojeg je riba izložena ispitivanoj supstanci.

Konstanta brzine unosa (k_1) je numjerička vijrednost kojom se definiše stepen porasta koncentracije ispitivane supstance u/na ribi (ili određenim tkivima ribe) kad je riba izložena datoj supstanci (k_1 se izražava u dan^{-1}).

Faza post-izloženosti ili faza eliminacije je period u kome dolazi do smanjenja (ili potpune eliminacije) ispitivane supstance iz jedinki (ribe) (ili određenog tkiva te ribe), a nastupa nakon premještanja jedinki iz medijumuma u čist medijumum (tj. medijumum koji ne sadrži ispitivanu supstancu).

Konstanta brzine eliminacije (k_2) je numjerička vrijednost kojom se definiše stepen smanjenja koncentracije ispitivane supstance u jedinci (riba) (ili određenim tkivima te ribe) nakon transfera jedinki iz medijumuma u čist medijumum (k_2 se izražava kao dan^{-1}).

1.3. Princip metode ispitivanja

Ispitivanje se sastoji iz dvije faze: faze izloženosti (unosa) i faze post-izloženosti (eliminacije). Tokom faze unosa, pojedinačne grupe riba iste vrste izložene su ispitivanoj supstanci u najmanje dvije koncentracije. Ribe se zatim prenose u čist medijumum i nastupa faza eliminacije. Faza eliminacije je neophodna, osim ukoliko je unos ispitivane supstance u toku faze unosa bio neznatan (npr. BCF manji od 10). Koncentracija ispitivane supstance u ili na ribi (ili određenim tkivima ribe) se prati u toku obije faze ispitivanja. Uz dvije koncentracije ispitivane supstance (dvije ispitivane grupe), postavlja se i kontrola sa jedinkama riba u uslovima identičnim onima u ispitivanim grupama, osim što kod kontrole jedinke nisu izložene ispitivanoj supstanci. Na taj način se uočeni negativni efekti u ispitivanim grupama pripisuju isključivo djelovanju ispitivane supstance.

Faza unosa traje 28 dana, osim u slučaju kad se ravnotežno stanje uspostavi ranije. Trajanje faze unosa i vrijeme do postizanja ravnotežnog stanja se predviĐa pomoću jednačine iz Dijela III ove metode. Nakon toga započinje faza eliminacije: jedinke riba se premještaju u drugi čisti akvarijum sa istim medijumumom, ali bez ispitivane supstance. Kad je moguće, BCF izračunati i kao BCF_{SS}, tj. kao odnos koncentracije supstance u ribi (C_f) i njene koncentracije u vodi (C_w) pri uočenom ravnotežnom stanju i kao BCFK, tj. odnos vrijednosti konstanti brzine unosa (k_1) i eliminacije (k_2), ukoliko se proces opisuje kao kinetika prvog reda. Ukoliko se proces ne opisuje kao kinetika prvog reda, upotrijebiti složeniji modeli (Dio IV ove metode).

Ako se ravnotežno stanje ne postigne u roku od 28 dana, faza unosa se produžava do trenutka uspostavljanja ravnoteže ili najviše do 60 dana, kada se započinje sa fazom eliminacije.

Vrijednosti za konstantu brzine unosa, konstantu brzine eliminacije (gubitka) (ili više konstanti, kad su uključeni složeniji modeli), faktor biokoncentracije i gdje je to moguće, intervali povjerenja za svaki od ovih parametara iizračunavaju se iz modela koji najbolje opisuje izmjerene koncentracije ispitivane supstance u ribi i vodi.

BCF se izražava u funkciji ukupne svježe težine ribe. U posebnim slučajevima se koriste određena tkiva ili organi (npr. mišići, jetra) ako je riba dovoljno velika ili se dijeli u jestive (fileti) i nejestive dijelove (unutrašnji organi). Za organske supstance postoji veza između biokoncentracionog potencijala i lipofilnosti, kao i odgovarajući odnos između sadržaja lipida u jedinkama ribe i uočene biokoncentracije tih supstanci. Da se smanji ovaj izvor varijabilnosti rezultata ispitivanja za supstance sa izraženom lipofilnošću (odnosno sa log P_{ow}> 3), biokoncentraciju izraziti u odnosu na ukupnu težinu jedinke i u odnosu na sadržaj lipida u organizmu.

Sadržaj lipida odrediti na istom biološkom materijalu u kojem se mjeri koncentracija ispitivane supstance.

1.4. Podaci o ispitivanoj supstanci

Prije izvoĐenja ispitivanja biokoncentracije, potrebni su sljedeći podaci o ispitivanoj supstanci:

- rastvorljivost u vodi;
- koeficijent raspodjele u sistemu n-oktanol/voda, P_{ow} (označava se i sa K_{ow}, određuje se HPLC metodom opisanom u Metodi A.8);
- hidroliza;
- fototransformacija u vodi pod prirodnim ili vještačkim osvjetljenjem i u uslovima osvjetljenja koji su definisani ovom metodom;
- površinski napon (odnosno za supstance gdje se log P_{ow} ne određuje); - napon pare;
- brza biološka razgradljivost (ako je odgovarajuće).

Ostali potrebni podaci uključuju toksičnost ispitivane supstance za izabranu vrstu ribe koja se koristi u ispitivanju, po mogućnosti asimptotska LC_{50} (odnosno nezavisna od vremena). Potrebna je odgovarajuća analitička metoda poznate tačnosti, preciznosti i osjetljivosti za kvantifikaciju ispitivane supstance u rastvorima i u biološkom materijalu, kao i podatke o pripremi i čuvanju uzorka. Poznat je i limit detekcije ispitivane supstance kako u vodi, tako i u ribljim tkivima. Ako se koristi ispitivana supstanca obilježena sa izotopom ugljenika C^{14}, treba znati i procenat radioaktivnosti koji se pripisuje nečistoćama.

1.5. Validnost ispitivanja

Da bi se ispitivanje smatralo validnim zadovoljavaju se uslovi:
- variranje temperature manje od ± 2 °C;
- saturacija kiseonika veća od 60%;
- koncentracija ispitivane supstance u posudama (akvarijumima) održava se unutar ± 20% srednje vrijednosti izmjerene u toku faze unosa;
- smrtnost ili drugi štetni efekti/bolesti uočeni kod jedinki u kontroli i ispitivanim grupama su manji od 10% na kraju ispitivanja. Kad je ispitivanje produženo na nekoliko sedmica ili mjeseci, smrtnost ili drugi štetni efekti u kontroli i ispitivanim grupama su manji od 5% mjesečno i da ne premašuju ukupno 30% u toku trajanja cijelog ispitivanja.

1.6. Referentne supstance

Ispitivanje referentnih supstanci za koje se rapolaže podacima o biokoncentracionom potencijalu je korisno za provjeru procedure ispitivanja. Nisu preporučene određene referentne supstance. **1.7. Opis metode**

1.7.1. Oprema

Svaki dio opreme je napravljen od inertnog materijala koji ne utiče štetno na jedinke koje se koriste u ispitivanju. Koriste se standardni pravougaoni ili cilindrični akvarijumi, napravljeni od hemijski inernog materijala i odgovarajuće zapremine koji odgovara dinamici nasada. Upotrebu mekih plastičnih cijevi svesti na najmanju moguću mjeru. Prednost se daje teflonu, nerĐajućem čeliku, odnosno staklenim cijevima. Za supstance sa visokim koeficijentima adsorpcije, kao što su sintetički piretroidi, koristiti silanizirano staklo. Oprema se, u ovom slučaju, nakon upotrebe baca.

1.7.2. Voda

Koristi se obična voda, koja se dobija iz nekontaminiranog izvora sa ujednačenim kvalitetom. Kvalitet vode za razblaživanje je takav da za vrijeme trajanja perioda

aklimatizacije i perioda ispitivanja omogući preživljavanje odabrane vrste riba i da ne izaziva negativne promjene u izgledu i ponašanju jedinki. U idealnom slučaju, pokazati da izabrana vrsta ribe preživljava, raste i razmnožava se u vodi za razblaživanje (npr. u laboratorijaskoj kulturi ili u toku ispitivanja toksičnosti). U opisu kvaliteta vode navesti pH vrijednost, tvrdoću, ukupne suspendovane materije, ukupan organski ugljenik. Navesti i sadržaj amonijaka, nitrita i alkalitet, a za morske vrste i salinitet. Parametri potrebni za optimalan rast i razvoj riba o su poznati i u Dijelu II ove metode date su preporučene maksimalne koncentracije seta parametara za slatku i morsku vodu koja se koristi u ispitivanju.

Tokom trajanja ispitivanja, voda je ujednačenog kvaliteta. Vrijednost pH je između 6,0 i 8,5 i u toku ispitivanja se održava unutar opsega od ± 0,5. Da bi se osiguralo da voda za razblaživanje neće uticati na rezultate ispitivanja (npr. kompleksiranjem ispitivane supstance) ili da neće štetno uticati na jedinke odabrane vrste riba, periodično uzimati uzorke vode za analizu. Izmjeriti koncentracije teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), glavnih anjona i katjona (npr. Cu, Mg, Na, K, Cl, SO_4), pesticida (npr. ukupne organofosforne i ukupne organohlorne pesticide), ukupnog organskog ugljenika i suspendovanih materija, npr. na svaka tri mjeseca ako se zna da je voda za razblaživanje relativno ujednačenog kvaliteta. Ako se utvrdi da je kvalitet vode ujednačen u toku najmanje godinu dana, provjera kvaliteta je reĐa, a intervali duži (npr. svakih 6 mjeseci).

Sadržaj prirodnih materija kao i ukupni organski ugljenik (u daljem tekstu: TOC) u vodi za razblaživanje je što manji da bi se izbjegla adsorpcija ispitivane supstance na organsku materiju što može smanjiti biodostupnost supstanci[12]. Maksimalna prihvatljiva vrijednost za suspendovane materije je 5 mg/l (suve materije, ne prolazi filter od 0,45 µm) i za ukupni organski ugljenik 2 mg/l (Dio II ove metode). Voda se filtrira prije upotrebe. Ekskreti jedinki, kao i ostaci hrane doprinose ukupnom sadržaju organskog ugljenika, pa ih svesti na minimalnu mjeru. Tokom čitavog perioda ispitivanja, koncentracija organskog ugljenika u akvarijumu nije veća od koncentracije organskog ugljenika koja potiče od ispitivane supstance. Koncentracija rassupstancaača, ukoliko se koristi u ispitivanju, nije veća od 10 mg/l (± 20%).

1.7.3. Ispitivani rastvori

Osnovni rastvor ispitivane supstance priprema se u odgovarajućoj koncentraciji. Osnovni rastvor se priprema miješanjem ili mućkanjem ispitivane supstance u vodi za razblaživanje. Rassupstancaači koji se koriste su etanol, metanol, etilenglikol monometil eter, etilenglikol dimetil eter, dimetilformamid i trietilen glikol. Disperziona sredstva koja se koriste su Cremophor RH40, Tween 80, metilceluloza 0,01% i HCO-40. Mjere opreza uzeti u obzir kad se koriste brzo biološki razgradljiva disperziona sredstva, jer prouzrokuju probleme sa rastom bakterija u ispitivanju u protočnim uslovima. Ispitivana supstanca se označava radioaktivnim izotopom i najvišeg je stepena čistoće (po mogućnosti > 98%).

Za ispitivanje u protočnim uslovima koristi se sistem sa dispenzorom i diluterom rastvora ispitivane supstance (npr. pumpa sa mjeračem, sistem za proporcionalno razblaživanje, sistem za zasićenje) da bi se u akvarijumima održavala konstantna koncentracija te supstance. Najmanje pet puta u toku dana izmjeniti cjelokupnu zapreminu akvarijuma. Prednost se daje ispitivanju u protočnim uslovima, ali u slučajevima gdje to nije moguće (npr. kad postoje štetni efekti na organizme koje se

12
4. Kemppainen B.W. and Reifenrath W.G., (1990) Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

koriste u ispitivanju) izvodi se i ispitivanje u semistatičkim uslovima, ako su zadovoljeni kriterijumi validnosti. Protok osnovnog rastvora ispitivane supstance i vode za razblaživanje provjerava se 48 sati prije početka i zatim najmanje jedanput dnevno u toku ispitivanja. Ova provjera uključuje određivanje protoka u svakom akvarijumu i protok ne smije da varira više od 20% u jednom akvarijumu, kao i između akvarijuma.

1.7.4. Izbor vrsta za potrebe ispitivanja

Kriterijumi za izbor vrste riba su da su lako dostupne, da se dobijaju u odgovarajućim veličinama i da se na zadovoljavajući način uzgajaju u laboratorijai. Drugi kriterijumi za izbor vrste uključuju njenu komercijalnu, rekreacionu i ekološku važnost, kao i mogućnost poređenja osjetljivosti sa drugim vrstama, prethodnu uspješnu upotrebu u ispitivanjima, itd.

Preporučene vrste za potrebe ove metode navedene su Dijelu II ove metode. Koriste se i druge vrste, ali u tom slučaju modifikovati metodu ispitivanja kako bi se obezbijedili pogodni uslovi. U izvještaju se navodi objašnjenje za izbor vrste i metode ispitivanja.

1.7.5. Gajenje riba

Aklimatizacija matičnog jata riba traje najmanje dvije sedmice u vodi pri temperaturnom režimu i režimu ishrane definisanim za samo ispitivanje. Nakon perioda aklimatizacije od 48 sati, uočava se smrtnost i primjenjuju sljedeći kriterijumi:

- ako je smrtnost veća od 10% populacije u sedam dana, cijelo matično jato se odbacuje; - ako je smrtnost između 5% i 10% populacije u sedam dana, matično jato se aklimatizuje još sedam dana;
- ako je smrtnost manja od 5% populacije u sedam dana, matično jato se prihvata; - ako je smrtnost iznad 5% u narednih 5 dana, cijelo jato se odbacuje.

Jedinke ribe koje se koriste u ispitivanju nemaju vidljivih bolesti i abnormalnosti. Svaka oboljela jedinka isključuje se iz ispitivanja. Jedinke se ne liječe dvije sedmice prije početka ispitivanja, kao niti za vrijme samog ispitivanja.

1.8. Izvođenje ispitivanja

1.8.1. Preliminarno ispitivanje

Preliminarno ispitivanje se sprovodi kako bi se postavili optimalni uslovi za konačno ispitivanje, npr.
izbor ispitivanih koncentracija supstance, trajanje faza unosa i eliminacije.

1.8.2. Uslovi izloženosti

1.8.2.1. Trajanje faze unosa

Trajanja faze unosa se predviđa na osnovu iskustva (npr. iz prethodnog ispitivanja, ili rezultata ispitivanja sa supstancom sličnog potencijala za akumulaciju) ili određenih empirijskih odnosa na osnovu poznavanja ili rastvorljivosti u vodi ili koeficijenta raspodjele u sistemu n-oktanol/voda za ispitivanu supstancu (Dio IV ove metode).

Faza unosa traje 28 dana, osim u slučaju kad se uoči da se ravnotežno stanje uspostavilo i ranije. Ako se ravnotežno stanje ne dostigne do kraja 28. dana, fazu unosa produžiti do dostizanja ravnotežnog stanja ili do 60 dana, zavisno od toga koji uslov se prije ispuni.

1.8.2.2. Trajanje faze eliminacije

Polovina vremena koliko traje faza unosa je dug period da nastupi zadovoljavajuće smanjenje sadržaja ispitivane supstance u organizmu jedinke od npr. 95% (objašnjenje procjene dato je u Dijelu IV ove metode). Ako je vrijeme da se postigne 95% smanjenja nepraktično dugo i prekoračuje npr. dvostruku dužinu trajanja normalnog trajanja faze unosa (tj. više od 56 dana) koristi se kraći period (odnosno dok koncentracija ispitivane supstance ne dostigne vrijednost manje od 10% ravnotežne koncentracije). Za određivanje konstanti brzine eliminacije supstanci kod kojih su procesi unosa i eliminacije složenijii ne predstavljaju kinetiku prvog reda, produžiti trajanje faze eliminacije. Taj period je određen vremenom u toku kojeg koncentracija ispitivane supstance u ribi ostaje iznad limita detekcije.

1.8.2.3. Broj jedinki riba

Broj jedinki riba za svaku ispitivanu koncentraciju je dovoljan da obezbijedi najmanje četiri jedinke ribe po uzorkovanju. Za preciznija statistička određivanja, koristi se veći broj jedinki riba.

Ukoliko se u ispitivanju koriste odrasle jedinke riba, u izvještaju navesti da li se radi o mužjaku ili ženki ili se koriste jedinke oba pola. Ako se koriste jedinke oba pola, potvrditi da razlike u sadržaju lipida između mužjaka i ženki prije početka izlaganja ispitivanoj supstanci nisu značajne. Ponekada se objedine uzorci za sve jedinke muškog i za sve jedinke ženskog pola.

Za svako ispitivanje biraju se jedinke približno iste težine, tako da težina najmanjih primjeraka nije manja od dvije trećine težine najvećih primjeraka. Sve jedinke su istog uzrasta i potiču iz istog matičnog jata. Težina i uzrast jedinki riba imaju značajan uticaj na vrijednost BCF[13], pa se ovi podaci navode u izvještaju. Prije ispitivanja iz matičnog jata uzeti nekoliko jedinki riba i izmjeriti njihovu težinu kako bi se procjenila srednja težina jedinki matičnog jata.

1.8.2.4. Nasad

Velika količina vode u odnosu na težinu jedinki riba koristi se kako bi se smanjila redukcija vrijednosti Cw prouzrokovana dodavanjem jedinki ribe na početku ispitivanja i da bi se izbjeglo smanjenje koncentracije rastvorenog kiseonika. Režim nasada jedinki ribe odgovara vrsti ribe koja se koristi u ispitivanju. Koristi se režim nasada od 0,1 g do 1,0 g ribe (svježe mase) po litru vode na dan. Povećan unos se koristi ako se pokaže da se tražena koncentracija ispitivane supstance održava unutar granica od ± 20% i da saturacija kiseonika ne pada ispod 60%.

U izboru odgovarajućeg režima unosa, uzima se u obzir prirodno stanište date vrste riba. Na primjer, riba koja živi pri dnu može za istu zapreminu vode zahtijevati veću površinu dna u akvarijumu u odnosu na pelagijske vrste.

1.8.2.5. Ishrana

Tokom perioda aklimatizacije i perioda trajanja ispitivanja, ribe se hrane odgovarajućom hranom poznatog sadržaja lipida i ukupnih bjelančevina, u količini dovoljnoj da ih održi zdravima i sa stalnom tjelesnom težinom. Ribe se hrane svaki dan u toku čitavog perioda aklimatizacije i u toku trajanja ispitivanja u količini od približno 1% do 2% tjelesne težine

dnevno. Ovakav režim održava sadržaj lipida kod većine ribljih vrsta na relativno ujednačenom nivou u toku ispitivanja. Količina hrane se prerečunava, npr. jednom sedmično, kako bi se održala ujednačena tjelesna težina i ujednačen sadržaj lipida. Za ovaj preračun, težina jedinki u svakom akvarijumu određuje se na osnovu težine jedinki ribe koje su prethodni put uzete za uzorkovanje iz tog akvarijumu. Ne mjeri se težina preostalih jedinki u akvarijumu.

Hrana koja nije pojedena i ekskrementi svakodnevno se ispuštaju iz akvarijuma nakon hranjenja (30 minuta do 1 sat). Akvarijumi se održavaju čistim, u što većoj mogućoj mjeri, u toku čitavog

trajanja ispitivanja, tako da se koncentracija organske materije održava na što nižem nivou, s obzirom na to da prisustvo organskog ugljenika ograničava biodostupnost ispitivane supstance.

Mnoge vrste riblje hrane napravljene su od ribljih preraĐevina, analizirati sadržaj te hrane na prisustvo ispitivane supstance. Po potrebi, analizirati pesticide i teške metale u hrani.

1.8.2.6. Svijetlost i temperatura

Fotoperiod uobičajeno traje 12 do 16 sati, a temperatura (± 2 °C) odgovara vrsti riba koja se koristi u ispitivanju (Dio III ove metode). Vrsta i svojstva osvjetljenja su poznati. Zbog moguće transformacije ispitivane supstance pod uticajem svijetlosti biti oprezan pri datim uslovima osvjetljenja definisanim za ovu metodu. Koristi se odgovarajuće osvjetljenje i izbjegava izlaganje ribe vještačkom svijezemljištu. U nekim slučajevima koristiti odgovarajući filter za blokiranje UV zračenja talasne dužine ispod 290 nm.

1.8.2.7. Koncentracije ispitivane supstance

Ispitivanje se odvija u protočnom sistemu i ispituju se najmanje dvije koncentracije ispitivane supstance. Viša ili najviša koncentracija ispitivane supstance obično je 1% akutne asimptotske vrijednosti LC_{50} te supstance i najmanje deset puta je viša od limita detekcije primjenjenog analitičkog postupka.

Najviša ispitivana koncentracija supstance se određuje dijeljenjem 96 h LC_{50} vrijednosti za akutnu toksičnost sa odgovarajućom ACR vrijednošću (ACR nekih hemikalija se kreće u rasponu od 3 do 100). U ispitivanju se koristi jedna ili više drugih koncentracija koje se od najviše ispitivane koncentracije razlikuju za faktor 10. Ako to nije moguće, zbog kriterijuma od 1% LC_{50} i limita detekcije analitičke metode, upotrebljava se manji faktor ili se razmatra ispitivanje supstance koja je obilježena radioaktivnim izotopom ugljenika - C^{14}. Nijedna koncentracija nije jednaka maksimalnoj rastvorljivosti ispitivane supstance.

Kada se koristi rassupstancaač, njegova koncentracija nije veća od 0,1 ml/l i ista je u svim tretmanima. Rassupstancaač zajedno sa ispitivanom supstancom doprinosi ukupnom sadržaju organskog ugljenika u medijumumu i poznat je njegov udio u ukupnom sadržaju organskog ugljenika. Upotrebu rassupstancaača svesti na najmanju moguću mjeru.

1.8.2.8. Kontrole

U ispitivanju je potrebno imati jednu kontrolnu grupu sa jedinkama ribe samo u čistom medijumumu ili, ukoliko je relevantno, dodatnu kontrolnu grupu sa rassupstancaačem, po uslovom da je prethodno utvrĐeno da dati rassupstancaač ne ipoljava efekat na jedinke. U suprotnom, postavljaju se obije kontrolne grupe.

1.8.3. Učestalost mjerenja kvaliteta vode

Tokom ispitivanja u svim akvarijumima mjeriti: rastvoreni kiseonik, TOC, pH vrijednost i temperaturu akvarijumima. Ukupna tvrdoća i salinitet, ukoliko su relevantni, mjere se u kontrolama i u jednom akvarijumu sa višom (ili najvišom) koncentracijom. Rastvoreni kiseonik i salinitet, ukoliko je relevantno, mjere se najmanje tri puta: na početku, oko sredine i na kraju faze unosa i jednom sedmično u toku faze eliminacije. TOC se mjeri na početku ispitivanja (24 sata i 48 sati prije početka faze unosa) prije unosa ribe i najmanje jedanput sedmično u toku faza unosa i eliminacije. Temperatura se mjeri svakodnevno. Vrijednost pH se mjeri na početku i na kraju svake faze, a tvrdoća jedanput u toku ispitivanja. Neprekidno mjeriti temperaturu najmanje u jednom akvarijumu.

1.8.4. Uzorkovanje i analiziranje ribe i vode

1.8.4.1. Raspored uzorkovanja ribe i vode

Uzorak vode iz komora za ispitivanje, radi određivanja koncentracije ispitivane supstance, uzima se prije unosa ribe i u toku faza unosa i eliminacije. Voda se uzima kad i riba i to prije njenog hranjenja. Tokom faze unosa, mjere se koncentracije ispitivane supstance da bi se potvrdilo da su zadovoljeni kriterijumi kvaliteta.

Jedinke riba uzorkuju se najmanje pet puta u toku faze unosa i najmanje četiri puta u toku faze eliminacije. U nekim slučajevima je teško izračunati dovoljno preciznu procjenu BCF vrijednosti na osnovu ovog broja uzoraka, naročito kad se radi o procesu unosa i eliminacije koji se ne ponaša po modelu kinetike prvog reda, pa se uzorkovanje obavlja češće u toku obije faze (Dio V ove metode). Dodatni uzorci čuvaju se i analiziraju samo ako se rezultati prvog kruga analiza pokažu neodgovarajućima za iizračunavanje BCF sa željenom preciznošću.

Primjer prihvatljivog rasporeda uzimanja uzoraka dat je u Dijelu IV ove metode. Drugi rasporedi se određuju pomoću drugih pretpostavljenih vrijednosti K_{ow} za iizračunavanje trajanja izloženosti u kome dolazi do 95% unosa.

Uzorkovanje se nastavlja u toku faze unosa sve dok se ne uspostavi ravnotežno stanje ili u toku 28 dana, zavisno od toga koji se uslov prije ispuni. Ako se ravnotežno stanje ne postigne u toku 28 dana, uzorkovanje se nastavlja sve do postizanja ravnotežnog stanja ili do 60 dana, u zavisnosti od toga koji uslov se prije ispuni. Prije početka faze eliminacije, jedinke riba se prenose u akvarijume sa čistim medijumumom.

1.8.4.2. Uzimanje i priprema uzoraka

Uzorci vode za analizu uzimaju se npr. ispuštanjem vode kroz inertne cijevi postavljene na sredini akvarijuma. Filtracija ni centrifugiranje ne odvajaju uvjek frakcije ispitivane supstance koje nisu biodostupne od frakcija koje su biodostupne (važi naročito za superlipofilne hemikalije odnosno one hemikalije čiji je log $P_{ow} > 5$)[1, 5]. Nije uvjek potrebno raditi filtriranje ili

centrifugiranje uzoraka. Umjesto toga, komore za ispitivanje držati što čistijim, a u toku faza unosa i faze eliminacije prati se sadržaj ukupnog organskog ugljenika.

Pri svakom uzorkovanju odgovarajući broj jedinki riba (najmanje četiri) uklanja se iz komore za ispitivanje. Uzorkovane jedinke ispiraju se vodom, obrišu od suvišne tečnosti, trenutno ubijaju na najhumaniji način i izmjere.

Analizirati uzorke vode i jedinki riba odmah nakon uzorkovanja, čime se izbjegava razgradnja ili drugi načini gubitka i omogućava iizračunavanje brzina unosa i eliminacije u toku ispitivanja. Brzom analizom se omogućava pravovremeno određivanje tačke postizanja ravnotežnog stanja.

Ako se analiza ne obavi odmah, uzorci se čuvaju na odgovarajući način. Prije početka ispitivanja potrebno je imati podatke o odgovarajućim načinima skladištenja za ispitivanu supstancu, npr.
zamrzavanje, čuvanje na temperaturi od 4 °C, trajanje skladištenja, ekstrakcija, itd.

1.8.4.3. Kvalitet analitičkog postupka

Metoda ispitivanja zavisi od tačnosti, preciznosti i osjetljivosti primjenjene analitičke metode za datu ispitivanu supstancu, pa je neophodno ispitivanjem provjeriti da li su preciznost i ponovljivost hemijske analize, kao i efikasnost analitičkog postupka za ispitivanu supstancu u vodi i ribi, zadovoljavajući za određeni analitički postupak. Analizirati i vodu za razblaživanje na prisustvo date ispitivane supstance.

Koriguju se vrijednosti C_w i C_f dobijene iz ispitivanja i to pomoću vrijednosti efikasnosti analitičke tehnike i vrijednosti fona u kontroli. Pažljivo rukovati uzorcima ribe i vode tako da se u najvećoj mogućoj mjeri onemogući kontaminacija i gubici (na primjer, gubici koji mogu nastati usled adsorpcije na opremu za uzorkovanje).

1.8.4.4. Analiza uzoraka ribe

Ako se u ispitivanju koriste obilježene supstance, analizira se ukupni radioobilježeni materijal (odnosno polazna supstanca i njeni metaboliti), ili su uzorci prečišćeni tako da se polazna supstance analizira posebno. Glavni metaboliti se okarakterišui u ravnotežnom stanju ili na kraju faze unosa, zavisno od toga koji uslov se prije ispuni. Ako je BCF u smislu ukupnih radioaktivnih rezidijuma ± 1.000% (za određene kategorije hemikalija, kao što su pesticidi) identifikuju se i kvantifikuju produkti razgradnje koji čine ± 10% ukupnih rezidijuma u tkivu ribe u ravnotežnom stanju. Ako se identifikuju i kvantifikuju produkti razgradnje koji čine ± 10% ukupnih radioaktivnih rezidijuma u ribljem tkivu, sprovodi se i identifikacija i kvantifikacija produkata razgradnje u medijumumu.

Koncentracija ispitivane supstance se mjeri u svakoj jedinki ribe koja je prethodno izmjerena. Koncentracija ispitivane supstance se određuje u objedinjenom uzorku, ali takvo određivanje smanjuje broj statističkih postupaka koji se primjenjuju na date podatke. Ako se uzimaju u obzir specifični statistički postupak i statistička snaga, u ispitivanje se uključuje odgovarajući broj jedinki riba da bi se zadovoljili kriterijumi za željeni postupak analize objedinjenih uzoraka i za statistički značaj ispitivanja.

BCF se izražava u funkciji ukupne svježe mase, a za visoko lipofilne supstance i u funkciji sadržaja lipida. Sadržaj lipida u ribama određuje se pri svakom uzimanju uzoraka, ukoliko je to moguće. Za određivanje sadržaja lipida koriste se odgovarajuće metode (Dio IV ove

metode). Kao standardna metoda koristi se tehnika ekstrakcije hloroform/metanol. Različite metode daju različite vrijednosti, pa je važno opisati primjenjenu metodu. Analiza sadržaja lipida po mogućnosti se sprovodi u istom ekstraktu u kojem se mjeri i koncentracija ispitivane supstance, s obzirom na to da se lipidi često uklanjaju iz ekstrakta da bi se ekstrakt mogao analizirati metodom hromatografije. Sadržaj lipida u ribi (u mg/kg mokre težine) na kraju ispitivanja ne razlikuje se za više od ± 25% u odnosu na sadržaj na početku ispitivanja. Navodi se i procenat suve materije tkiva da bi se omogućila konverzija vrijednosti koncentracije lipida u funkciji svježe mase u koncentraciju lipida u funkciji suve mase.

2. Podaci

2.1. Obrada rezultata

Kriva unosa za ispitivanu supstancu dobija se grafičkim prikazom koncentracije ispitivane supstance u ili na ribi (ili određenim tkivima) u fazi unosa u funkciji vremena. Ako je kriva dostigla plato, odnosno ako je postala približno paralelna sa x-osom, BCF_{SS} se iizračunava formulom:

$$BCFss = \frac{C_f \text{ kaoravnotežnostan je (srednjavrijednost)}}{C_w \text{kaoravnotežnostan je (srednjavrijednost)}}$$

Kad se ne dostigne ravnotežno stanje, izračunati BCF_{SS} koji je dovoljno precizan za procjenu rizika iz ravnotežnog stanja kao 80% ($1,6/k_2$) ili 95% ($3,0/k_2$) ekvilibrijuma. Određuje se i BCF_K kao odnos k_1/k_2, dvije konstante kinetike prvog reda. Konstanta brzine eliminacije (k_2) obično se određuje iz krive eliminacije (odnosno grafičkog prikaza smanjenja koncentracije ispitivane supstance u ribi u funkciji vremena). Zatim se iizračunava konstanta brzine unosa (k_1) s obzirom na k_2 i vrijednost C_f koja se određuje iz krive unosa (Dio VI ove metode). Najbolji postupak za određivanje vrijednosti BCF_K i konstanti k_1 i k_2 je upotrebom računara korišćenjem metoda za procjenu nelinearnih parametara . Može se koristiti i grafički metod za iizračunavanje k_1 i k_2. Ako kriva eliminacije očigledno nije kriva kinetike prvog reda, upotrebljavaju sersloženiji modeli i savjet statističara.

2.2. Tumačenje rezultata

Prilikom tumačenja rezultata ispitivanja voditi računa kada se izmjerene koncentracije ispitivane supstance nalaze blizu limita detekcije primjenjene analitičke metode.

Definisane krive unosa i eliminacije su indikatori dobrog kvaliteta podataka. Razlika između vrijednosti konstanti unosa/eliminacije za dvije primjenjene koncentracije ispitivane supstance su manje od 20%. U izvještaju o ispitivanju navode se i objašnjavaju opažene značajne razlike u brzinama unosa/eliminacije za dvije primjenjene koncentracije ispitivane supstance. Intervali povjerenja za vrijednosti BCF iz dobro osmišljenog i izvedenog ispitivanja iznose oko ± 20%. **3. Izvještaj**

Izvještaj sadrži sljedeće podatke: 1) ispitivana supstanca:
- fizička priroda i ukoliko je relevantno, fizičke i hemijske osobine;
- podaci o hemijskoj identifikaciji (uključujući sadržaj organskog ugljenika, ukoliko je prikladno); - ukoliko se ispituju obilježene supstance, tačan položaj radioaktivno obilježenih atoma i procenat radioaktivnosti povezan sa nečistoćama;

2) vrste koje se koriste u ispitivanju:

- latinski naziv, soj, porijeklo, prethodni tretmani (ukoliko ih je bilo), aklimatizacija, uzrast, veličina jedinki, itd.

3) uslovi ispitivanja:

- primjenjeni uslovi ispitivanja (npr. protočni ili semistatički);
- tip i svojstva primjenjenog osvjetljenja i trajanje fotoperioda;

akvarijumima, broj ponavljanja, broj jedinki riba po ponavljanju, broj koncentracija ispitivane supstance, dužina trajanja faza unosa i eliminacije, učestalost uzimanja uzoraka ribe i vode);

- postupak pripreme osnovnih rastvora i učestalost izmjene (ukoliko se koristi rassupstancaač za povećanje rastvorljivosti ispitivane supstance, mora se navesti koji rassupstancaač, njegova koncentracija i doprinos sadržaju ukupnom organskog ugljenika u medijumumu);
- nominalne koncentracije ispitivane supstance, srednje vrijednosti i standardne devijacije

koncentracija izmjerenih u akvarijumima i postupak kojim su određene;

- izvor vode za razblaživanje, opis svake prethodne obrade, rezultati bilo kog ispitivanja koji potvrđuje da jedinke ribe mogu da žive u toj vodi, kao i osobine vode: pH vrijednost, tvrdoća, temperatura, koncentracija rastvorenog kiseonika, rezidijumi hlora (ukoliko je mjereno), ukupni organski ugljenik, suspendovane materije, salinitet mediuma (ukoliko je primjereno) i rezultati svih mjerenja koja su uraĐena u toku ispitivanja;
- kvalitet vode u akvarijumima, pH vrijednost, tvrdoća, TOC, temperatura i koncentracija rastvorenog kiseonika;
- detaljni podaci o hranjenju (npr, vrsta hrane, porijeklo, sastav - po mogućnosti, bar sadržaj lipida i proteina, količina hrane i učestalost hranjenja);
- podaci o obradi uzoraka ribe i vode, uključujući detalje o pripremi, čuvanju, ekstrakciji i analitičkim metodama (i preciznost) primjenjenim na ispitivanoj supstanci i sadržaj lipida ukoliko je mjeren). 4) rezultati:
- rezultati svakog preliminarnog ispitivanja;
- smrtnost u kontrolisanim i u svim ispitivanim grupama, kao i svako uočeno abnormalno ponašanje;
- sadržaj lipida u jedinkama ribe (ukoliko je odreĐivano u toku ispitivanja);
- krive (uključujući sve podatke mjerenja) koje pokazuju unos i eliminaciju ispitivane supstance iz ribe i vrijeme do uspostavljanja ravnotežnog stanja;
- C_f i C_w (sa standardnom devijacijom i intervalima povjerenja, ukoliko je primjereno) za sva uzorkovanja (C_f izražen u µg/g mokre težine (ppm) cele ribe ili određenih tkiva ribe, npr. lipida, i C_w u mg/g (ppm). Cw vrijednosti za kontrolu (vrijednost fona se takoĐe mora navesti);

- BCF_{SS}, odnosno BCF_K, ukoliko je primjenljivo, 95% intervali povjerenja za konstante brzina unosa i eliminacije (sve izražene u odnosu na celu ribu, i ukupni sadržaj lipida ukoliko je izmjeren, ribe ili određenih tkiva ribe), intervala povjerenja i standardne devijacije (ukoliko se rapolaže tim podacima) i postupci izračunavanja/analize podataka za svaku koncentraciju ispitivane supstance; - ako su korišćene obilježene supstance i ukoliko je zahtijevano, može se prikazati akumulacija svih detektovanih metabolita;
- sva neobična opažanja u toku ispitivanja, sva odstepena od ovde opisanih postupaka i sve ostale relevantne informacije.

Rezultati ispod limita detekcije ne koriste se za iizračunavanje konstanti brzina.

DIO II
HEMIJSKE OSOBINE ODGOVARAJUĆE VODE ZA RAZBLAŽIVANJE

	Parametar	Granična koncentracija

1	Suspendovane materije	5 mg/l
2	Ukupni organski ugljenik	2 mg/l
3	Nejonizovani ugljenik	1□*g /l*
4	Rezidijumi hlora	10□*g /l*
5	Ukupni organofosforni pesticidi	50□*g /l*
6	Ukupni organohlorni pesticidi plus PCB	50□*g /l*
7	Ukupni organski hlor	25□*g /l*
8	Aluminijum	1□*g /l*
9	Arsen	1□*g /l*
10	Hrom	1□*g /l*
11	Kobalt	1□*g /l*
12	Bakar	1□*g /l*
13	GvožĐe	1□*g /l*
14	Olovo	1□*g /l*
15	Nikl	1□*g /l*
16	Cink	1□*g /l*
17	Kadmijum	100□*g /l*
18	Živa	100□*g /l*
19	Srebro	100□*g /l*

DIO III
PREPORUČENE VRSTE RIBA ZA ISPITIVANJA

Preporučena vrsta	Preporučeni temperaturni opseg (°C)	Preporučena ukupna dužina test (cm) jedinke
Danio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (HamiltonBuchanan), zebrica	20 do 25	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque)	20 do 25	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus), šaran	20 do 25	5,0 ± 3,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Tomminck and Schlege)	20 do 25	4,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters), gupi	20 do 25	3,0 ± 1,0

Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque)	20 do 25	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) kalifornijska pastrmka	13 do 17	8,0 ± 4,0
Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) koljuška	18-20	3,0 ± 1,0

Različite estuarske i morske vrste riba koje se koriste u drugim zemljama su:
Leiostomus xanthurus, Cyprinodon variegatus, Menidia beryllina, Cymatogaster aggregata, Parophrys vetulus, Leptocottus armatus, Gasterosteus aculeatus, Dicentracus labrax i Alburnusalburnus.

PRIKUPLJANJE

Navedene vrste riba lako se razmnožavaju i uzgajaju. U mnogim djelovima svijeta ove vrste riba se nabavljaju u toku cijele godine. Kako su navedene vrste pogodne i za uzgajanje u laboratorijaskim uslovima, zdravstveno stanje i porijeklo jedinki koje se koriste za ispitivanje je, uz kontrolu prisustva parazita i bolesti, uvjek poznato.

DIO IV
PREDVIĐANjE TRAJANJA FAZA UNOSA I ELIMINACIJE

1. PredviĐanje trajanja faze unosa

Prije izvoĐenja ispitivanja, procjena k_2 i procjena vremena potrebnog da se uspostavi ravnotežno stanje može se dobiti iz empirijskih odnosa između vrednosti k_2 i koeficijenta raspodjele u sistemu n-oktanol/voda (P_{ow}) ili k_2 i rastvorljivosti u vodi ispitivane supstance (s). Procjena k_2 (dan^{-1}) može se dobiti, npr. iz sljedeće empirijske jednačine:

$Log_{10}k_2$=-0.414x$log_{10}(P_{ow})$ +1.47x(r^2=0.95). Ostale jednačine date su u literaturi.[38]

Ako podioni koeficijent (P_{ow}) nije poznat, može se napraviti procjena [39] na osnovu poznavanja rastvorljivosti ispitivane supstance u vodi koristeći jednačinu:

$Log_{10}P_{ow}$=0.862xlog_{10}(s)+0.710x(r^2=0.994) pri čemu je s rastvorljivost (mol/l) : (n=36)

Ovi odnosi važe samo za supstance sa vrijednostima log P_{ow} između 2 i 6,5[16]. Vrijeme potrebno da se postigne određeni procenat ravnotežnog stanja može se dobiti iz opšte kinetičke jednačine koja opisuje unos i eliminaciju (kinetika prvog reda): $\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_w - k_2 C_f$ ili ako je vrijednost C_w konstantni: $C_f = \frac{k_1}{k_2} C_w (1 - e^{-k_2 t})$.

Kada se približava dostizanje ravnotežnog stanja t→∞, treća jednačina se može svesti[17] na:

$\frac{k_1}{k_2} C_w = C_f = k_1 BCF$. Onda će se iz izraza $k_1/k_2 x C_w$ može odrediti koncentracija C_f

k_2 C_w k_2 ispitivane supstance u ribi pri ravnotežnom stanju ($C_{f,c}$). Treća jednačina se može pretvoriti u:

$C_f = C_{f,s}(1 - e^{-k_2 t})$ ili $\frac{C_f}{C_{fs}} = (1 - e^{-k_2 t})$.

Primjenom posljednje jednačine vrijeme da se dostigne određeni procenat ravnotežnog stanja može se predvidjeti kad se k_2 prethodno odredi koristeći jednačine 1 ili 2. Kao smjernica, statistički optimalno trajanje faze unosa za dobijanje statistički prihvatljivih podataka (BCFK) je period potreban da kriva koja predstavlja log-transformisane podatke za koncentraciju ispitivane supstance u funkciji vremena dostigne srednju tačku, ili $1,6/k_2$, ili 80% ravnotežnog stanja, ali ne više od $3,0/k_2$ ili 95% ravnotežnog stanja[18].

Vreme potrebno da se dostigne 80% ravnotežnog stanja je: $0.80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}}$ ili $t_{80} = \frac{1.6}{k_2}$. Slično tome, vrijeme potrebno za dostizanja 95% ravnotežnog stanja je: $t_{95} = \frac{3.0}{k_2}$. Na primjer, trajanje faze unosa k_2 (up) za ispitivanu supstancu sa log (P_{ow})=4 bilo bi:

$Log_{10}k_2$=-0.414(4)+1.47
K_2=0.652 dana $^{-1}$

[38] Kristensen P. (1991) BioCOncentration in fish: COmparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute

[39] Chiou C.T. and Schmedding D.W. (1982) Partitioning of organic COmpounds in octanol - water systems. Environ. Sci. Technol. 16 (1), pp 4-10

up(80%)=1.6/0.652 odnosno 2.45 dana (59 sati) ili up(95%)=3.0/0.652 odnosno 4.6 dana (110 sati).

Za ispitivanu supstancu sa $c=10^{-5}$ mol/L (log(c)=-5.0), trajanje faze unosa bilo bi:
$\log_{10}(P_{ow})=-0.862(-5.0)+0.710=5.02$ $\log_{10}k_2=-0.414(5.02)+1.47$
$K_2=0.246$ dana^{-1}

16 Hawker D.W. and COnnell D.W. (1988) Influence of partition COefficient of lipophilic COmpounds on bioCOncentration kinetics with fish. Wat. Res. 22 (6), pp 701-707.
17
Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975) Transactions of the American Fisheries Society, 104
(4), pp 785-792 I Ernst W. (1985) Accumulation in Aquatic organisms. In: Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4 pp 243-255.
SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.
18 Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977) Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, Can. J. Chem. Eng. 55, pp 614-622.

up(80%)=1.6/0.246 odnosno 6.5 dana (156 sati) up(95%)=3.0/0.246 odnosno 12.2 dana (293 sata).

Alternativno tome, izraz: $t_{eq}=6.54x10^{-3}$ $P_{ow}+55.31$ (sati) može se koristiti da se izračuna vrijeme potrebno za dostizanje efektivnog ravnotežnog stanja.[40]

2. PredviĐanje trajanja faze eliminacije

PredviĐanje vremena potrebnog da se smanji koncentracija ispitivane supstance u organizmu koji se koristi u ovoj metodi do određenog procenta početne koncentracije može se dobiti i iz opšte jednačine koja opisuje unos i eliminaciju (kinetika prvog reda)[41]. Za fazu eliminacije, pretpostavlja se da je vrijednost C_w nula. Jednačina se može redukovati na:

$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f$ ili $C_f = C_{f,0} e^{-k_2 t}$ gdje je Cf,0 koncentracija na početku perioda eliminacije.

Eliminacija od 50% postuže se u vremenu t_{50}:

[40] Hawker D.W. and COnnell D.W. (1988) Influence of partition COefficient of lipophilic COmpounds on bioCOncentration kinetics with fish. Wat. Res. 22 (6), pp 701-707.
[41] Spacie A. and Hamelink J.L. (1982) Alternative models for describing the bioCOncentration of organics in fish. Environ. ToxiCOl. and Chem. 1, pp 309-320 I Könemann H. and Van Leeuwen K. (1980)

ToxiCOkinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. Chemosphere, 9, pp 3-19. 21 Spacie A. and Hamelink J.L. (1982) Alternative models for describing the bioCOncentration of organics in fish. Environ. ToxiCOl. and Chem. 1, pp 309-320 22
Uzorak vode nakon minumum tri zamjene kompletne zapremine akvarijuma. Vrijednosti u zagradama su broj uzoraka (vode, riba) koji će se uzeti ukoliko je potrebno dodatno uzorkovanje.

$C_f = 1 - e^{-k_2 t_{50}}$ ili $t_{50} = 0.693$. Sli;no tome, 95 % eliminacija postiže se pri:

$C_f, 0 \quad 2 \qquad k2$

$T_{95} = \frac{3.0}{k_2}$. Ako se koristi 80% unosa za prvi period ($1,6/k_2$) i 95% gubitka u fazi eliminacije ($3,0/k_2$), onda faza eliminacije traje približno dva puta duže od faze unosa. Ove procjene se zasnivaju na pretpostavci da se procesi unosa i eliminacije mogu opisati kao kinetika prvog reda. Ukoliko se ne ponašaju po modelu kinetike prvog reda, moraju se koristiti složeniji modeli[21].

PRIMJER UZORKOVANJA ZA ISPITIVANJE BIOKONCENTRACIJE ZA SUPSTANCE SA LOP POW=4 DIO V

Uzorkovanje riba	Raspored uzimanja uzorka		Broj uzoraka vode	Broj jedinki riba po uzorku
	Najmanja potrebna učestalost (u danima)	Dadatno uzimanje uzorka		
Faza unosa	-10		222 2	Dodati 45-80 riba
1.	0.3	0.4	2 (2)	4 (4)
2.	0.6	0.9	2 (2)	4 (4)
3.	1.2	1.7	2 (2)	4 (4)
4.	2.4	3.3	2 (2)	4 (4)
5.	4.7		2	6
Faza eliminacije				Prenos jedinki u akvarijum sa čistim medijumumom
6.	5.0	5.3		4 (4)
7.	5.9	7.0		4 (4)
8.	9.3	11.2		4 (4)
9.	14.0	17.5		6 (4)

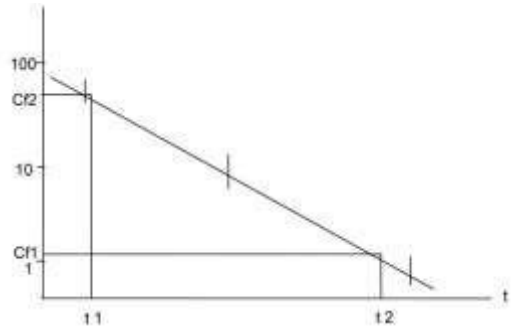
Napomena: Prethodna procena k_2 za log P_{ow} od 4,0 je 0,652 $dana^{-1}$. Ukupno trajanje ispitivanja postavljeno je na 3x up=3x4,6 dana, odnosno 14 dana. Procjena „up|| data je u Dijeo IV ove metode.

IZBOR MODELA
DIO VI

Većina podataka dobijenih iz ispitivanja biokoncentracije može se dobro opisati pomoću jednostavnog dvoparametarskog modela, što se vidi iz linearizovane krive za vrijednosti koncentracija ispitivane supstance u ribi u toku faze eliminacije, kad se grafički prikaže na semilogaritamskom papiru. (kada se ova kriva ne može linearizovati, moraju se upotrijebiti složeniji modeli 1). Grafički postupak za određivanje konstante brzine eliminacije (gubitka) k_2.

Koncentracija ispitivane supstance izmjerena u svakom uzorku ribe grafički se prikazuje u funkciji vremena uzimanja uzorka na semi-logaritamskom papiru. Nagib te prave je k_2.

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Napomena: Odstepena od prave linije mogu ukazivati na to da se proces eliminacije ponaša po modelu koji je složeniji od kinetike prvog reda.

Grafički postupak može se primjeniti za određivanje konstante brzine eliminacije kada dati proces odstupa od modela kinetike prvog reda.

Grafički postupak za određivanje konstante brzine unosa k_1

Kad je poznata vrijednost k_2, k_1 se iizračunava na sljedeći način:

$$k_1 = C_w \frac{C_f k_2}{1 - e^{-k_2 t}}$$

Vrednost C_f očitava se iz srednje tačke platoa krive unosa koja se dobija kad se log-transformisani podaci za koncentraciju grafički prikažu u funkciji vremena.

Kompjuterski postupak za iizračunavanje konstanti brzina unosa i eliminacije (gubitka)

Najbolji način određivanja faktora biokoncentracije i konstante brzina k_1 i k_2 je da se koriste računar i metoda procjene nelinearnih parametara. Ovakvi kompjuterski programi iizračunavaju vrijednosti za k_1 i k_2 na osnovu niza podataka o koncentracijama ispitivane supstance i sljedećeg modela:

$$C_f = C_{k2} \cdot w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 \le t \le t_c$$

$$C_f = C_{k2} \cdot w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2 (t - t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c$$

gdje je tc vrijeme na kraju faze unosa.

Ovakav pristup omogućava određivanje standardne devijacije za k_1 i k_2. U većini slučajeva k_2 se može procjeniti iz krive eliminacije sa relativno visokom preciznošću, pa s obzirom na to da postoji jaka korelacija između parametara k_1 i k_2, ako se procjenjuju istovremeno, savjetuje se da se prvo izračuna k2 samo iz podataka iz faze eliminacije, a nakon toga da se izračuna k_1 iz podataka iz faze unosa pomoću nelinearne regresione analize.

C.14. ISPITIVANJE RASTA RIBLJE MLAĐI

DIO I

1. Metoda ispitivanja

Metoda ispitivanja rasta riblje mlaĐi se zasniva na OECD TG 215 (2000) uputstvu ispitivanja.

1.1. Uvod

Metoda ispitivanja osmišljena je za procjenu efekta na rast nakon produženog izlaganja riblje mlaĐi hemikalijama. Bazira se na metodi, koja je razvijena i ispitana meĐulaboratorijaskim ispitivanjem[42], za procjenu efekta hemikalija na rast riblje mlaĐi kalifornijske pastrmke u protočnim uslovima. Koriste se i druge dobro opisane vrste. Postoje iskustva sa ispitivanjem rasta vrste Daniorerio (zebrica) i Oryziaslatipes.

1.2. Definicije

Najniža koncentracija koja dovodi do značajnih efekata (u daljem tekstu: LOEC) je najniža koncentracija ispitivane supstance pri kojoj je uočen značajan efekat (pri $p < 0,05$) u poreĐenju sa kontrolom. Sve ispitivane koncentracije iznad LOEC imaju štetne efekte jednake ili veće od onih opaženih pri LOEC.

Koncentracija koja ne dovodi do značajnog efekta (u daljem tekstu: NOEC) je koncentracija neposredno ispod LOEC.

EC_x u ovoj metodi ispitivanja je koncentracija ispitivane supstance koja dovodi do x% promjene u brzini rasta ribe u poreĐenju sa kontrolama.

Nasad je svježa masa riba po zapremini vode.

Gustina nasada je broj jedinki riba po zapremini vode.

[42] Testing Method B.44. Skin Absorption: In vivo Method

Specifična brzina rasta pojedine ribe je brzina rasta jedinke u odnosu na njenu početnu težinu. Prosječna specifična brzina rasta po komori za ispitivanje je srednja brzina rasta populacije riba u akvarijumu u jednom tretmanu (koncentraciji).

Pseudospecifična brzina rasta je pojedinačna brzina rasta u poređenju sa srednjom vrijednošću početne težine populacije riba u akvarijumu.

1.3. Princip metode

Riblja mlađ u ekponencijalnoj fazi rasta se nakon mjerenja stavlja u komore za ispitivanje i izlaže opsegu subletalnih koncentracija ispitivane supstance rastvorene u vodi po mogućnosti u

protočnim uslovima, ili ukoliko to nije moguće, u odgovarajućim polustatičnom sistemu (uz potpuno periodično obnavljanje ispitivanog medijumuma). Ispitivanje traje 28 dana. Riba se svakodnevno hrani. Količina hrane određuje se na osnovu početne težine ribe i proračunava se nakon 14 dana. Riba se ponovno mjeri na kraju ispitivanja. Efekti na stopu rasta analiziraju se pomoću regresionog modela da bi se procjenila koncentracija koja je dovela do x % promjene u stopi rasta, tj. EC_x (npr. EC_{10}, EC_{20}, ili EC_{30}). Alternativno, podaci se upoređuju sa kontrolisanim vrijednostima da bi se odredila najniža koncentracija koja dovodi do značajnog efekta, a zatim i koncentracija koja ne dovodi do značajnog efekta.

1.4. Podaci o ispitivanoj supstanci

Koriste se podaci o akutnoj toksičnosti (vidi metodu ispitivanja C.1) iz ispitivanja urađenom, po mogućnosti, na istoj vrsti riba. Poznata je rastvorljivost u vodi i napon pare ispitivane supstance i postoji pouzdani analitički postupak za kvantifikaciju supstance u rastvoru sa poznatom i dokumentovanom preciznošću i granicom detekcije.

Korisni podaci su i strukturne formule, čistoća supstance, stabilnost u vodi i na svijezemljištu, pK_a, P_{ow} i rezultati ispitivanja brze biorazgradljivosti (vidi metodu ispitivanja C.4).

1.5. Prihvatljivost ispitivanja

Da bi ispitivanje bilo prihvatljivo, zadovoljavaju se sljedeći uslovi:

- smrtnost u kontrolama ne prelazi 10% na kraju ispitivanja
- porast srednje težine riba iz kontrolne grupe je dovoljan da omogući detekciju minimalne varijacije stope rasta koja se smatra značajnom. Rezultati međulaboratorijaskog ispitivanja[43] sa kalifornijskom pastrmkom pokazali su da se u toku 28 dana srednja vrijednost težine ribe u kontrolama povećava najmanje za polovinu (odnosno 50%) srednje vrijednosti njihove početne težine; npr. 1 g/riba (= 100%), konačna težina nakon 28 dana: > 1,5 g/riba (> 150%);
- koncentracija rastvorenog kiseonika je najmanje 60% vrijednosti zasićenja vazduha (air saturation value, u daljem tekstu: ASV) u toku čitavog ispitivanja;
- temperatura vode u ispitivanim akvarijumima se ne razlikuje za više od ± 1 °C u bilo kom trenutku u toku ispitivanja i održava se unutar opsega ± 2 °C u okviru preporučenog opsega temperature za ispitivanu vrstu (Dio II ove metode.)

[43] OECD, (2002) Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris

1.6. Opis metode

1.6.1. Oprema

U ovoj metodi ispitivanja koristi se uobičajena laboratorijaska oprema, a naročito:

- oksimetar i pH-metar;
- oprema za određivanje tvrdoće vode i alkaliteta;
- odgovarajuća oprema za kontrolu temperature i po mogućnosti kontinuirani nadzor;
- komore za ispitivanje od hemijski inertnog materijala i pogodnog kapaciteta shodno preporučenom nasadu i gustini nasada (tačka 1.8.5. i Dio II ove metode);
- precizna vaga (tačnost ± 0,5%).

1.6.2. Voda

U ispitivanju se koristi svaka voda u kojoj ispitivana vrsta pokazuje zadovoljavajuće preživljavanje i rast u dužem vremenskom periodu. Voda je stalnog kvaliteta u toku čitavog trajanja ispitivanja. Vrijednost pH vode je unutar opsega od 6,5 do 8,5 i u toku svakog konkretnog ispitivanja je unutar opsega od 0,5 pH jedinica. Tvrdoća je iznad 140 mg/l $CaCO_3$. Da bi se predupredio prekodnosan uticaj vode za razblaživanje na rezultate ispitivanja (npr. kompleksiranjem ispitivane supstance), uzeti uzorke za analizu u određenim intervalima. Sadržaj teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), glavnih anjona i katjona (npr. Ca, Mg, Na, K, Cl i SO_4), pesticida (ukupni organofosforni i organohlorni pesticidi) ukupnog organskog ugljenika i suspendovanih materija odrediti svaka tri mjeseca ako se zna da je voda za razblaživanje relativno stalnog kvaliteta. Ako je voda pokazala konstantan kvalitet u toku prethodnih godinu dana, analize se rade i rijeĐe, a intervali su duži (svakih 6 mjeseci). Neke prihvatljive hemijske osobine vode za razblaživanje navedene su u Dijelu II ove metode.

1.6.3. Rastvori ispitivanih supstanci

Rastvori odabranih koncentracija test supstance pripremaju se razblaživanjem osnovnog rastvora. Osnovni rastvor se priprema jednostavnim miješanjem ili mućkanjem ispitivane supstance u vodi mehaničkim putem (npr. miješanjem ili ultrazvučno). Za pripremu odgovarajućeg koncentrovanog osnovnog rastvora koriste se kolone zasićenja (kolone rastvorljivosti).

U nekim slučajevima je potrebno korišćenje rassupstancaača ili disperzionog sredstva (sredstva za povećanje rastvorljivosti) da bi se pripremio osnovni rastvor odgovarajuće koncentracije. U pogodne rassupstancaače ubrajaju se aceton, etanol, metanol, dimetilsulfoksid, dimetilformamid i trietilenglikol. Pogodna sredstva za disperziju su Cremophor RH40, Tween 80, metilceluloza 0,01% i HCO-40. Potreban je oprez pri korišćenju lako biorazgradljivih sredstava (npr. acetona), odnosno visoko isparljivih jedinjenja, jer ssupstancaaju probleme sa povećanjem broja bakterija u protočnim uslovima. Ako se koristi sredstvo za povećanje rastvorljivosti, ono nema značajne efekte na rast riba ni vidljive štetne efekte na riblju mlaĐ, što se utvrđuje kontrolisanim tretmanom u kome se ribe izlažu samo dejstvu rassupstancaača.

Kod ispitivanja u protočnim uslovima koristi se sistem koji kontinuirano otpušta i razreĐuje osnovni rastvor ispitivane supstance (npr. mjerna pumpa, sistem za proporcionalno razblaživanje, sistem za regulaciju zasićenja) da bi se u ispitivane akvarijume dostavila serija različitih koncentracija. Tokom ispitivanja, protok osnovnih rastvora i vode za razblaživanje provjerava se u određenim intervalima, po mogućnosti svakog dana, i ne

varira više od 10% u toku čitavog ispitivanja. Rezultati međulaboratorijskog ispitivanja[44] pokazali su da je 6l po gramu ribe na dan prihvatljiva učestalost uklanjanja vode za kalifornijsku pastrmku u toku ispitivanja (tačka 1.8.2.2).

Kod ispitivanja u polustatičnom sistemu (sa kompletnim periodičnim obnavljanjem medijumuma), učestalost obnavljanja medijumuma zavisi od stabilnosti ispitivane supstance, ali se dnevno obnavlja. Ako preliminarna ispitivanja stabilnosti (tačka 1.4) pokažu da koncentracija ispitivane supstance nije stalna (odnosno nalazi se izvan opsega 80% do 120% nominalne koncentracije ili pada ispod 80% izmjerene početne koncentracije) u toku perioda obnove, ispitivanje uraditi u protočnom sistemu.

1.6.4. Izbor vrste za ispitivanje

Za ispitivanje se koristi kalifornijska pastrmka, jer je na ovoj vrsti[45] dobijeno najviše podataka u međulaboratorijaskim ispitivanjima. Koriste se i druge dobro opisane vrste, ali se u tom slučaju postupak ispitivanja se prilagođava da bi se stvorili pogodni uslovi ispitivanja. Postoje iskustva sa ispitivanjem rasta vrste Daniorerio (zebrica) i Oryziaslatipes. Kada se u ispitivanju koriste druge vrste, navodi se razlog za njihov izbor, kao i za izbor metode ispitivanja.

1.6.5. Uzgoj ribe

Jedinke se biraju iz populacije riba iz istog uzgoja, iz istog mrijesta i uzgajaju najmanje dvije nedelje prije ispitivanja u uslovima sličnim onima koji se koriste u ispitivanju, prvenstveno u pogledu kvaliteta vode i osvjetljenja. Riba se hrani minimalnim obrocima koji iznose 2% tjelesne težine dnevno, a ako je moguće 4% tjelesne težine dnevno u toku cijelog perioda uzgoja i ispitivanja.

Nakon 48 sati privikavanja, zapisuje se kolika je smrtnost i primjenjuju se kriterijumi:
- ako je smrtnost iznad 10% populacije u roku od 7 dana, čitava serija se odbacuje;
- ako je smrtnost između 5% i 10% populacije, riba se aklimatizuje dodatnih 7 dana;
- ako je smrtnost veća od 5% u toku sljedećih 7 dana, čitava serija se odbacuje;

- ako je smrtnost manja od 5% populacije u 7 dana, prihvata se čitava serija.

Dvije nedelje prije, kao ni u toku ispitivanja, riba se ne liječi od bolesti.

1.7. Postavka ispitivanja

"Postavka ispitivanja" odnosi se na izbor broja i razmaka u seriji ispitivanih koncentracija, broj akvarijuma sa svakom pojedinom koncentracijom i broj riba po akvarijumu. U idealnom slučaju, ispitivana postavka se bira na osnovu:
- cilja ispitivanja;
- statističke analize koja će se koristiti;
- rapoloživosti i cijene ispitivanih resursa.

U opisu cilja ispitivanja precizirati statističku snagu pri kojoj se određuju minimalno statistički značajna razlika izabranog parametra (npr. brzina rasta) ili zahtijevanu preciznost pri

[44] OECD, (2002) Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris
[45] Testing Method B.44. Skin Absorption: In vivo Method I OECD, (2002) Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

procjeni EC_x (npr. sa x = 10, 20 ili 30, po mogućnosti ne manji od 10). Bez toga se ne može tačno preporučiti obim ispitivanja.

Postupak ispitivanja koji je optimalan (jer najbolje iskorišćava resurse) pri primjeni jedne metode statističke analize, nije optimalan za drugu vrstu statističke analize. Postupak ispitivanja za procjenu LOEC/NOEC nije isti kao postupak koji se koristi za regresionu analizu.

U većini slučajeva, regresiona analiza ima prednost nad analizom varijanse. Kad se ne može pronaći odgovarajući regresijski model (p[46]$< 0,9$) koristi se NOEC/LOEC.

1.7.1. Postavka ispitivanja za regresionu analizu

Pri postavci ispitivanja čiji će rezultati biti analizirani regresionim modelima uzeti u obzir sljedeće važne aspekte:

- efektivna koncentracija (npr. $EC_{10,20,30}$) i opseg koncentracija u kom se javlja efekat ispitivane supstance koji nas zanima se nalazi unutar opsega koncentracija koje se primjenjuju u ispitivanju. Najveća preciznost kojom se procjenjuje efektivna koncentracija postiže se kad se efektivna koncentracija nalazi u sredini opsega koncentracija koje se koriste u ispitivanju. Preliminarno ispitivanje u cilju određivanja opsega koncentracija pomaže u izboru odgovarajuće serije ispitivanih koncentracija;
- postavlja se najmanje jedna kontrolna i pet dodatnih komora za ispitivanje sa različitim koncentracijama da bi se omogućilo zadovoljavajuće statističko modelovanje. U slučajevima kad se koristi sredstvo za povećanje rastvorljivosti, uz seriju akvarijuma sa ispitivanom supstancom postaviti jednu kontrolu koja sadrži sredstvo za povećanje rastvorljivosti u najvišoj test koncentraciji
- koriste se odgovarajući geometrijske ili logaritamske serije (Dio IV ove metode). Prednost se daje logaritamskoj raspodjeli koncentracija ispitivane supstance;
- ako je na rapolaganju više od šest komora za ispitivanje, dodatne se koriste za ponavljanje, ili se raspodjeljuju unutar opsega koncentracija ispitivane supstance, kako bi razlika između pojedinih koncentracija bila manja. Obije mjere su podjednako dobre.

1.7.2. Postavka ispitivanja za procjenu NOEC/LOEC pomoću analize varijanse (ANOVA)

Za svaku ispitivanu koncentraciju postaviti po dvije komore za ispitivanje sa istom koncentracijom ispitivane supstance, a statistička analiza se radi na nivou komore. Ako se ne koriste ponavljanja (replike), ne postoji nikakva varijabilnost između komora za ispitivanje osim varijabilnosti na nivou jedinki. Iskustvo je pokazalo da je u konkretnom slučaju varijabilnost između komora bila vrlo mala u poređenju sa varijabilnošću unutar komora (tj. između jedinki u jednoj komori), pa je statistička analiza koja se radi na nivou jedinke u testu relativno prihvatljiva alternativa.

Koristi se najmanje pet test koncentracija u geometrijskoj seriji sa faktorom koji nije veći od 3,2.

Kada se izvodi ispitivanje u duplikatu, broj replika kontrolne grupe, samim tim i broj riba, je dvostruko veći od broja koji se koristi za svaku ispitivanu koncentraciju, a koje su iste veličine. Kad nema replika, broj jedinki u kontrolnoj grupi je isti kao i broj jedinki za svaku ispitivanu koncentraciju.

[46] . OECD, (2002) Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris

Ako se analiza varijanse (Analysis of Variance, u daljem tekstu: ANOVA) radi na nivou komore, a ne na bazi jedinke, što povlači označavanje pojedinih riba ili upotrebu pseudo specifičnih brzina rasta (tačka 2.1.2. ove metode), postaviti dovoljan broj duplikata komora da bi se omogućilo određivanje standardne devijacije između komora unutar ispitivane koncentracije. To znači da stepeni slobode za grešku u analizi varijanse iznose najmanje 5. Ako se postave samo duplikati kontrola, postoji opasnost od pomaka varijabilnosti greške, jer se ona povećava kako se povećava srednja vrijednost brzine rasta. S obzirom na to da će se brzina rasta smanjivati sa povećanjem koncentracije, varijabilnost se može precijeniti.

1.8. Postupak

1.8.1. Izbor i mjerenje ispitivanih jedinki riba

Svesti na minimum varijacije u težini ribe na početku ispitivanja. Odgovarajući opseg veličine za različite vrste riba za upotrebu u ovoj metodi ispitivanja navedeni su u Dijelu II ove metode. Za čitavu seriju jedinki riba upotrijebljenih u ispitivanju, težina jedinki na početku ispitivanja u idealnom slučaju je unutar opsega od ± 10% aritmetičke sredine težine i ni u kom slučaju ne prelazi 25%. Koristi se mjerenje poduzorka jedinki riba prije ispitivanja da bi se procjenila srednja težina.

Populacija ribe iz istog uzgoja namijenjena za ispitivanje ne hrani se 24 sata prije ispitivanja. Jedinke se zatim biraju slučajnim izborom. Primjenom opšte anestezije (npr. vodeni rastvor 100 mg/l trikain-metan sulfonata (MS 222) neutralisanog dodatkom dva dijela natrijum-bikarbonata na jedan dio MS 222), svaka jedinka se izmjeri i odredi joj se svježa masa (riba se prethodno obriše da se ukloni suvišna voda) sa tačnošću koja je navedena u Dijelu II ove metode. Ribe čija se tjelesna težina nalazi unutar odabranog opsega zadrže se i zatim nasumično raspoređuju u komore za ispitivanje. Zapisuje se ukupna svježa masa riba u svakoj komori. Upotreba anestetika kao i manipulacija ribom (uključujući brisanje i mjerenje) prouzrokuje stres i ozlede riblje mlađi, posebno kod vrsta riba koje su male veličine. Ribljom mlađi se rukuje pažljivo da bi se izbjegao stres i povreda životinja uključenih u ispitivanje. Riba se ponovno mjeri 28. dana ispitivanja (tačka
1.8.6. ove metode). Ako se smatra da je neophodno preračunati količinu hrane, riba ponovo mjeriti i 14. dana ispitivanja (tačka 1.8.2.3. ove metode). Za određivanje promjene u veličini ribe prema kojoj će se prilagoditi obroci hrane koriste se i drugi postupci, kao što je fotografska metoda. 1.8.2. Uslovi izlaganja

1.8.2.1. Dužina

Dužina ispitivanja traje ≥ 28 dana.

1.8.2.2. Nasad i gustina nasada

Važno je da nasad i gustina nasada odgovaraju vrsti riba koja se koristi u ispitivanju (Dio II ove metode). Ako je gustina nasada previsoka, nastupiće stres zbog prenaseljenosti, koji prouzrokuju smanjene brzine rasta i stvoriti mogućnost za razvoj bolesti. Ako je gustina nasada preniska, izaziva teritorijalno ponašanje u riba, koje utiče na rast. Nasad je dovoljno nizak da se koncentracija rastvorenog kiseonika održava bez aeracije na nivou od najmanje 60% ASV. MeĐulaboratorijasko ispitivanje pokazalo je da prihvatljiva gustina nasada za kalifornijsku pastrmku iznosi 16 jedinki od 3 g do 5 g na zapreminu od 40 litara. Preporučena učestalost uklanjanja vode u toku ispitivanja je 6 l po gramu ribe na dan.

1.8.2.3. Ishrana

Riba se hrani odgovarajućom vrstom hrane (Dio II ove metode) i zadovoljavajućom količinom hrane koja omogućava prihvatljivu brzinu rasta. Ne smije doći do rasta mikroorganizama i zamućivanja vode. Za kalifornijsku pastrmku, brzina od 4% njihove tjelesne težine po danu vjerovatno će zadovoljiti ove uslove. Dnevni obrok se podijeli u dva jednaka djela i da se ribama u dva obroka dnevno, u razmaku od najmanje 5 sati. Obrok se bazira na početnoj ukupnoj težini ribe u pojedinačnom akvarijumu. Ako se riba ponovno mjeri 14. dana, obrok se preračunava. Hranu ribama uskratiti 24 sata prije mjerenja. Nepojedena hrana i fekalni sadržaj se svakodnevno uklanjaju iz akvarijuma pažljivim čišćenjem dna svakog akvarijuma i to pomoću usisavanja.

1.8.2.4. Svijetlost i temperatura

Svijetlosni režim i temperatura vode odgovaraju vrsti ribe koja se koristi u ispitivanju (Dio II ove metode).

1.8.3. Koncentracije ispitivane supstance

Potrebno je pet različitih koncentracija ispitivane supstance bez obzira na ispitivanu postavku (tačka 1.7.2. ove metode). Prethodno poznavanje toksičnosti ispitivane supstance (npr. iz ispitivanja akutne toksičnosti, odnosno iz preliminarnog ispitivanja za određivanje opsega koncentracija) pomaže u izboru odgovarajućih uslova ispitivanja. Ako se ispitivanje obavlja u manje od pet koncentracija, navodi se objašnjenje. Najviša koncentracija test supstance nije veća od granice rastvorljivosti supstance u vodi.

Kad se koristi sredstvo za povećanje rastvorljivosti kao pomoć u pripremi osnovnog rastvora, konačna koncentracija tog sredstva nije veća od 0,1 ml/l i ako je moguće ista je u svim komorama za ispitivanje (tačka 1.6.3. ove metode). Izbjegavati upotrebu takvih sredstava kad god je moguće.

1.8.4. Kontrole

Broj kontrola sa vodom za razblaživanje zavisi od ispitivane postavke (tačka 1.7. do 1.7.2. ove metode). Ako se koristi sredstvo za povećanje rastvorljivosti, postaviti se onoliko kontrola sa sredstvom za povećanje rastvorljivosti koliko ima kontrola sa vodom za razblaživanje.

1.8.5. Učestalost analitičkih određivanja i mjerenja

Tokom ispitivanja, koncentracije ispitivane supstance određuju se u regularnim intervalima. U protočnom sistemu, protok razblaživača i toksični osnovni rastvori se kontrolišu u određenim intervalima, ako je moguće svakog dana. Ne variraju više od 10% u toku čitavog ispitivanja. Gdje se očekivane koncentracije ispitivane supstance nalaze unutar ± 20% nominalnih vrijednosti (tj. unutar opsega 80% do 120%, tačka 1.6.2. i 1.6.3. ove metode), analiziraju se najmanje najviša i najniža koncentracija na početku ispitivanja i nakon toga u nedeljnim intervalima. U slučajevima kada se ne očekuje da će koncentracija ostati unutar ± 20% nominalne (na osnovu podataka o stabilnosti test supstance), analizirati sve ispitivane koncentracije, ali prema istom rasporedu.

U polustatičnom sistemu (sa potpunim periodičnim obnavljanjem medijumuma) u kojima se očekuje da će koncentracija ispitivane supstance ostati unutar ± 20% nominalne vrijednosti,

preporučuje se da se analiziraju barem najviša i najniža koncentracija neposredno nakon pripreme i neposredno prije obnavljanja na početku ispitivanja, a nakon toga jednom nedeljno. U slučajevima kada se ne očekuje da će koncentracija ispitivane supstance biti unutar ± 20% nominalne, sve koncentracije se analiziraju po istom postupku i rasporedu kakvi se koriste za stabilnije materije.

Rezultati se baziraju na izmjerenim koncentracijama. Ako je dokazano da se koncentracija ispitivane supstance u rastvoru održavala unutar ± 20% nominalne ili izmjerene početne koncentracije u toku čitavog trajanja ispitivanja, rezultati se baziraju na nominalnim ili izmjerenim vrijednostima.

Uzorke je ponekada potrebno filtrirati (npr. korišćenjem veličine pora od 0,45 μm) ili centrifugirati. Preporučuje se centrifugiranje. Ako se ispitivani materijal ne adsorbuje na filtere, filtracija je prihvatljiv postupak.

Rastvoreni kiseonik, pH i temperatura se mjere u svim komorama u toku ispitivanja. Ukupna tvrdoća, alkalitet i salinitet (ukoliko je relevantan) mjere se u kontrolama i jednoj komori za ispitivanje sa najvišom koncentracijom. Rastvoreni kiseonik i salinitet (ukoliko je relevantan) mjere se najmanje tri puta (na početku, sredini i kraju ispitivanja). Kod ispitivanja u polustatičkim uslovima, češće se mjeri rastvoreni kiseonik, po mogućnosti prije i nakon svakog obnavljanja vode ili najmanje jednom nedeljno. Vrijednost pH se mjeri na početku i kraju svakog obnavljanja vode u ispitivanoj postavci sa statičkim obnavljanjem i najmanje jednom nedeljno u protočnim uslovima. Tvrdoća i alkalitet se mjere jednom u toku svakog ispitivanja. Temperatura se, ako je moguće, neprekidno prati u najmanje jednoj komori.

1.8.6. Opažanja

Prati se težina riba. Na kraju ispitivanja, sva preživjela riba se izmjeri i odredi se svježa masa (nakon brisanja suvišne vode) izraženo za cijelu grupu riba po komori ili za jedinku. Mjerenje riba po grupama iz pojedinačnih komora ima prednost nad mjerenjem pojedinačnih jedinki, jer ovaj drugi način zahtijeva da riba bude pojedinačno označena. U slučaju mjerenja težine pojedine ribe da bi se odredila specifična stopa rasta ribe, odabrana tehnika označavanja ne izaziva stres kod ispitivanih jedinki (pogodna alternativa hladnom žigosanju je korišćenje tankog pecaroškog kanapa u boji).

Riba se u toku trajanja ispitivanja svakodnevno pregleda, a sve poljašnje abnormalnosti (kao što su krvarenje, promjena boje) i abnormalno ponašanje se zabilježe. Bilježi se i smrtnost, a mrtvu ribu što prije treba ukloniti iz komora. Mrtva riba se ne zamjenjuje živom, jer su nasad i gustina nasada dovoljne da promjena u broju jedinki u komori neće imati nikakve efekte na rast. Količinu hrane prilagoditi.

2. Podaci i izvještaj

2.1. Obrada rezultata

Uključiti statističara u proces izbora ispitivane postavke i analizu podataka, s obzirom da su ovom metodom ispitivanja dopuštene značajne varijacije u izvoĐenju, npr. u broju komora, ispitivanih koncentracija, riba, itd. S obzirom na opcije koje stoje na rapolaganju u smislu ispitivane postavke, ovdje se ne daju smjernice u pogledu statističkih postupaka.

Brzine rasta se ne iizračunavaju za komore u kojima je smrtnost veća od 10%. Stopa smrtnosti navodi se za sve ispitivane koncentracije.

Bilo koji postupak da se koristi za analizu podataka, uvjek se određuje posebna brzina rasta r između vremena t_1 i vremena t_2. Definisati na nekoliko načina, u zavisnosti od toga da li je riba bila pojedinačno označena ili se traži prosjek po komori.

r1= _____loge *w*2 loge *w*1 □100 *t*2 *t*1

r2= _____loge *w*2 loge *w*1 □100 *t*2 *t*1

r_{3i}= _____$\log^e w^2 \log^e w^1$ □100 gdje je: r_1 specifična brzina rasta pojedine ribe; r_2 prosječna brzina rasta *t*2 *t*1 specifična za komoru; r_3 "pseudo" specifična brzina rasta; w_1 i w_2 težine određene ribe u vremenu t_1 odnosno vremenu t_2; $\log_e w_1$ logaritam težine pojedine ribe na početku ispitivanja; $\log_e w_2$ logaritam težine pojedine ribe na kraju ispitivanja; $\log_e w_1$ prosjek logaritaskih vrijednosti w_1 za ribu u komori na početku ispitivanja; $\log_e w_2$ prosjek logaritamskih vrijednosti w_2 za ribu u komori na kraju ispitivanja; t_1 i t_2 vrijeme (dani) na početku i kraju ispitivanog perioda.

r_1, r_2 i r_3 se iizračunavaju za period od 0 do 28 dana i, ukoliko je primjereno (tj. kad se radilo mjerenje 14. dana) za periode od 0 do 14 i od 14 do 28 dana.

2.1.1. Regresiona analiza rezultata (modelovanje odgovora na koncentraciju)

Ovom metodom analize utvrđuje se pogodan matematički odnos između specifične brzine rasta i koncentracije, što omogućava procjenu EC_x, tj. svake tražene EC vrijednosti. Pomoću ovog postupka, ne iizračunavati r za svaku pojedinu ribu (r_1), već se analiza bazira na prosjeku komora za ispitivanje r (r_2). Prednost se daje drugom postupku, koji više odgovara i u slučaju upotrebe najmanjih vrsta.

Prosjek specifične brzine rasta za komoru (r_2) grafički se prikazuje u odnosu na koncentraciju, da bi se utvrdila dozna zavisnost.

Da bi se izrazio odnos između r_2 i koncentracije, bira se odgovarajući model, a izbor određenog modela se argumentuje na odgovarajući način.

Ako se broj preživjelih jedinki riba razlikuje od jedne do druge komore, model se adaptira, tako da se pondiranjem prevaziĐe problem nejednake veličine grupa.

Postupak adaptacije na model omogućava procjenu, npr. EC_{20} i njenog rasipanja (standardne greške ili intervala povjerenja). Grafik adaptacije na model prikazuje se u odnosu na podatke, tako da se vidi da je adaptacija na model bila primjerena.

2.1.2. Analiza rezultata za procjenu LOEC

Ako su u ispitivanju korišćeni duplikati komora za svaku ispitivanu koncentraciju, procjena LOEC se bazira na ANOVA prosječne specifične stope rasta riba po komori (tačka 2.1. ove metode). Nakon ove analize slijedi odgovarajući postupak [28]poreĐenja prosječnog r za svaku koncentraciju sa prosječnim r za kontrole, da se identifikuje najniža koncentracija pri kojoj postoji značajna razlika na nivou vjerovatnoće od 0,05. Ako nisu zadovoljene potrebne pretpostavke za

[28] Dunnett C.W., (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with aCOntrol, J. Amer. Statist. Assoc., 50, p. 1096-1121.
Dunnett C.W., (1964) New tables for multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, p. 482-491.
Williams D.A., (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels areCompared with a zero dose Control.
Biometrics 27, p. 103-117.
Williams D.A., (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control.
Biometrics 28,p. 510-531

parametarsku statistiku - nenormalna distribucija ili heterogena varijansa, prije ANOVA podaci se konvertuju da bi se homogenizovale varijanse ili se uradi pondirana ANOVA.

Ako u ispitivanju nisu korišćeni duplikati komora za svaku koncentraciju, ANOVA na bazi podataka za cijelu komoru neće biti osjetljiva ili je neće biti moguće uraditi. Kompromis je da se uradi ANOVA na "pseudo" specifičnim stopama rasta r_3 za pojedinačne jedinke riba.

Prosječni r_3 za svaku koncentraciju poredi se sa prosječnim r_3 za svaku kontrolu. LOEC se identifikuje kao i ranije. Ovaj postupak ne trpi, niti sprječava, varijabilnost između komora, osim varijabilnosti koja postoji zbog varijabilnosti između pojedinih jedinki riba. Varijabilnost između komora je mala u poreĐenju sa varijabilnošću između jedinki. Ako se pojedinačne jedinke riba ne uključe u analizu, opisuje se postupak identifikacije ekstremnih vrijednosti i opravdava njegova upotreba.

2.2. Tumačenje rezultata

Rezultati se tumače sa oprezom kad se izmjerene toksične koncentracije u rastvorima nalaze blizu granice detekcije primjenjenog analitičkog postupka, ili kad se u polustatičnom sistemu za ispitivanje smanji koncentracija ispitivane supstance između svježe pripremljenog rastvora i prije obnavljanja.

2.3. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži sljedeće podatke: 1) ispitivana supstanca:
- priroda supstance i relevantna fizička i hemijska svojstva;
- podaci o hemijskoj identifikaciji, uključujući čistoću i analitički postupak za kvantifikaciju ispitivane supstance ukoliko je primjenjivo. 2) ispitivana vrsta:
- latinski naziv, ako je moguće: soj, veličina, dobavljač, prethodna obrada (ako je raĐena) itd. 3) uslovi ispitivanja:
- primjenjeni postupak (npr. statički, polustatički, protočni i dr.);
- ispitivana postavka (npr. broj akvarijuma, koncentracije i duplikati, broj riba po komori);
- postupak pripreme osnovnog rastvora i učestalost obnavljanja (mora se navesti ako se koristilo sredstvo za povećanje rastvorljivosti i njegova koncentracija);
- nominalne koncentracije test supstance, srednja vrijednost izmjerenih vrijednosti i njihove standardne devijacije u komorama i metoda kojom su dobijene, kao i dokaz da se mjerenja odnose na koncentracije ispitivane supstance u pravom rastvoru;
- svojstva vode za razblaživanje: pH, tvrdoća, alkalitet, temperatura, koncentracija rastvorenog kiseonika, nivo rezidualnog hlora (ukoliko je mjeren), ukupni organski ugljenik, suspendovane

čestice, salinitet medijumuma (ukoliko je mjeren) i sva druga obavljena mjerenja;

- kvalitet vode u komorama (pH, tvrdoća, temperatura i koncentracija rastvorenog kiseonika);
- detaljne podatke o ishrani (npr. vrsta, porijeklo i količina hrane, ako i dinamika ishrane). 4) rezultati:
- dokaz da su kontrole zadovoljile kriterijume prihvatljivosti što se tiče preživljenja i podaci o smrtnosti pri svakoj pojedinoj koncentraciji test supstance;
- korišćene statističke analitičke tehnike, statistika ubazirajuna na duplikatima mjerenja ili na jedinki, obrada podataka i opravdanje za primjenjene tehnike;
- podaci navedeni u tabeli o težini pojedinačnih riba i srednjoj težini riba nultog, 14. (ukoliko se težina mjerila 14. dana) i 28. dana prosječne vrijednosti po akvarijumu ili pseudospijecifične brzine rasta (ukoliko je primjereno) za period od 0. do 28. dana i ako je moguće od 0. do 14. kao i od 14. do 28. dana;
- rezultati statističke analize (tj. regresione analize ili ANOVA) ako je moguće dati tabelarno ili u grafičkom obliku i LOEC (p = 0,05) i NOEC ili ECx sa, kad je moguće, standardnim greškama

(ukoliko je primjereno);

- pojava svih neobičnih reakcija riba i svakog vidljivog efekta koji uzrokuje ispitivana supstanca.

VRSTA RIBA PREPORUČENE ZA ISPITIVANJE I POGODNI USLOVI ISPITIVANJA
DIO II

Vrsta	Preporučeni opseg temerature (^oC)	Fotoperiod (h)	Preporučeni opseg za početnu težinu ribe (g)	Tražena preciznost mjerenje	Nasad stopa opterećenja (g/l)	Gustina nasada (po litri)	Hrana – dužina ispitivanja (u danima)
Preporučene vrste:							
Oncorhznchus mzkiss (kalifornijska pastrmka)	12.5-16.0	12-16	1-5	do najbližih 100mg	1.2-2.0	4	suva≥28 hrana za mlaĐ salmonida
Ostale dobro opisane vrste:							
Danio rerio (zebrica)	21-25	12-16	0.05-0.1	do najbližih 1 mg	0.2-1.0	5-10	živa hrana≥28 (Brachionus Artemia)
Orzyias latipes	21-25	12-16	0.05-0.1	do najbližih 1 mg	0.2-1.0	5-20	živa hrana≥28 (Brachionus Artemia)

HEMIJSKE OSOBINE VODE ZA RAZBLAŽIVANJE PRIHVATLJIVOG KVALITETA
DIO III

Supstanca	Koncentracija
Čestice	<20 mg/l
Ukupni organski ugljanik	<2 mg/l

Nejonizovani amonijak	<1 µg/l
Rezidualni hlor	<10 µg/l
Ukupni organofosfati pesticidi	<50 ng/l
Ukupni organohlorni pesticidi plus polihlorovani bifenili	<50 ng/l
Ukupni organski hlor	<25 ng/l

LOGARITAMSKI NIZOVI KONCENTRACIJA KOJE SU POGODNE ZA ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI[29]

DIO IV

Kolona (Broj koncentracija između 100 i 10 ili između 10 i 1)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3.2	10	18	25	32	37	42
1.0	4.6	10	16	22	27	32
	2.2	5.6	10	15	19	24
	1.0	3.2	603	10	14	18
		1.8	4.0	6.8	10	13
		1.0	2.5	4.6	7.2	10
			1.6	3.2	5.2	7.5
			1.0	2.2	3.7	5.6
				1.5	2.7	4.2
				1.0	1.9	3.2
					1.4	2.4
					1.0	1.8
						1.3
						1.0

[30]

[29] Environment Canada, (1992) Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish(rainbow trout, Coho salmon, or Atlantic salmon).
Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, p. 81

[30] Niz od pet (ili više) uzastopnih koncentracija može se izabrati iz jedne od kolona u tabeli. Srednja tačka između dvije koncentracije u n-toj koloni pronalaze se u koloni 2n + 1. Navedene vrijednosti su koncentracije izražene u zapreminskim ili masenim procentima (mg/l ili µg/l). Vrijednosti se mogu množiti ili dijeliti za faktor 10, po potrebi. Kolona 1 može se koristiti ako postoji značajna nesigurnost u vezi sa nivoom toksičnosti.

C.15. RIBE: METODA ISPITIVANjA KRATKOROČNE TOKSIČNOSTI NA EMBRIONALNOM I LARVALNOM STADIJUMUMUMU

DIO I

1. Metoda ispitivanja

Metoda ispitivanja kratkoročne toksičnosti na embrionalnom i larvalnom stadijumumumu se zasniva na OECD TG 212 (1998) uputstvu ispitivanja.

1.1. Uvod

Metoda ispitivanja kratkoročne toksičnosti na embrione i larve riba je kratkoročni test u okviru koga se ispitivanoj supstanci izlažu različiti razvojni stadijumumumi ribe, od tek oploĐenog jajeta pa sve do stadijumumuma na isteku faze hranjenja putem žumančane kese. U metodi kojom se ispituje toksičnost na embrionalni i larveni stadijumumum hrana se ne dodaje pa se ispitivanje završava u fazi dok se larve još hrane putem žumančane kese.

Namjena metode je određivanje letalnih i u izvesnoj mjeri, subletalnih efekata hemikalija na specifične razvojne stadijumumume i ispitivane vrste. Metoda ispitivanja pruža korisne podatke koji mogu:

1. predstavljati sponu između ispitivanja letalnog i subletalnog dejstva,
2. biti korišćena kao skrining test u okviru ispitivanja toksičnosti u cijeloj ranoj fazi života ili u okviru ispitivanja hronične toksičnosti i
3. biti korišćena za ispitivanje vrsta čije tehnike uzgoja nisu dovoljno uznapredovale da bi omogućile studije perioda promjene iz endogenog u egzogeni način ishrane.

Preciznu procjenu hronične toksičnosti hemikalije na ispitivanu vrstu daju ispitivanja koja obuhvataju sve faze životnog ciklusa ribe. Svako skraćivanje izlaganja, koje nije obuhvatilo sve faze životnog ciklusa, smanjuje osjetljivost metode ispitivanja i potcjenjuje hroničnu toksičnost hemikalije. Ispitivanje na embrionalnom i larvalnom stadijumumumu je manje osjetljivo od ispitivanja toksičnosti u cijeloj ranoj fazi života, posebno ako se ispituje toksičnost izrazito lipofilnih hemikalija (log P_{ow}> 4) i hemikalija specifičnog toksičnog dejstva. Kod hemikalija nespecifičnog, narkotičkog djelovanja, razlike u osjetljivosti su manje.

1.2. Definicije

Najniža efektivna koncentracija (Lowest Observed Effect Concentration, u daljem tekstu: LOEC) je najniža koncentracija ispitivane supstance pri kojoj je uočeno da supstanca, u poreĐenju sa kontrolnom grupom, izaziva značajno dejstvo (kod $p < 0,05$). Sve koncentracije više od LOEC u toku ispitivanja imaju štetno dejstvo jednako onom ili veće od onog uočenog pri LOEC.

Koncentracija koja ne dovodi do uočljivog efekta (No Observed Effect Concentration, u daljem tekstu: NOEC) je koncentracija ispitivane supstance neposredno ispod LOEC.

1.3. Princip metode

Embrioni i larve riba izlažu se seriji koncentracija ispitivane supstance rastvorene u vodi. U okviru ispitivane postavke, moguć je izbor semistatičkih ili protočnih uslova. Izbor zavisi od prirode ispitivane supstance. Ispitivanje započinje postavljanjem oploĐenih jaja u komore za ispitivanje, a završava se neposredno prije nego žumančana kesa bilo koje larve, u bilo kojoj od ispitivanih komora, bude u potpunosti apsorbovana, odnosno prije nego što se u kontrolnoj grupi uoči smrtnost usled izgladnjivanja. Procjenjuju se letalni i subletalni efekti, koji se zatim porede sa vrijednostima u kontroli, da bi se odredila najniža efektivna koncentracija, a time i koncentracija koja ne dovodi do uočljivog efekta. Rezultati se analiziraju i pomoću regresionog modela, da bi se procjenila koncentracija ispitivane supstance koja dovodi do određenog procentualnog efekta (LC/EC_x, pri čemu je x procenat efekta).

1.4. Podaci o ispitivanoj supstanci

Na rapolaganju su rezultati ispitivanja akutne toksičnosti (Metoda C.1. koja je data u ovom prilogu), na istoj vrsti koja je izabrana za ispitivanje. Rezultati su od pomoći pri izboru prikladnog opsega koncentracija ispitivane supstance za metodu ispitivanja na ranim stadijumumumima razvoja. Poznata je rastvorljivost ispitivane supstance u vodi (uključujući i rastvorljivost u vodi koja se koristi za ispitivanje) i napon pare ispitivane supstance. Potrebna je i pouzdana analitička metoda kojom se određuje količina ispitivane supstance u rastvorima o čijoj tačnosti i granici detekcije postoje dostupni podaci.

U podatke o ispitivanoj supstanci koji su od koristi pri uspostavljanju uslova ispitivanja u kojima se obavlja ispitivanje, spadaju strukturna formula ispitivane supstance, podaci o hemijskoj čistoći, fotostabilnosti, stabilnosti u ispitivanim uslovima, pK_a, P_{ow} i rezultati ispitivanja biorazgradljivosti (Metodu C.4. koja je data u ovom prilogu).

1.5. Prihvatljivost ispitivanja

Da bi ispitivanje bilo prihvatljivo, primjenjuju se sljedeći uslovi:

- ukupno preživljavanje oplođenih jaja u kontrolisanim grupama i gdje je relevantno, u posudama za ispitivanje punjenim samo rassupstancaačem, je veće ili jednako granicama definisanim u Dijelu III i IV ove metode;
- u toku cijelog ispitivanja, koncentracija rastvorenog kiseonika iznositi između 60% i 100% vrijednosti zasićenja vazduha (ASV);
- u toku cijelog ispitivanja, temperatura vode u pojedinim komorama ili uzastopnim danima, ni u kom satu, međusobno se ne razlikuje za više od ± 1,5 °C i kreće se u temperaturnom opsegu specificiranom za tu ispitivanu vrstu (Dio III i IV ove metode).

1.6. Opis metode

1.6.1. Komore za ispitivanje

Koristi se bilo kakva staklena posuda ili posuda od hemijski inertnog materijala. Dimenzije posuda su velike da ispitivanje bude izvedeno u skladu sa preporučenim vrijednostima nasada (tačka 1.7.1.2. ove metode). Posude za ispitivanje raspoređuju se po principu slučajnog rasporeda. Ako u laboratorijai postoje sistemski efekti koji se mogu kontrolisati blok sistemom, slučajni raspored u blokovima (gdje je svaki tretman smješten u po jedan blok) ima prednost nad potpuno nasumičnim rasporedom. Ako se radi u blokovima, sistem se uzima u obzir kod analize podataka. Ispitivane komore zaštititi od neželjenog uznemiravanja.

1.6.2. Izbor vrste ribe

Vrste riba navedene su u Tabeli 1a. Koriste se i druge vrste (primjeri su navedeni u Tabeli 1b), ali se u tom slučaju procedura modifikuje, da bi se obezbijedili zadovoljavajući ispitivani uslovi. Ako se koriste druge vrste daje se objašnjenje za izbor vrste i opis ispitivane metode.

Tabela 1a: Preporučene vrste riba za metodu ispitivanja

Slatkovodne
Oncorhynchus mykiss (pastrmka)
Danio rerio (zebrica)
Cyprinus caprio (šaran)
Oryzias latipes
Pimephales promelas

Tabela 1b: Ostale dobro proučene vrste koje se mogu koristiti

Slatkovodna	Morske
Carassius auratus (srebrni karaš/babuška)	Media peninsulae Clupea harengus (haringa)
Lepomis macrochirus (sunčanica)	Gadus morhua (bakalar)
	Czprinodon variegatus (bjelica)

1.6.3. Održavanje laboratorijaske populacije riba

Detalji o održavanju laboratorijaske populacije riba u zadovoljavajućim uslovima dati su u metodi OECD TG 210.

1.6.4. Postepene sa embrionima i larvama

Unutar glavne posude za ispitivanje, embrioni i larve su izloženi ispitivanoj supstanci u manjim posudama mrežastih zidova koji omogućavaju nesmetan protok ispitivanog rastvora kroz posudu. Ujednačen protok kroz ove male posude se postiže tako što se one okače o mehaničku ruku, namještenu tako da posude pomiče gore-dolje, držeći organizme neprekidno uronjene u medijumum. Upotrebljava se i sifonski sistem. OploĐena jaja salmonidnih riba su poduprta na šipkama ili mrežama čija su okca dovoljno velika da larve, nakon što se izlijegu, propadaju kroz njih. U semistatičkim uslovima, u kojima je obezbijeĐeno svakodnevno obnavljanje rastvora, za uklanjanje embriona i larvi prikladno je upotrijebiti Pasterove pipete (tačka 1.6.6. ove metode).

Kada se za zadržavanje jaja unutar glavne posude koriste rešetke ili mreže, one se uklonjaju čim se larve izlijegu, sa izuzetkom mreža koje su i dalje potrebne za sprečavanje bježanja larvi. Ako postoji potreba za premiještanjem larvi, one se ne izlažu vazduhu, niti se za puštanje ribe iz posudica za jaja koriste mrežice (ova mjera opreza je suvišna ako se radi o nekoj manje osjetljivoj vrsti ribe, npr. šaranu). Pogodan momenat za premiještanje larvi varira od vrste do vrste, a sam premještaj nije uvjek nužan. Ako se ispitivanje odvija u semistatičkim uslovima, koriste se laboratorijaske čaše ili plitke posude, po potrebi opremljene mrežicom podignutom iznad dna posude. Premiještanje embriona ili larvi se ne sprovodi ako je zapremina ovih posuda dovoljna da zadovolji postavljene zahtjeve u pogledu nasada (tačka 1.7.1.2. ove metode).

1.6.5. Voda

Svaka voda čija hemijska svojstva odgovaraju svojstvima prihvatljive vode za razblaživanje, (navedeno u Dijelu V ove metode) i u kojoj jedinke ispitivane vrste u kontrolisanim grupama preživljavaju barem u mjeri kako je opisano u Dijelu III i IV ove metode, prikladna je za ispitivanje. Kvalitet vode ostaje nepromijenjen u toku cijelog ispitivanja. Vrijednost pH održavati u opsegu od ± 0,5. Kako bi se osiguralo da voda koja se koristi za razblaživanje ne utiče prekodnosno na rezultate ispitivanja (npr. kompleksiranjem ispitivane supstance) ili negativno ne utiče na ponašanje matičnog jata, uzorke vode povremeno analizirati. Ako se zna da se kvalitet vode korišćene za razblaživanje bitno ne mijenja, svaka tri mjeseca izmjeriti koncentraciju teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), glavnih anjona i katjona (npr. Ca, Mg, Na, K, Cl i CO_4), pesticida (npr. ukupne organofosforne i organohlorne pesticide), ukupnu koncentraciju organskog ugljenika i u vodi suspendovanih materija. Ako se pokaže da je kvalitet vode konstantan u toku perioda od najmanje godinu dana, analize

ovih pokazatelja ne moraju biti tako česte, pa se razmaci između dvije analize produžavaju (na svakih šest mjeseci).

1.6.6. Rastvori ispitivane supstance

Rastvori ispitivane supstance izabrane koncentracije pripremaju se razblaživanjem osnovnog rastvora. Osnovni rastvor se priprema tako što se ispitivana supstanca mehanički promiješa sa vodom za razblaživanje ili protrese u njoj (miješanjem i pomoću ultrazvuka). Odgovarajuća koncentracija osnovnog rastvora se obezbjeĐuje upotrebom kolona zasićenja (kolona rastvorljivosti). Upotrebu rassupstancaača ili disperzionih sredstava (agensa koji olakšavaju rastvaranje) izbjegavati kad god je moguće. Pripremanje osnovnog rastvora odgovarajuće koncentracije u nekim slučajevima iziskuje upotrebu ovih jedinjenja. U odgovarajuće rassupstancaače spadaju: aceton, etanol, metanol, dimetilformamid i trietilenglikol. U odgovarajuća disperziona sredstva spadaju: Cremophor RH40, Tween 80, metilceluloza 0,01% i HCO-40. Pri upotrebi biorazgradljivih agenasa (npr. acetona), odnosno lako isparljivih jedinjenja preduzeti određene mjere opreza, jer kod ispitivanja u protočnim uslovima dolazi do problema u smislu bakterijske nadgradnje. Ako se koristi sredstvo koje olakšava rastvorljivost, ono nema značajnih efekata na preživljavanje, niti vidljivih neželjenih efekata na rane razvojne oblike riba kontrolne grupe, izložene samo rassupstancaaču.

Ako se ispitivanje obavlja u polustatičnom sistemu, obnavljanje ispitivanog rastvora radi se na dva načina: ispitivani rastvor se priprema u čistim posudama, a preživjela jaja i larve u maloj zapremini starog rastvora premiještaju u nove posude, izbjegavajući pri tom pristup vazduha, ili se ispitivani organizmi zadrže u posudama, a promjeni određeni dio (najmanje tri četvrtine) rastvora. Učestalost obnavljanja medijumuma zavisi od stabilnosti ispitivane supstance, svakodnevno. Ako se prema rezultatima skrining testa (tač 1.4. ove metode) pokaže da koncentracija ispitivane supstance u toku perioda između obnavljanja nije stabilna (tj. izlazi iz opsega od 80% do 120% nominalnih vrijednosti, odnosno pada ispod 80% prvobitno izmjerene koncentracije), razmotriti mogućnost ispitivanja u protočnim uslovima. U toku obnavljanja rastvora paziti da se izbjegne stresogeno dejstvo na larve.

Za ispitivanja koja se izvode u protočnim uslovima potreban je sistem koji će neprekidno raspršivati i razblaživati osnovni rastvor ispitivane supstance (npr. mjerna pumpa, proporcionalni razblaživač, sistem za zasićenje) kako bi ispitivana supstanca stizala u ispitivane komore u seriji koncentracija. Tokom trajanja ispitivanja, protok osnovnog rastvora i vode za razblaživanje provjeriti, svakodnevno, a protok u toku cijelog trajanja ispitivanja ne varira za više od 10%. Kao odgovarajući pokazao se 24-satni protok ekvivalentan ukupnoj zapremini minimum pet komora za ispitivanje.

1.7. Procedura

Korisni podaci o ispitivanju toksičnosti na embrionima i larvama.

1.7.1. Uslovi izlaganja

1.7.1.1. Trajanje

Ispitivanje započeti u prvih 30 minuta nakon oplodnje jaja. Embrioni se u ispitivani rastvor uranjaju prije nego što nastupi cijepanje blastodiska, odnosno što prije nakon toga, ali u svakom slučaju prije početka stadijumumuma gastrule. Ako se koriste jaja nabavljena od komercijalnog dobavljača, događa se da sa ispitivanjem nije moguće započeti odmah nakon oplodnje. Kako odlaganje početka ispitivanja značajno narušava osjetljivost metode, ispitivanje započeti najdalje osam sati od oplodnje. Larve se u toku perioda izlaganja ne hrane, pa ispitivanje okončati neposredno prije nego što žumančana kesa bilo koje larve, u bilo kojoj od ispitivanih komora, bude u potpunosti apsorbovana, odnosno prije nego što larve u kontrolisanim grupama uginu od izgladnjelosti. Trajanje ispitivanja zavisi od vrste ribe. Neke preporučene dužine trajanja ispitivanja navedene su u Dijelu III i IV ove metode.

1.7.1.2. Nasad

Na početku ispitivanja broj oplođenih jaja zadovoljava statističke zahtjeve. Jaja nasumice rasporediti između tretmana. Svakoj koncentraciji ispitivane supstance izložiti najmanje 30 oplođenih jaja, koliko je moguće jednako raspodijeljenih u najmanje tri replike (kod nekih vrsta riba teško je dobiti jednake serije). Nasad (biomasa po zapremini rastvora) je dovoljno niska da se koncentracija rastvorenog kiseonika bez aeracije održava na minimum 60% ASV. Kod ispitivanjima u protočnim uslovima, nasad u 24 sata ne prelazi 0,5 g/l, odnosno da ni u kom trenutku ne prelazi 5 g/l rastvora[47].

1.7.1.3. Osvjetljenje i temperatura

Fotoperiod i temperatura rastvora su odgovarajući za svaku ispitivanu vrstu (Dio III i IV ove metode). Za praćenje temperature je prikladna upotreba dodatne posude za ispitivanje.

1.7.2. Koncentracije ispitivane supstance

Uobičajeno je da se ispitivanje obavlja u seriji od pet koncentracija ispitivane supstance u rastućem nizu, koji se međusobno razlikuju za konstantno isti faktor, ne veći od 3,2. Pri izboru opsega ispitivanih koncentracija uzeti u obzir krivu zavisnosti LC_{50} i vremena izlaganja, dobijenu ispitivanjem akutne toksičnosti. U nekim slučajevima, npr. kod ispitivanja namijenjenih određivanju gornje granične koncentracije, ispitivanje se obavlja u manje od pet koncentracija ili u seriji užeg opsega. Ako se ispitivanje obavlja u manje od pet koncentracija ispitivane supstance, navesti objašnjenje. Koncentracije supstance koje prelaze 96 hLC_{50}, odnosno 100 mg/l (zavisno od toga koja je od navedenih vrijednosti niža) se ne ispituju. Supstance se ne ispituju u koncentracijama koje prelaze granicu njihove rastvorljivosti u medijumumu.

Ako se za pripremu ispitivanog rastvora koristi sredstvo koje olakšava rastvaranje (tačka 1.6.6. ove metode), njegova krajnja koncentracija u svim posudama je jednaka i ne prelazi 0,1 ml/l.

1.7.3. Kontrolne grupe

Uz seriju koncentracija ispitivane supstance, postavlja se i jedna kontrolna grupa (u potrebnom broju ponavljanja) u kojoj se nalazi samo voda za razblaživanje i ukoliko je u konkretnom slučaju relevantno, jedna (u potrebnom broju ponavljanja) kontrolna grupa u kojoj medijumum sadrži i sredstvo za lakše rastvaranje ispitivane supstance.

[47] OECD, (2002) Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris

1.7.4. Učestalost analitičkih određivanja i mjerenja

Koncentracije ispitivane supstance određuju se u pravilnim vremenskim razmacima, tokom ispitivanja.

Ako se ispitivanja izvode u polustatičkim uslovima, u kojima se očekuje da će se koncentracija ispitivane supstance zadržati unutar ± 20% nominalnih vrijednosti, odnosno u opsegu od 80% do 120% (tačke 1.4. i 1.6.6. ove metode), tri puta u pravilnim vremenskim razmacima se analiziraju uzorci najviše i najniže koncentracije, tako što se prve analize rade neposredno nakon pripreme rastvora, a zatim i odmah nakon njihovog obnavljanja. Analizirati uzorak istog rastvora - svježe pripremljen i prilikom obnavljanja.

U ispitivanjima kod kojih se na osnovu podataka o stabilnosti supstance ne očekuje da će se njena koncentracija zadržati unutar ± 20% nominalne vrijednosti, analizirati rastvore svih koncentracija neposredno nakon pripreme i prilikom njihovog obnavljanja, pridržavajući se opisanog režima kontrole (analiza se obavlja u najmanje 3 navrata u pravilnim vremenskim razmacima).

Koncentraciju ispitivane supstance prije obnavljanja u svakom rastvoru odrediti u jednoj od replika, u razmaku ne dužem od sedam dana. Preporučuje se da se rezultati ispitivanja baziraju na izmjerenim koncentracijama. Ali, ako postoje dokazi da se ispitivana koncentracija na zadovoljavajući način održava unutar ± 20% nominalne ili izmjerene prvobitne koncentracije, rezultati se baziraju na nominalnim ili prvobitno izmjerenim vrijednostima.

Ako se ispitivanje izvodi u protočnim uslovima, prikladan je režim uzimanja uzorka za analizu sličan režimu opisanom za semistatičke uslove (ali u ovom slučaju mjerenje "starih" rastvora nije primjenljivo). Ako ispitivanje traje duže od sedam dana, poveća se broj uzoraka uzetih u toku prve nedelje (obaviti tri serije mjerenja) da bi se osiguralo da ispitivane koncentracije i dalje budu stabilne.

Uzorci se centrifugiraju ili filtriraju (pomoću 0,45 μm filtera). Ali, ako ni u jednom od dva pomenuta načina pripreme uzoraka nije moguće razdvojiti bio dostupnu frakciju ispitivane supstance od bio nedostupne, uzorci se ne podvrgavaju ovim pokolonama.

Tokom ispitivanja, u svim posudama mjeri se rastvoreni kiseonik, pH i temperatura. U kontrolisanim posudama i posudi u kojoj je koncentracija ispitivane supstance najviša, izmjeriti ukupnu tvrdoću rastvora i salinitet, ukoliko je mjerodavan, najmanje tri puta (na početku, sredinom i na kraju ispitivanja). Ako se ispitivanje izvodi u semistatičkim uslovima rastvoreni kiseonik se mjeri češće, ako je moguće prije i nakon svakog obnavljanja vode, odnosno minimum jednom nedeljno.
Pri ispitivanju u uslovima statičkog obnavljanja, pH vrijednost mjeriti na početku i na kraju svakog obnavljanja vode, a pri ispitivanju u protočnim uslovima najmanje jednom nedeljno. Tvrdoću rastvora izmjeriti jednom u toku ispitivanja. Temperaturu mjeriti svakodnevno, a preporučljivo je da se u najmanje jednoj od posuda prati neprekidno.

1.7.5. Zapažanja

1.7.5.1. Razvojni stadijumumum embriona

Na početku izlaganja ispitivanoj supstanci, embrionalni stadijumumum (tj. stadijumumum gastrule) potvrditi što je preciznije moguće, pomoću reprezentativnog uzorka, adekvatno sačuvanih i očišćenih jaja.

1.7.5.2. Izvaljivanje iz jaja i preživljavanje

Zapažanja koja se odnose na izvaljivanje iz jaja i preživljavanje, zapisuju se najmanje jednom dnevno. Na početku ispitivanja zapažanja se obavljaju i češće (u toku prva tri sata na svakih 30 minuta), jer u nekim slučajevima (npr. kada se javljaju akutni toksični efekti), vremena preživljavanja su od veće važnosti nego broj uginulih primjeraka. Uginule embrione i larve ukloniti odmah po opažanju, jer se mogu vrlo brzo raspasti. Pri odstranjivanju uginulih primjeraka, pažnju posvetiti tome da se ne udare ili fizički oštete jaja/larve u neposrednoj blizini, koje su posebno nježne i osjetljive. Kriterijumi za proglašavanje smrti variraju u zavisnosti od stadijumumuma životnog ciklusa:

- za jaja - primjetan gubitak prozirnosti i promjena boje uzrokovani zgrušavanjem, odnosno precipitacijom bjelančevina, što uslovljava bijeli, neproziran izgled, naročito u ranim razvojnim stadijumumumima;
- za embrione - odsustvo kretnji tijela i/ili pulsa, odnosno promjena boje i neproziran izgled vrsta čiji su embrioni u redovnim okolnostima prozirni;
- za larve - nepokretnost i/ili odsustvo pokreta disanja i/ili odsustvo pulsa i/ili bijelo neprozirno obojen centralni nervni sistem i/ili izostanak reakcije na mehanički nadražaj.

1.7.5.3. Patološki izgled

Broj larvi patološkog oblika tijela, odnosno boje, kao i stadijumumum apsorpcije u kom se nalazi žumančana kesa, zabilježe se u adekvatnim vremenskim razmacima zavisno od dužine ispitivanja i prirode patološke promjene koja se opisuje. Patološki oblici embriona i larvi javljaju se i prirodno, a njihova zastupljenost u kontrolnoj grupi (grupama) nekih vrsta je reda veličine nekoliko procenata. Životinje patoloških obilježja iz posude za ispitivanje ukloniti tek kad uginu.

1.7.5.4. Patološko ponašanje

Patološke promjene, npr. hiperventilaciju, nekoordinisano plivanje i atipično mirovanje, zabilježiti u adekvatnim vremenskim razmacima u zavisnosti od dužine ispitivanja. Iako ih je teško kvantifikovati, ovi efekti kada se uoče pomažu u tumačenju rezultata smrtnosti, tj. daju podatke o načinu toksičnog dejstva ispitivane supstance.

1.7.5.5. Dužina

Na kraju ispitivanja, preporučljivo je izmjeriti dužinu svake jedinke. Moguće je mjeriti standardnu, poprečnu ili ukupnu dužinu. Ako repno peraje istrune ili erodira, izmjeri se standardna dužina. U dobro ssprovedenom ispitivanju, koeficijent varijacije dužine replika uglavnom iznosi ± 20%.

1.7.5.6. Težina

Na kraju ispitivanja izmjeri se težina svake jedinke. Prednost se daje suvoj masi (riba sušena 24 sata na temperaturi od 60°C) u odnosu na svježu (površina ribljeg tijela osuši se upijanjem). U dobro obavljenom ispitivanju, koeficijent varijacije težine replika iznositi ± 20%. Ova zapažanja će rezultirati nekim ili svim navedenim podacima koji se analiziraju statistički:
- kumulativna smrtnost;

- broj zdravih larvi u pojedinoj replici zabilježen na kraju ispitivanja;
- vrijeme proteklo do početka, odnosno do okončanja izvaljivanja (tj. vrijeme koje je u svakoj replici bilo potrebno da se izlegne 90% larvi); - broj larvi koji se dnevno izvalio;
- dužina (i težina) preživjelih životinja na kraju ispitivanja; - broj larvi patološkog oblika ili izgleda;
- broj larvi patološkog ponašanja.

2. Podaci i izvještaj

2.1. Obrada rezultata

U ispitivanu postavku i analizu je uključen statističar, jer ova metoda omogućava znatne varijacije u ispitivanoj postavci, npr. u broju upotrijebljenih ispitivanih posuda, broju ispitivanih koncentracija, početnom broju oplođenih jaja i mjernim pokazateljima. S obzirom na broj opcija koje pri postavci ove metode ispitivanja stoje na rapolaganju, ovdje nisu navedene specifične smjernice za statističku obradu rezultata.

Ako treba odrediti LOEC/NOEC, analizirati varijacije unutar svakog od setova replika, i to upotrebom analize varijance (ANOVA) ili pokolonama koji koriste tabele kontingencije. Pri višestrukom poređenju rezultata dobijenih pri izlaganju pojedinim koncentracijama ispitivane supstance i rezultata dobijenih u kontrolisanim grupama, koristi se Dunetova metoda. Na rapolaganju su i druge korisne metode. Veličina efekta koja se detektuje pomoću ANOVA ili drugih postupaka statističke obrade (tj. statistička snaga), mora se iizračunava i navodi. Za statističku analizu putem ANOVA nisu prikladna sva zapažanja navedena u odjeljku 1.7.5.6. ove metode. Na primjer, kumulativna smrtnost i broj zdravih larvi u pojedinoj replici, zabilježeni na kraju ispitivanja, analiziraju se probit metodama.

Ako se određuje LC/EC_x, adekvatnu krivu (kao što je logistička) prilagoditi značajnim podacima koristeći statističke metode poput metoda najmanjih kvadrata ili metoda nelinearnih najmanjih kvadrata. Krivu (krive) parametarski prilagoditi na način da se LC/EC_x od interesa i njena standardna greška direktno utvrđuju. Ovo će značajno olakšati iizračunavanje intervala povjerenja oko vrijednosti LC/EC_x. Ako ne postoje dobri razlozi za davanje prednosti drugačijim nivoima povjerenja, interval povjerenja koji se navodi je dvostrani 95%-ni. Postupak prilagođavanja krive osigurati na način na koji će se procijeniti statistički značaj neprilagođenosti. Za prilagođavanje krivih koriste se grafičke metode. Regresiona analiza je pogodna za analizu svih zapažanja nabrojenih u dijelu 1.7.5.6. ove metode.

2.2. Tumačenje rezultata

Kada se izmjerene koncentracije ispitivane supstance nalaze u koncentracijama bliskim granici detekcije analitičke metode, rezultate tumačiti oprezno. Treba paziti i kod tumačenja rezultata dobijenih pri izlaganju ispitivanih modela koncentracijama koje prelaze rastvorljivost ispitivane supstance u vodi.

2.3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o: 1) ispitivanoj supstanci:
- fizička priroda i relevantna fizička i hemijska svojstva;

- podaci od značaja za hemijsku identifikaciju supstance kao što su njena hemijska čistoća i gdje je primjereno, analitička metoda kojom se kvantifikuje ispitivana supstanca. 2) ispitivana vrsta:
- latinski naziv, soj, broj roditeljskih jedinki riba (tj. koliko je ženki upotrebljeno da bi se u svakoj od replika obezbijedio potreban broj jaja), izvor i metoda sakupljanja oplođenih jaja, kao i rukovanje njima.

3) uslovi ispitivanja:

- primjenjena procedura ispitivanja (npr. polu-statični ili protočni sistem, vrijeme proteklo od oplodnje do početka ispitivanja, nasad, itd);
- fotoperiod;
- ispitivana postavka (npr. broj ispitivanih posuda i replika, broj embriona u svakoj od replika);
- metoda pripreme osnovnih rastvora i učestalost njihovog obnavljanja (koncentracija rassupstancaača ako se koristi);
- nominalne koncentracije ispitivane supstance, izmjerene vrijednosti, njihove aritmetičke sredine i standardna devijacija, metoda kojom su dobijene, i ukoliko je ispitivana supstanca u vodi rastvorljiva u koncentracijama nižim od ispitivanih dokazi da se mjerenja odnose na koncentracije ispitivane supstance u rastvoru;
- karakteristike vode za razblaživanje (pH, tvrdoća, temperatura, koncentracija rastvorenog kiseonika, nivoi rezidualnog hlora, ukoliko su izmjereni, ukupni organski ugljenik, koncentracija suspendovanih materija, salinitet ispitivanog medijumuma, ukoliko je izmjeren) i rezultati bilo kojih drugih mjerenja;
- kvalitet vode u posudama za ispitivanje (pH, tvrdoća, temperatura i koncentracija rastvorenog kiseonika);

4) rezultati:

- rezultati svih prethodno obavljenih studija o stabilnosti ispitivane supstance;
- dokazi da je stopa preživljavanja u kontrolisanim grupama zadovoljila standard prihvatljivosti za ispitivanu vrstu (Dio III i IV ove metode);
- podaci o smrtnosti/preživljavanju u embrionalnom i larvalnom stadijumumumu, i ukupna smrtnost/ukupno preživljavanje;
- broj dana do izvaljivanja i broj izvaljenih larvi;
- podaci o dužini (i težini);
- učestalost i opis patoloških morfoloških oblika, ako ih je bilo;
- učestalost i opis efekata ispitivane supstance na ponašanje ispitivanog modela, ukoliko je takvih bilo;
- statistička analiza i obrada podataka;
- za ispitivanja čiji su rezultati analizirani pomoću ANOVA, za svaki od utvrđenih odgovora ispitivanog modela na izlaganje ispitivanoj supstanci, najniža koncentracija ispitivane supstance pri kojoj se na nivou značaja od p = 0,05 javlja LOEC, odnosno ne javlja statistički značajan efekat NOEC, uključujući i opis primjenjenih statističkih postupaka i naznaku veličine efekta koji se mogao detektovati;
- ako su rezultati ispitivanja analizirani regresionim tehnikama, LC/EC_n i intervali povjerenja kao i grafički prikaz prilagođenog modela korišćenog pri iizračunavanju; - objašnjenje bilo kakvog odstepena od ove metode ispitivanja.

UPUTSTVO ZA ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI NA EMBRIONIMA I LARVAMA BRACHYDANIO RERIO (ZEBRICA)
DIO II

Zebrica potiče sa indijske obale (Koromandel), gdj naseljava brzake. Riječ je o običnoj akvarijumskoj ribi iz porodice šarana, a podaci o pokolonama držanja i uzgoja mogu se naći u standardnim priručnicima o tropskim ribama. Biologija ove ribe i njena upotreba u istraživanjima iz domena ribarstva, data je u literaturi[48].

Primjerci ove ribe rijetko su duži od 45 mm. Tijelo im je cilindričnog oblika, sa 7 do 9 tamnoplavih uzdužnih srebrnkastih pruga koje se protežu do repnog i analnog peraja. Dorzalna strana im je maslinastozelene boje. Mužjaci su vitkiji od ženki. Ženke su srebrnkastije, a abdomen im je rastegnut, naročito prije mrijesta.

Odrasle ribe podnose velike fluktuacije temperature, pH i tvrdoće vode. Međutiim, da bi se dobila zdrava riba koja proizvodi kvalitetna jaja, potrebno je obezbijediti optimalne uslove.

Tokom mrijesta, mužjak prati ženku i nasrće na nju, a jaja budu oploĐena čim se izbace. Jaja, koja su prozirna i neljepljiva, padaju na dno, na kom ih roditelji mogu pojesti. Na mrijest utiče svjetlost. Ukoliko je jutarnje svijetlo adekvatno, riba se mrijesti u ranim jutarnjim satima, u zoru. Ženka u razmaku od po nedelju dana može proizvesti serije od nekoliko stotina jaja.

Uslovi koje treba obezbijediti roditeljskoj populaciji, reprodukcija i rani razvojni stadijumumumi

Izabere se odgovarajući broj zdravih jedinki i drže se u odgovarajućoj vodi (Dio V ove metode) najmanje 2 nedelje prije mrijesta. Grupi riba dozvoliti da se razmnožava najmanje jednom prije nego što će se jaja koristiti u ispitivanju. Gustina populacije u toku ovog perioda ne prelazi 1 gram ribe po litri. Redovna izmjena vode ili upotreba sistema za prečišćavanje vode obezbjeđuje veću gustinu. Temperaturu u akvarijumima održavati na (25 ± 2) °C. Ribama davati raznovrsnu ishranu koja se može sastojati od. pogodne komercijalne suve hrane, živih novoizleglih larvi artemija, hironomida, dafnija, enhitrada.

Postupci koji su u praksi obezbjeĐivali serije zdravih, oploĐenih jaja, koja su korišćena za ispitivanja su:

U komoru za ispitivanje sa 50 l vode za razblaživanje smješta se osam ženki i 16 mužjaka, zaštiti od direktnog svijezemljišta i ostavi da uz što manje ometanja tamo borave najmanje 48 sati. Dan prije početka ispitivanja na dno komore se u poslijepodnevnim satima postavlja posuda za mrijest. Posuda se sastoji od okvira (od pleksiglasa ili nekog drugog prikladnog materijala), visine 5 cm do
7 cm, na čiji je vrh pričvršćenja gruba mrežica prečnika okaca 2 mm do 5 mm, a na dno se pričvsti fina mrežica okaca od 10 µm do 30 µm. Na grubu mrežicu smještenu na okvir pričvsti se „drveće za mrijest|| napravljeno od raspletenog najlonskog užeta. Nakon što se riba 12 sati ostavi u mraku, upali se prigušeno svijetlo koje stimuliše mrijest. Dva do četiri sata nakon mrijesta, posuda za mrijest se skloni i pokupe se jaja. Posuda za mrijest sprječava ribe da pojedu jaja, a istovremeno omogućava da se ona lako sakupe. Prije mrijesta iz kojeg će se jaja koristiti u ispitivanjima, roditeljska grupa riba ima najmanje jedan mrijest iz koga se jaja ne koriste u ispitivanju.

Najmanje dvije nedelje prije planiranog mrijesta, 5 do 10 mužjaka i ženki drže se pojedinačno. Nakon 5 do 10 dana, trbusi ženki se rastežu, a njihove genitalne papile postaju vidljive. Mužjaci nemaju papile. Mrijest se obavlja u za to namijenjenim komorama,

[48] Laale H.W., (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (Brachydanio rerio) in Fisheries Research. A Literature Review.J. Fish Biol. 10, p. 121-173

opremljenim lažno-mrežastim dnom. Komora se napuni vodom za razblaživanje, tako da visina vodenog stuba iznad mrežice iznosi 5 cm do 10 cm. Dan prije planiranog mrijesta, u komoru se smješta jedna ženka i dva mužjaka. Temperatura vode se postupno povećava do vrijednosti koja je za jedan stepen viša od temperature na koju su se ribe aklimatizovale. Komora se ostavi u mraku, bez uznemiravanja. Ujutro se upali prigušeno svijetlo, što stimuliše mrijest. Nakon 2 do 4 sata ribe se uklone, a jaja pokupe. Ako postoji potreba za serijama jaja većim od onih koje se mogu dobiti od jedne ženke, istovremeno se može postaviti veći broj takvih komora. Bilježenjem uspješnosti reprodukcije pojedinih ženki prije početka ispitivanja (veličine i kvaliteta serije njihovih jaja), za priplod se mogu odabrati ženke čija je reprodukcija najuspješnija.

Jaja se u posude za ispitivanje prenose pomoću staklenih pipeta (unutrašnjeg prečnika ne manjeg od 4 mm), koje imaju gumenu pumpicu. Količina vode u kojoj se jaja prenose mora biti što je moguće manja. Jaja su teža od vode pa lako iscure iz cijevčice. Potrebno je preduzeti mjere kojima se sprječava da jaja (i larve) dođu u dodir sa vazduhom. Uzorci serija se pregledaju mikroskopski, kako bi se uvjerilo da u početnim razvojnim stadijumumumima nema nepravilnosti. Dezinfekcija jaja nije dozvoljena.

Stopa smrtnosti jaja najviša je u prva 24 sata nakon oplodnje. Tokom ovog perioda često se uočava stopa smrtnosti od 5% do 40%. Jaja degenerišu zbog neuspješne oplodnje ili razvojnih mana. Čini se da kvalitet serije jaja zavisi od ženke, jer dok neke ženke doslijedno proizvode kvalitetna jaja, kod drugih se to nikada neće dogoditi. Brzina razvoja i izvaljivanja larvi varira od serije do serije. Stopa preživljavanja uspješno oplođenih jaja i larvi je visoka, obično iznad 90%. Pri temperaturi od 25 °C larve se izvaljuju iz jaja 3 do 5 dana nakon oplodnje, a žumančana kesa se apsorbuje otprilike 13 dana nakon oplodnje.

Dobro je istražen embrionalni razvoj[49]. Zbog prozirnosti jaja i larvi koje su se iz njih izvalile, prati se razvoj jedinki i uočavaju patološki razvojni oblici. Otprilike četiri sata nakon mrijesta, neoplođena jaja mogu se razlikovati od oplođenih[50]. Da bi se izvršilo ovaj pregled, jaja i larve se stavljaju u posude male zapremine i pregledaju pod mikroskopom.

Uslovi pod kojim se obavlja ispitivanje ranih razvojnih oblika nabrojani su u Dijelu III ove metode. Optimalna tvrdoća vode koja se koristi za razblaživanje je 250mg CaCO3/l, a pH vrijednost 7,8.

Izračunavanje i statistika

Predlaže se dvostepeni pristup. Prvo se statistički analiziraju podaci o smrtnosti, patološkom razvoju i vremenu potrebnom da se larve izvale. Zatim se, kod riba izloženih koncentracijama ispitivane suptance pri kojima nisu uočeni nikakvi neželjeni efekti ni na jedan od ovih pokazatelja, statistički vrednuje dužina tijela.

Ovo je preporučljiv pristup jer toksična supstanca može selektivno letalno da djeluje na manje jedinke, odloži vrijeme izvaljivanja i izazove makroskopski vidljive patološke oblike,

[49] Hisaoka K.K. and Battle H.I., (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish Brachydanio rerio(Hamilton-Buchanan) J.
Morph., 102, p. 311

[50] Nagel R., (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (Brachydanio rerioHamilton-Buchanan).Journal of Applied
Ichthyology,
2, p. 173-
181 35
Finney D.J., (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, p. 1-333

dovodeći do odstepena pri mjerenju dužine tijela. Pri svakoj koncentraciji mjeri se ugrubo isti broj jedinki, čime se obezbjeđuje valjanost statističke obrade rezultata ispitivanja.

Određivanje LC_{50} I EC_{50}

Procenat preživjelih embriona i larvi računa se i koriguje u odnosu na smrtnost zabilježenu u kontrolisanim grupama, u skladu sa Abotovom jednačinom[35]:

$P = 100 \cdot \frac{P' - C}{100 - C}$ gdje je: P korigovani procenat preživljavanja;P‘ procenat preživljavanja uočen pri test koncentraciji; C procenat preživljavanja u kontrolisanim grupama.

Ako postoji mogućnost, LC_{50} se određuje prikladnom metodom na kraju ispitivanja. Ako je u statističku analizu EC_{50} potrebno uključiti i morfološke abnormalnosti, smjernice i uputstvo dati su u literaturi[36].

Određivanje LOEC i NOEC

Cilj ispitivanja toksičnosti na embrionima i larvama je poređenje djelovanja koncentracija ispitivane supstance većih od nule sa kontrolisanim grupama, odnosno cilj metode je odrediti LOEC. Zbog toga primeniti postupke višestrukog poreĐenja[37].

USLOVI ISPITIVANJA, TRAJANJE ISPITIVANJA I KRITERIJUMI OCJENE PREŽIVLJAVANJA

ZA VRSTE KOJE SU PREPORUČENE ZA OVU METODU ISPITIVANJA

DIO III

Vrste	Temperatura (^oC)	Salinitet (0/00)	Fotoperiod (sati)	Dužina trajanja stadijumumuma		Tipična du ispitivanja	Preživljavanje u kontrolisanim grupama (minimum%)	
				Embrioni	Larve		Uspješno izvaljivanje	Poslije izvaljivanja
Slatkovodne								
Brachydanio rerio (zebrica)	25±1	-	12-16	3-5	8-10	odmah po oplodnji (rana faza gastrule) do 5 dana poslije izvaljivanja (8 do 10 dana)	80	90

Oncorhynchus mykiss (pastrmka)	10±1[38] 12±1[39]	-	0	30-35	25-30	odmah po oplodnji (rana faza gastrule) do 20 dana poslije izvaljivanja (50 do 55 dana)	66	70
Cyprinus carpio (šaran)	21-25		12-16	5	>4	odmah po oplodnji (rana faza gastrule) do 4 dana poslije izvaljivanja (8 do 9 dana)	80	75
Oryzias latipes	24±1[40] 23±1[77]	-	12-16	8-11	4-8	odmah po oplodnji (rana faza gastrule) do 5 dana poslije izvaljivanja (13 do	80	80

[36] Stephan C.E., (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment:Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing andMaterials, p. 69-81.

[37] Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer.Statist. Assoc., 50, p. 1096-1121. Dunnett C.W., (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, p. 482-491. Williams D.A., (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared witha Zero Dose Control.

Biometrics, 27, p. 103-117. Williams D.A., (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, p. 519-531. Sokal R.R. and Rohlf F.J., (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W.H.Freeman and Co., San Francisco.

[38] Za larve

[39] Embrioni i larve do jedne nedelje nakon izvaljivanja drže se u mraku, osim kada se pregledaju. Od tada se primjenjuje režim smanjenog osvjetljenja. 40 Za embrione

						16 dana)		
Pimephales promelas	25±2	-	16	4-5	5	odmah po oplodnji (rana faza gastrule) do 4 dana poslije izvaljivanja (8 do	60	70

						9 dana)		

USLOVI ISPITIVANJA, TRAJANJE ISPITIVANJA I KRITERIJUMI OCJENE PREŽIVLJAVANJA

ZA DRUGE DOBRO PROUČENE VRSTE

DIO IV

Vrste	Temperatura (^oC)	Salinitet (0/00)	Fotoperiod (sati)	Dužina trajanja stadijumumuma		Tipična duži ispitivanja	Preživljavanje u kontrolisanim grupama (minimum%)	
				Embrioni	Larve		Uspješno izvaljivanje	Poslije izvaljivanja
Slatkovodne								
Carassius auratu	24±1	-	-	3-4	>4	odmah po oplodnji (rana faza gastrule) do 4 dana poslije izvaljivanja (7 dana)	-	80
Leopomis macrochirus	21±1	-	16	3	>4	odmah po oplodnji (rana faza gastrule) do 4 dana poslije izvaljivanja (7 dana)	-	75
Morske								
Menidia peninsulae	22-25	15-22	12	1.5	>4	odmah po oplodnji (rana faza gastrule) do 5 dana poslije izvaljivanja (6 do 7 dana)	80	60
Clupea harengus	10±1	8-15	12	20-25	4-8	odmah po oplodnji (rana faza gastrule) do 3 dana poslije izvaljivanja (23 do 27 dana)	60	80

Ciprinodon	25±1	15-30	12	-	-	odmah po oplodnji (rana faza gastrule) do 4/7 dana poslije izvaljivanja (28 dana)	>75	80
Gadus morhua	5±1	5-30	12	14-16	5	odmah po oplodnji (rana faza gastrule) do 3 dana poslije izvaljivanja (18 dana)	60	80

HEMIJSKA SVOJSTVA VODE PRIHVATLJIVE ZA RAZBLAŽIVANJE
DIO V

Supstanca	Koncentracija
Čestice	<20 mg/l
Ukupni organski ugljenik	<2 mg/l
Nejonizovani amonijak	<1 µg/l
Razidualni hlor	<10 µg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	<50 ng/l
Ukupni organohlorni pesticidi i polihlorovani pesticidi	<50 ng/l
Ukupni organski hlor	<25 ng/l

C.16. PČELE - ISPITIVANJE AKUTNE ORALNE TOKSIČNOSTI

1. Metoda ispitivanja

Metoda ispitivanja akutne oralne toksičnosti se zasniva na OECD TG 213 (1998) uputstvu ispitivanja.

1.1. Uvod

Metoda ispitivanja toksičnosti je laboratorijaska metoda dizajnirana za procjenu akutne oralne toksičnosti sredstava za zaštitu bilja i drugih hemikalija na odrasle pčele-radilice.

Postupak procjene i vrednovanja toksičnih osobina supstanci zahtjeva utvrĐivanje akutne oralne toksičnosti kod pčela, npr. u slučajevima kada će pčele biti izložene datoj hemikaliji. Ispitivanje akutne oralne toksičnosti izvodi se da bi se utvrdila svojstvena toksičnost pesticida i drugih hemikalija na pčele. Rezultati ovog ispitivanja koriste se za utvrĐivanje potrebe za daljim vrednovanjem. Metoda je posebno pogodna kod etapnih programa za procjenu hazarda koji pesticidi predstavljaju za pčele, na osnovu hijerarhijskog redosleda, od laboratorijaskih ispitivanja toksičnosti, do poliuterenskih i terenskih ispitivanja. Pesticidi se ispituju kao aktivne supstance (u daljem tekstu: a.s) ili kao formulisani proizvodi.

Osjetljivost pčela i preciznost postupka ispitivanja potvrđuje se primjenom standardnih toksičnih supstanci.

1.2. Definicije

Akutna oralna toksičnost je štetna poslijedica koja se javlja najkasnije 96 sati nakon oralne primjene jednokratne doze ispitivane supstance.

Doza je količina konzumirane ispitivane supstance i izražava se kao masa (µg) ispitivane supstance po jedinki (µg/pčela). Prava doza za svaku pčelu ne iizračunava se s obzirom na to da se pčele hrane kolektivno, ali se iizračunava prosječna doza (u potpunosti konzumirana ispitivana supstanca po broju jedinki - pčela u jednom kavezu).

Oralna LD_{50} (srednja letalna doza) je statistički izvedena jednokratna doza supstance koja izazva smrt 50% životinja kad se primjenjuje oralno. Vrijednost LD_{50} izražava se u (µg) ispitivane supstance po pčeli. Ako se ispituje dejstvo pesticida, ispitivana supstanca je aktivna supstanca ili formulisani proizvod koji sadrži jednu ili više aktivnih supstanci.

Smrtnost je slučaj kada je jedinka potpuno nepomična i smatra se uginulom.

1.3. Princip metode

Odrasle pčele radilice (Apis melifera) izlažu se seriji doza ispitivane supstance, raspršene u rastvoru saharoze. Pčelama se nakon primjene jednokratne doze daje ista hrana, ali bez ispitivane supstance. Smrtnost se bijleži svakodnevno u toku najmanje 48 sati i poredi sa kontrolisanim vrijednostima. Ukoliko između 24 i 48 sata stopa smrtnosti raste, dok u kontrolnoj grupi i dalje ostaje na prihvatljivom nivou, odnosno < 10%, produžiti trajanje ispitivanja do najviše 96 sati. Rezultati ispitivanja se analiziraju da bi se izračunala vrijednost LD_{50} nakon 24 i 48 sati, a u slučaju da je ispitivanje produženo i nakon 72 i 96 sati.

1.4. Kriterijumi prihvatljivosti ispitivanja

Da bi ispitivanje bilo prihvaćeno, zadovoljavaju se sljedeći uslovi:
- prosječna smrtnost za ukupni broj kontrolnih grupa ne prelazi 10% na kraju ispitivanja; - LD_{50} standarda toksičnosti se nalazi u određenom opsegu.

1.5. Opis metode

1.5.1. Sakupljanje pčela

Koriste se mlade odrasle pčele radilice istog roda, odnosno pčele jednake starosti, stanja uhranjenosti itd. Pčele nabaviti iz adekvatno hranjenih, zdravih kolonija, bez zabilježenih bolesti, ustrojenih po hijerarhijskom principu matice, poznatog pedigrea i fiziološkog statusa. Sakupljaju se onog jutra kada se planira početak ispitivanja ili prethodno veče, pa ih do sjutradan držati u eksperimentalnim uslovima. Prikladne su pčele sakupljene sa okvira na kojima nema jaja. Sakupljanje pčela u rano proljeće ili kasnu jesen izbjegavati, jer je njihova fiziologija u to vrijeme promijenjena. Ako se ispitivanje izvodi u rano proljeće ili kasnu jesen, pčele se izliježu u inkubatoru i othranjuju nedelju dana "pčelinjim hljebom" (polenom sakupljenim iz saća) i rastvorom saharoze. Pčele tretirane hemijskim supstancama (antibiotici, proizvodi za uništavanje Varroa grinja) nije dozvoljeno koristiti za ispitivanje toksičnosti četiri nedelje nakon završetka posljednjeg tretmana.

1.5.2. Uslovi smještaja i ishrane Koriste se kavezi koji se lako čiste i dobro provjetravaju od bilo kog prikladnog materijala, npr. nerĐajućeg čelika, žičane mreže, plastike, i drveni kavezi za jednokratnu upotrebu itd. Grupa broji 10 pčela po kavezu. Veličina kaveza je primjerena broju pčela, kako bi im se pružio odgovarajući prostor.

Pčele držati u tamnoj laboratorijai na temperaturi od (25 ± 2) °C. Relativnu vlažnost, koja uobičajeno iznosi oko 50% do 70%, bilježiti u toku trajanja cijelog ispitivanja. Postupci rukovanja, uključujući tretman i bilježenje zapažanja, obavljaju se na dnevnom svijezemljištu. Kao hrana koristi se vodeni rastvor saharoze, krajnje koncentracije od 500 g/l (50% odnosa težine i zapremine, w/v). Nakon što su date doze, hranu davati neograničeno (ad libitum). Sistem hranjenja omogućava praćenje unosa hrane za svaki kavez (tačka 1.6.3.1. ove metode). Koristi se i staklena cijevčica (dužine oko 50 mm, širine 10 mm, sa otvorenim krajem koji se sužava do prečnika od oko 2 mm).

1.5.3. Priprema pčela

Pčele sakupljene slučajnim rasporedom smještaju se u kaveze koji se nalaze u laboratorijai, takoĐe po slučajnom rasporedu. Pčele se izgladnjavaju do 2 sata prije početka ispitivanja. Pčele se ne hrane prije tretmana da bi na početku ispitivanja svim jedinkama crijevni sadržaj bio isti. Pčele na umoru prije početka ispitivanja odbaciti i zamijeniti ih zdravim.

1.5.4. Priprema doza

Ako ispitivana supstanca spada u jedinjenja koja se mogu miješati sa vodom, direktno se raspršuje u 50%-ni rastvor saharoze. Ako su u pitanju komercijalni proizvod i supstance slabo rastvorljive u vodi, upotrijebljavaju se nosači kao što su organski rassupstancaači, emulgatori ili disperziona sredstva niske toksičnosti za pčele (npr. aceton, dimetilformamid, dimetilsulfoksid). Koncentracija nosača zavisi od rastvorljivosti ispitivane supstance i u svim grupama, u svim koncentracijama je ista. Odgovarajuća koncentracija nosača je 1% i ne prekoračuje se.

Pripremiti adekvatne kontrolne rastvore koji sadrže nosač (rassupstancaač ili disperziono sredstvo). Koriste se dvije odvojene kontrolne grupe sa vodenim rastvorom i sa rastvorom saharoze u koju je dodat nosač i to u koncentraciji primjenjenoj u ispitivanim rastvorima.

1.6. Postupak

1.6.1. Ispitivane i kontrolne grupe

Broj doza i broj ponavljanja zadovoljava statističke zahtjeve u pogledu određivanja LD_{50} u intervalima povjerenja od 95%. Ispitivanje se radi sa 5 doza u geometrijskoj seriji, sa faktorom ne većim od 2,2 tako da bude obuhvaćen opseg potreban za određivanje LD_{50}. Faktor razblaženja i broj koncentracija za doziranje se određuju prema nagibu krive toksičnosti (doza prema smrtnosti), vodeći računa o zahtjevima statističke metode odabrane za analizu rezultata. Preliminarna studija u cilju utvrĐivanja opsega koncentracija omogućava pravilan izbor ispitivanih koncentracija.

Najmanje tri grupe po 10 pčela u svakom kavezu se izlažu svakoj ispitivanoj dozi. U svakom ispitivanju se obezbjeĐuju najmanje tri kontrolne grupe sa po 10 pčela po kavezu. Uključiti i dodatne kontrolne grupe ako se koriste nosači (tačka 1.5.4. ove metode).

1.6.2. Standard toksičnosti

U ispitivane serije uključuje se i studija toksičnosti standarda. Da bi se obuhvatila očekivana vrijednost LD50, odabrati najmanje tri doze standardna. Najmanje tri grupe po 10 pčela u svakom kavezu se izlažu svakoj dozi standarda. Kao standard toksičnosti koristi se dimetoat, čija se LD_{50} nakon 24 sata peroralne primjene kreće u opsegu od 0,10 µg do 0,35 µg a.s./pčeli. Prihvatljivi su i drugi standardi toksičnosti, pod uslovom da se rapolaže dovoljnom količinom podataka o očekivanoj doznoj zavisnosti (npr. paration).

1.6.3. Izlaganje

1.6.3.1. Primjena doza

Svakoj od ispitivanih grupa pčela obezbjediti 100 µl do 200 µl 50%-nog vodenog rastvora saharoze koji sadrži određenu koncentraciju ispitivane supstance. Ako se ispituju slabo rastvorljiva, netoksična ili jedinjenja koja se u komercijalnom proizvodu nalaze u niskim koncentracijama, primjeniti veću zapreminu, jer njihov udio u rastvoru saharoze mora biti veći. Pratiti količinu tretirane hrane koju je konzumirala svaka od ispitivanih grupa. Kada ispitivane jedinke pojedu tretiranu hranu (obično u toku 3 do 4 sata), hranilicu ukloniti iz kaveza i zamijeniti je drugom koja sadrži samo rastvor saharoze. Rastvor saharoze pčelama se stavlja na rapolaganje ad libitum. Kod nekih jedinjenja u višim koncentracijama, pčele tretiranu hranu mogu odbijati, što dovodi do toga da pojedu malo hrane ili je ne pojedu uopšte. Nakon najviše 6 sati hranilica sa ostacima tretirane hrane zamijeniti netretiranom rastvorom saharoze. Procjeniti koliko je tretirane hrane konzumirano (npr. mjerenjem odnosa zapremine ili mase ostataka tretirane hrane).

1.6.3.2. Dužina ispitivanja

Preporučuje se da, nakon što se ispitivani rastvor zamijeni netretiranim rastvorom saharoze, ispitivanje traje 48 sati. Ako se registruje rast smrtnosti nakon prva 24 sata za više od 10%, ispitivanje se produžava do najviše 96 sati, pod uslovom da smrtnost u kontrolisanim grupama ne prelazi 10%.

1.6.4. Zapažanja

Smrtnost se bilježi 4 sata nakon početka ispitivanja, zatim nakon 24 sata i 48 sati (nakon primjene doze). Ukoliko se ukaže potreba da se ispitivanje produži, dalje procjene vršiti u 24-satnim intervalima, najduže do ukupno 96 sati, pod uslovom da smrtnost u kontrolisanim grupama ne prelazi 10%.

Utvrditi količinu hrane koju je svaka grupa pčela konzumirala. Poređenje brzine konzumacije tretirane i netretirane hrane unutar određenog šestosatnog perioda daje podatke o ukusu tretirane hrane. Zabilježiti sve pojave neuobičajenog ponašanja tokom ispitivanja.

1.6.5. Granična studija

U nekim slučajevima (npr. kada se očekuje da je ispitivana supstanca netoksična) postavi se granična studija, upotrebom 100 µg a.s./pčeli, da bi se pokazalo da LD_{50} prelazi ovu vrijednost. Koristiti isti postupak, uključujući tri ispitivane grupe (replike) koje će se izložiti dozi, relevantne kontrolne grupe, procjenu konzumirane količine tretirane hrane i upotrebu

standarda toksičnosti. Ukoliko dođe do uginuća pčela, ispitivanje izvesti u cjelosti, a bilježe se i subletalni efekti (tačka 1.6.4. ove metode).

2. Podaci i izvještaj

2.1. Podaci

Podaci se prikazuju u tabelarnoj formi. Za svaku ispitivanu grupu, bilo da je u pitanju kontrolna ili grupa standardne toksičnosti, navodi se broj ispitivanih jedinki, smrtnost u svakom izabranom trenutku opažanja, kao broj pčela sa neželjenim promjenama u ponašanju. Podaci o smrtnosti se analiziraju pogodnim statističkim metodama (npr. probit-analizom, lutajućom srednjom vrijednošću, binomnom vjerovatnoćom). Grafički prikazati krive dozne zavisnosti za svaki preporučeni sat posmatranja, izračunati nagib krive i srednju letalnu dozu (LD_{50}) sa 95% intervalom povjerenja. Ispravke vezane za smrtnost u kontrolnoj grupi se rade pomoću Abotove korekcije. Ako tretirana hrana nije u potpunosti konzumirana, odrediti dozu ispitivane supstance koju je zaista konzumirala svaka grupa. LD50 izraziti u µg ispitivane supstance po pčeli.

2.2. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke: 1) ispitivana supstanca:
- fizičke osobine i relevantna fizička i hemijska svojstva (npr. postojanost u vodi, napon pare); - podaci od značaja za hemijsku identifikaciju supstance, uključujući strukturnu formulu, čistoću

(npr. ako se radi o pesticidima, generički naziv i koncentraciju aktivnih supstanci). 2) ispitivana vrsta:
- latinski naziv, rod, približna starost (u nedjeljama), metoda prikupljanja, datum prikupljanja; - podaci o kolonijama iz kojih su sakupljene pčele, uključujući zdravstveno stanje u tim kolonijama, postojanje bilo kakve bolesti odraslih primjeraka, bilo kakav prethodni tretman, itd. 3) uslovi u toku ispitivanja:
- temperatura i relativna vlažnost u laboratorijai;
- uslovi smještaja ispitivanih jedinki, uključujući vrstu, veličinu kaveza i materijal od kojeg su napravljeni;
- metode pripreme osnovnog i ispitivanih rastvora (ukoliko se koristi nosač, mora se navesti vrsta i koncentracija);
- postavka ispitivanja, npr. broj korišćenih koncentracija i broj kontrola (broj kaveza replikata i broj pčela po kavezu za svaku koncentraciju i kontrolu); - datum ispitivanja. 4) rezultati:
- rezultati preliminarnog ispitivanja za određivanje opsega doza, ako je rađeno;
- neobrađeni podaci - smrtnost u svakoj od ispitivanih koncentracija, u svakom satu opažanja;
- grafički prikaz krive dozne zavisnosti na kraju ispitivanja;
- vrijednosti LD_{50}, sa 95% intervalom povjerenja, u svakom od preporučenih momenata opažanja, za ispitivanu supstancu i toksični standard; - statističke metode korišćene za određivanje LD_{50};
- smrtnost u kontrolama;
- drugi primkećeni ili izmjereni biološki odgovori i bilo kakvo neuobičajeno ponašanje pčela (uključujući odbijanje hrane tretirane ispitivanom dozom), brzina potrošnje hrane u tretiranim i netretiranim grupama;
- bilo kakvo odstepene od postupka ovde opisane metode ispitivanja i bilo kakvi drugi važni podaci.

1. Metoda ispitivanja

Metoda ispitivanja akutne kontaktne toksičnosti se zasniva na OECD TG 214 (1998) uputstvu ispitivanja. Ispitivanje toksičnosti je laboratorijaska metoda dizajnirana za procjenu akutne kontaktne toksičnosti sredstava za zaštitu bilja i drugih hemikalija na odrasle pčele-radilice.

Postupak procjene i vrednovanja toksičnih osobina supstanci zahtijeva utvrĐivanje akutne kontaktne toksičnosti kod pčela, npr. u slučajevima kada je vjerovatno da će pčele biti izložene datoj hemikaliji. Ispitivanje akutne kontaktne toksičnosti izvodi se da bi se utvrdila svojstvena toksičnost pesticida i drugih hemikalija na pčele. Rezultati ovog ispitivanja koriste se za utvrĐivanje potrebe za daljim postepenem. Ova metoda je posebno pogodna kod etapnih programa za procjenu opasnosti koju pesticidi predstavljaju za pčele, na osnovu hijerarhijskog redosleda, od laboratorijaskih ispitivanja toksičnosti, do poluterenskih i terenskih ispitivanja[51]. Pesticidi se ispituju kao aktivne supstance (u daljem tekstu: a.s.) ili kao formulisani proizvodi.

Osjetljivost pčela i preciznost postupka ispitivanja se potvrđuje primjenom standardnih toksičnih supstanci.

1.2. Definicije

Akutna kontaktna toksičnost su štetne poslijedice koje se javljaju najkasnije 96 sati nakon kontaktne primjene jednokratne doze ispitivane supstance.

Doza je količina primjenjene ispitivane supstance i izražava se kao masa (mg) ispitivane supstance po jedinki (µg/pčele).

Kontaktna LD_{50} (srednja letalna doza) je statistički izvedena jednokratna doza supstance koja izazva smrt 50% životinja koje doĐu u kontakt sa njom. Vrijednost LD_{50} izražava se u (mg) ispitivane supstance po pčeli. Ako se ispituje dejstvo pesticida, ispitivana supstanca je aktivna supstanca ili formulisani proizvod koji sadrži jednu ili više aktivnih supstanci.

Smrtnost je slučaj kada je jedinka potpuno nepomična i smatra se uginulom.

1.3. Princip metode

Odrasle pčele radilice (Apis melifera) izlažu se seriji doza ispitivane supstance, rastvorene u odgovarajućem nosaču, direktnim nanošenjem (kapljica) na grudni koš. Ispitivanje traje 48 sati. Ukoliko između 24 i 48 sata stopa smrtnosti raste, a u kontrolnoj grupi i dalje ostaje na prihvatljivom nivou, tj. < 10%, primjereno je produžiti trajanje ispitivanja do najviše 96 sati. Smrtnost se bilježi svakodnevno u toku najmanje 48 sati i poredi sa kontrolisanim vrijednostima. Rezultati ispitivanja se analiziraju, da bi se se izračunala vrijednost LD_{50} nakon 24 i 48 sati, a u slučaju da je ispitivanje produženo i nakon 72 sata i 96 sati.

1.4. Kriterijumi prihvatljivosti ispitivanja

Da bi ispitivanje bilo prihvaćeno, zadovoljavaju se sljedeći uslovi:

[51] Testing Method B.44. Skin Absorption: In vivo Method

- prosječna smrtnost u kontrolnoj grupi ne prelazi 10% na kraju ispitivanja; - LD_{50} standarda toksičnosti se nalazi u određenom opsegu.

1.5. Opis metode

1.5.1. Sakupljanje pčela

Koriste se mlade odrasle pčele radilice istog roda, tj. pčele jednake starosti, stanja uhranjenosti itd. Pčele se nabavljaju iz adekvatno hranjenih, zdravih kolonija, bez zabilježenih bolesti ustrojenih po hijerarhijskom principu matice, poznatog pedigrea i fiziološkog statusa. Sakupljaju se onog jutra kada se planira početak ispitivanja, ili prethodno veče, pa se do sjutradan drže u uslovima koji će vladati u toku ispitivanja. Prikladne su pčele sakupljene sa okvira na kojima nema jaja. Sakupljanje pčela u rano proljeće ili kasnu jesen izbjegavati, jer je njihova fiziologija u to vrijeme promijenjena. Ako se ispitivanje sprovodi u rano proljeće ili kasnu jesen, pčele se mogu izleći u inkubatoru i othraniti nedelju dana "pčelinjim hlebom" (polenom sakupljenim iz saća) i rastvorom saharoze. Pčele tretirane hemijskim supstancama (antibiotici, proizvodi za uništavanje Varroa grinja) se ne koriste za ispitivanje toksičnosti četiri nedelje nakon završetka posljednjeg tretmana.

1.5.2. Uslovi smještaja i ishrane Koriste se kavezi koji se lako čiste i dobro provjetravaju, od bilo kog prikladnog materijala, npr. nerĐajućeg čelika, žičane mreže, plastike i drveni kavezi za jednokratnu upotrebu, itd. 10 pčela po kavezu. Veličina kaveza je primjerena broju pčela, kako bi im se pružio odgovarajući prostor.

Pčele držati u tamnoj laboratorijai na temperaturi od (25 ± 2) °C. Relativnu vlažnost, koja uobičajeno iznosi oko 50% do 70%, bilježiti u toku trajanja cijelog ispitivanja. Postupci rukovanja, uključujući tretman i bileženje zapažanja, se obavljaju na dnevnom svijezemljištu. Kao hrana se koristi vodeni rastvor saharoze, krajnje koncentracije od 500 g/l (50% odnosa težine i zapremine, w/v). Nakon što su date doze, hranu davati neograničeno (ad libitum), koristeći hranilicu za pčele. Za tu namjenu se koristi i staklena cijevčica (dužine oko 50 mm, širine 10 mm, sa otvorenim krajem koji se sužava do prečnika od oko 2 mm).

1.5.3. Priprema pčela

Da bi se omogućilo nanošenje ispitivane supstance, sakupljene pčele se anesteziraju ugljendioksidom ili azotom. Količinu upotrijebljenog anestetika i trajanje anestezije svesti na najmanju moguću mjeru. Pčele na umoru prije početka ispitivanja odbaciti i zamijeniti zdravim.

1.5.4. Priprema doza

Ispitivanu supstancu primjeniti kao rastvor u nosaču, tj. rastvorenu u organskom rassupstancaaču ili vodi, uz sredstvo koje osigurava vlažnost. Kada je reč o organskom rassupstancaaču, koristi se aceton, ali se upotrebljavaju i drugi, po pčele netoksični organski rassupstancaači (npr. dimetilformamid, dimetilsulfoksid). Rastvori se lakše nanose ako se pripreme u blagom rastvoru komercijalnog sredstva koje osigurava vlažnost (Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween). Riječ je o komercijalnim proizvodima dispergovanim u vodi i visokopolarnim organskim supstancama koje se nerassupstancaaju u organskim rassupstancaačima.

Pripremiti i pogodne kontrolne rastvore, tj. kod ispitivanja gdje se za rastvaranje ispitivane supstance koristi rassupstancaač ili disperziono sredstvo, koristiti dvije odvojene kontrolne grupe, jednu tretiranu vodom i drugu tretiranu rastvračem/disperzionim sredstvom.

1.6. Postupak

1.6.1. Ispitivane i kontrolne grupe

Broj ispitivanih doza i njihovih replika zadovoljava statističke zahtjeve u pogledu određivanja LD_{50} u intervalima povjerenja od 95%. Obično se ispitivanje postavlja sa pet doza ispitivane supstance, u geometrijskoj seriji, sa faktorom ne većim od 2,2 tako da bude obuhvaćen opseg potreban za određivanje LD_{50}. Faktor razblaženja i broj koncentracija za doziranje se određuju prema nagibu krive toksičnosti (doza prema smrtnosti), vodeći računa o zahtjevima statističke metode odabrane za analizu rezultata. Preliminarna studija u cilju utvrĐivanja opsega ispitivanih koncentracija omogućava pravilan izbor ispitivanih koncentracija. Minimalno tri grupe replika, svaka po deset pčela, izložiti dozama ispitivane supstance.

U svakom ispitivanju obezbjediti najmanje tri kontrolne grupe sa po 10 pčela. Ako je korišćen neki organski rassupstancaač ili sredstvo koje osigurava vlažnost, uključiti još tri dodatne kontrolne serije sa po 10 pčela u svakoj od njih, koje će se tretirati samo rassupstancaačem, odnosno samo agensom koji osigurava vlažnost.

1.6.2. Standard toksičnosti

U ispitivane serije se uključuje i ispitivanje toksičnosti standarda. Da bi se obuhvatila očekivana vrijednost LD_{50}, odabrati najmanje tri doze standarda. Najmanje tri grupe po 10 pčela u svakom kavezu se izlažu svakoj dozi standarda. Kao standard toksičnosti koristi se dimetoat, čija se LD_{50} nakon 24 sata peroralne primjene kreće u opsegu od 0,10 mg do 0,35 mg a.s./pčeli[52]. Koriste se i drugi standardi toksičnosti, pod uslovom da se rapolaže dovoljnom količinom podataka o očekivanoj doznoj zavisnosti (npr. paration).

1.6.3. Izlaganje

1.6.3.1. Primjena doza

Anestezirane pčele, svaka individua pojedinačno, tretiraju se ispitivanom supstancom. Pčele se grupišu slučajnim rasporedom u ispitivane i kontrolne grupe i tretiraju različitim dozama ispitivane supstance. Po 1 ml rastvora koji sadrži ispitivanu supstancu u datoj koncentraciji nanijeti mikroaplikatorom na dorzalnu stranu toraksa svake jedinke. Ako za to postoji opravdanje, upotrijebiti i druge zapremine ispitivane supstance. Nakon nanošenja ispitivane supstance, pčele se stavljaju u kaveze i obezbjedi im se rastvor saharoze.

1.6.3.2. Dužina ispitivanja

Preporučuje se da ispitivanje traje 48 sati. Ukoliko smrtnost između 24 i 48 sata nastavi da raste za više od 10%, ispitivanje se produžava do najviše 96 sati, pod uslovom da smrtnost u kontrolisanim grupama ne prelazi 10%.

1.6.4. Zapažanja

[52] OECD, (2002) Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris

Smrtnost se bilježi 4 sata nakon primjene ispitivane supstance, pa nakon 24 sata i 48 sati. Ukoliko se ukaže potreba da se ispitivanje produži, naredne procjene obaviti u 24-satnim intervalima, najduže do ukupno 96 sati, pod uslovom da smrtnost u kontrolisanim grupama ne prelazi 10%. Zabilježiti sve pojave neuobičajenog ponašanja tokom ispitivanja.

1.6.5. Granična studija

U nekim slučajevima (npr. kada se očekuje da je ispitivana supstanca netoksična) uradi se granična studija upotrebom 100 mg a.s./pčeli da bi se pokazalo da LD_{50} prelazi ovu vrijednost. Koristiti isti postupak, uključujući tri ispitivane grupe (replike) koje se izlažu dozi, relevantne kontrolne grupe, procjenu konzumirane količine tretirane hrane i upotrebu standarda toksičnosti. Ukoliko dođe do uginuća pčela, ispitivanje izvesti u cjelosti. Ako se uoče subletalni efekti (tačka 1.6.4. ove metode) zabilježiti ih.

2. Podaci i izvještaj

2.1. Podaci

Podaci se prikazuju u tabelarnoj formi. Za svaku ispitivanu grupu, bilo da je u pitanju kontrolna ili grupa standardne toksičnosti, navodi se broj ispitivanih jedinki, smrtnost u svakom izabranom trenutku opažanja, kao broj pčela sa neželjenim promjenama u ponašanju. Podaci o smrtnosti se analiziraju pogodnim statističkim metodama (npr. probit-analizom, lutajućom srednjom vrijednošću, binomnom vjerovatnoćom)[53]. Grafički prikazati krive dozne zavisnosti za svaki preporučeni sat posmatranja, izračunati nagib krive i srednju letalnu dozu (LD_{50}) sa 95% intervalom povjerenja. Ispravke vezane za smrtnost u kontrolnoj grupi se rade pomoću Abotove korekcije. Ako tretirana hrana nije u potpunosti konzumirana, odrediti dozu ispitivane supstance koju je zaista konzumirala svaka grupa. LD_{50} izraziti u µg ispitivane supstance po pčeli.

2.2. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o: 1) ispitivanoj supstanci:
- fizičke osobine i relevantna fizička i hemijska svojstva (npr. postojanost u vodi, napon pare); - podatke od značaja za hemijsku identifikaciju supstance, uključujući strukturnu formulu, čistoću

(npr. ako se radi o pesticidima, generički naziv i koncentraciju aktivnih supstanci). 2) ispitivanoj vrsti:
- latinski naziv, rod, približna starost (u nedjeljama), metoda prikupljanja, datum prikupljanja; - podatke o kolonijama iz kojih su sakupljene pčele, uključujući zdravstveno stanje kolonija, prisustvo bolesti kod odraslih primjeraka, bilo kakav prethodni tretman, itd. 3) uslovima tokom ispitivanja:
- temperatura i relativna vlažnost u laboratorijai;
- uslovi smještaja ispitivanih jedinki, uključujući vrstu, veličinu kaveza i materijal od kojeg su napravljeni;
- metode primjene ispitivane supstance, npr. korišćen rassupstancaač-nosač, primjenjena zapremina rastvora, korišćeni anestetici;

[53] OECD, (2000) Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris I Kemppainen B.W. and Reifenrath W.G., (1990) Methods for skin absorption. CRC Press, Boca
Raton

- postavka ispitivanja, npr. broj korišćenih koncentracija i broj kontrola (broj kaveza replikata i broj pčela po kavezu za svaku koncentraciju i kontrolu); - datum ispitivanja.

4) rezultatima:

- rezultati preliminarnog ispitivanja za određivanje opsega doza, ako je rađena;
- neobrađeni podaci - smrtnost u svakoj od ispitivanih koncentracija, u svakom satu opažanja;
- grafički prikaz krive dozne zavisnosti na kraju ispitivanja
- vrijednosti LD_{50}, sa 95% intervalom povjerenja, u svakom od preporučenih momenata opažanja, za ispitivanu supstancu i toksični standard; - statističke metode korišćene za određivanje LD_{50};
- smrtnost u kontrolama;
- drugi biološki odgovori i bilo kakvo neuobičajeno ponašanje pčela;
- bilo kakvo odstepene od postupka ovde opisane metode ispitivanja i drugi bitni podaci.

C.18. ADSORPCIJA /DESORPCIJA POMOĆU METODE RAVNOTEŽNOG STANJA

DIO I

1. Metoda ispitivanja

Adsorpcija /desorpcija pomoću metode ravnotežnog stanja se zasniva na OECD TG 106 uputstvu ispitivanja, u dijelu koji se odnosi na utvrđivanje adsorpcije/desorpcije na čestice zemljišta pomoću metode ravnotežnog stanja.

1.1 Uvod

Studije adsorpcije/desorpcije korisne su kao izvor ključnih podataka o kretanju hemikalija i njihovoj raspodjeli u zemljištu, vodi i vazduhu kao djelovima biosfere. Podaci se koriste za predviđanje i utvrđivanje, npr. dostupnosti hemikalije za razgradnju, njene transformacije i unosa u organizme, ispiranja i proceđivanja kroz različite profile zemljišta, isparavanja iz zemljišta i oticanja sa zemljišnih površina u vode. Podaci o adsorpciji se koriste za poređenje i modelovanje.

Raspodjela hemikalije između čvrste i tečne faze složen je proces, koji zavisi od brojnih različitih faktora: hemijske prirode supstance karakteristika zemljišta i klimatskih faktora kao što su padavine, temperatura, sunčeva svijetlost i vjetar. Zbog toga se brojne pojave i mehanizmi uključeni u proces adsorpcije hemikalija u zemljištu ne mogu u potpunosti definisati pojednostavljenim laboratorijaskim modelom, kakav predstavlja ova metoda. Iako ovaj pokušaj ne pokriva sve slučajeve koji se u prirodi događaju, on pruža vrijedne podatke o ekološkom značaju procesa adsorpcije hemikalije.

1.2 Oblast primjene

Adsorpcija /desorpcija pomoću metode ravnotežnog stanja se koristi za procjenu ponašanja hemikalije u različitim zemljištima, u smislu njene adsorpcije/desorpcije na čestice zemljišta.

Cilj je dobijanje sorpcione vrijednosti koja se koristi za predviĐanje raspodjele supstance u različitim ekološkim uslovima. Dosadašnjim istraživanjima utvrĐeno je da su ravnotežni adsorpcioni koeficijenti hemikalije u različitim tipovima zemljišta u funkciji karakteristika zemljišta (npr. sadržaj organskog ugljenika, ilovače, tekstura i pH vrijednost zemljišta). Da bi se u najširem smislu obuhvatile sve interakcije određene supstance i različitih tipova zemljišta prirodnog porijekla, za ispitivanje se koriste različiti tipovi uzoraka zemljišta.

U okviru ove metode, adsorpcija predstavlja proces vezivanja hemikalije za površine zemljišta. Njome se ne mogu utvrditi razlike između različitih procesa adsorpcije (fizička i hemijska adsorpcija), niti procesi poput površinski katalizirane razgradnje, masivne adsorpcije i hemijske reakcije.

Adsorpcija na koloidne čestice (prečnika < 0,2 μm) koje ssupstancaa zemljište nije uzeta u obzir.

Svojstva zemljišta za koja su najvažnija za adsorpciju su: - sadržaj organskog ugljenika u zemljištu ; - sadržaj ilovače u zemljištu i tekstura zemljišta i - pH vrijednost jedinjenja podložnih jonizaciji.

Druga svojstva zemljišta koja imaju uticaja na adsorpciju/desorpciju određene supstance su:

- efektivni kapacitet izmjene katjona (Effective Cation Exchange Capacity, u daljem tekstu: ECEC);
- sadržaj amorfnog gvožĐa i aluminijumovih oksida, pogotovo u vulkanskim i tropskim zemljištima i
- specifična površina zemljišta.

Metoda ispitivanja je osmišljena tako da omogući vrednovanje adsorpcije hemikalije na različite vrste zemljišta, u odnosu na sadržaj ugljenika, ilovače, teksturu, kao i pH vrijednost. Ispitivanje obuhvata tri etape:

1) prva etapa je preliminarna studija kojom se utvrđuje:

- odnos zemljišta i rastvora;
- vrijeme potrebno za dostizanje ravnotežnog stanja adsorpcije;
- količina ispitivane supstance koja se adsorbovala u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja;
- adsorpcija ispitivane supstance na površine posuda i stabilnost ispitivane supstance za vrijeme trajanja ispitivanja;

2) druga etapa je skrining test:

- adsorpcija se proučava na pet različitih vrsta zemljišta (pomoću kinetike adsorpcije pri jednoj jedinoj koncentraciji i određivanjem koeficijenta raspodjele K_d i K_{oc}); 3) treća etapa:
- određivanje Frojndlihovih adsorpcionih izotermi radi utvrĐivanja uticaja koncentracije na stepen adsorpcije na čestice zemljišta (studija desorpcijena osnovu kinetike desorpcije/Frojndlihove desorpcione izoterme - Dio II ove metode).

1.3. Definicije i mjerne jedinice

Simbol	Definicija	Jedinica
At_i	procenat adsorpcije u vremenu t_i	%
A_{eq}	procenat adsorpcije kod ravnotežnog stanja adsorpcije	%
$_m ads_s t_i$	masa ispitivane supstance adsorbovane na zemljište u vremenu t_i	g
$_m ads_s \square t_i$	masa ispitivane supstance adsorbovane na zemljište u vremenskom intervalu t_i	mg

$m_{eq}adseq$	masa ispitivane supstance adsorbovane na zemljište u ravnotežnom stanju adsorbcije	mg
m_0	masa ispitivane supstance u ispitivanoj posudi, na početku ispitivanja adsorpcije	mg
$m\ ads_m\ t_i$	masa ispitivane supstance izmjerena u alikvotima (V_a^A) u tački vremena t_i	mg
$m\ ads_{aq}\ eq$	masa supstance u rastvoru pri ravnotežnom stanju adsorpcije	mg
mzemljišta	količina zemljišne faze, izražena kao suva masa zemljišta	g
C_{st}	masena koncentracija osnovnog rastvora supstance	mg/cm^3
C_0	početna masena koncentracija ispitivanog rastvora u dodiru sa zemljištem	mg/cm^3
$m_{eq}adst_i$	masena koncentracija supstance u tečnoj fazi u vremenu t_i u kojem se obavlja analiza	mg/cm^3
$m\ ads_s\ eq$	sadržaj supstance adsorbovane na zemljište pri ravnotežnom stanju adsorbcije	mg/g
$m\ ads_s\ eq$	masena koncentracija supstance u tečnoj fazi pri ravnotežnom stanju adsorpcije	mg/cm^3
V_0	početna zapremina tečne faze u dodiru sa zemljištem za vrijeme ispitivanja adsorpcije	cm^3
v *aA*	zapremina alikvota u kojima se mjeri ispitivana supstanca	cm^3
K_d	koeficijent raspodjele adsorpcije	cm^3/g
K_{oc}	normalizovan koeficijent adsorpcije organskog ugljenika	cm^3/g
Kom	normalizovan koeficijent raspodjele organske materije	cm^3/g
K ads_F	Frojndlihova adsorpciona konstanta	g1-1/n (cm3)1/n g-1
l/n	Frojndlihov eksponent	/
Dt_i	procenat desorpcije u vremenu t_i	%
$D\Delta t_i$	procenat desorpcije u vremenskom intervalu Δt_i	%
Kdes	očigledni desorpciona konstanta	cm^3/g
K ads_F	Frojndlihova desorpciona konstanta	g1-1/n (cm3)1/n g-1
$m_{eq}des\ t_i$	masa ispitivane supstance desorbovane iz zemljišta u vremenu t_i	g
$m\ des_m\ \square t_i$	masa ispitivane supstance desorbovane iz zemljišta za vrijeme Δt_i	g
$m\ des_m\ eq$	masa supstance analitički određena u tečnoj fazi pri ravnotežnom stanju desorpcije	g
$m\ des_{aq}\ eq$	ukupna masa ispitivane supstance desorbovana pri ravnotežnom stanju desorpcije	g
$m\ des_s\ \square t_i$	masa supstance koja ostaje adsorbovana na zemljištu nakon vremenskog intervala Δt_i	g
m *aqA*	masa ostatka supstance nakon dostizanja ravnotežnog stanja adsorpcije zbog nepotpune zamjene zapremine	g

$_C des_s eq$	sadržaj ispitivane supstance koji je ostao adsorbovan na zemljište kod ravnotežnog stanja desorpcije	g/cm
$_C des_{aq} eq$	masena koncentracija ispitivane supstance u tečnoj fazi pri ravnotežnom stanju desorpcije	g/cm^3
V_T	ukupna zapremina tečne faze u dodiru sa zemljištem u toku kinetike desorpcije, urađena rednom metodom	cm^3
V_R	zapremina supernatanta uklonjenog iz epruvete (nakon uspostavljenog ravnotežnog stanja adsorpcije) i zamenjenog istom zapreminom 0,01 M rastvora $CaCl_2$	cm^3
V *aD*	zapremina alikvota uzetih u analitičke svrhe u vremenu (i), u toku studija kinetike desorpcije, urađene rednom metodom	cm^3
V *ir*	zapremina rastvora uzetog iz i epruvete za mjerenje ispitivane supstance, u studijama kinetike desorpcije (paralelna metoda)	cm^3
V *rF*	Zapremina rastvora uzetog iz epruvete za mjerenje ispitivane supstance, u trenutku uspostavljanja ravnotežnog stanja desorpcije	cm^3
MB	maseni balans	%
m_E	ukupna masa ispitivane supstance ekstrahovana iz zemljišta i sa zidova ispitivane posude u dve etape	g
Vrec	zapremina supernatanta uzetog nakon uspostavljanja ravnoteže adsorpcije	cm^3
Pow	koeficijent raspodjele u sistemu n-oktanol/voda	/
pK_a	konstanta disocijacije	/
S_w	rastvorljivost u vodi	g/L

1.4. Princip metode

Poznata zapremina rastvora ispitivane supstance neobilježene ili obilježene radioizotopom i zastupljene u 0,01 M rastvoru $CaCl_2$ u poznatim koncentracijama, dodaje se uzorcima zemljišta poznate suve mase, prethodno uravnoteženim u 0,01 M rastvoru $CaCl_2$. Smješa se dovoljno dugo protresa. Suspenzija zemljišta se zatim odvoji centrifugiranjem ili filtracijom, a zatim se tečna faza podvrgava analizi. Količina ispitivane supstance adsorbovana na uzorak zemljišta, iizračunava se kao razlika između količine ispitivane supstance koja se prvobitno nalazila u rastvoru i količine koja je ostala na kraju ispitivanja (indirektna metoda).

Adsorbovana količina ispitivane supstance određuje se i direktno, analizom zemljišta (direktna metoda). Ovaj postupak, koji uključuje postepenu ekstrakciju zemljišta odgovarajućim rassupstancaačem, koristi se u slučajevima kada se razlika u koncentraciji ispitivane supstance u rastvoru ne može tačno odrediti. Primjeri ovakvih slučajeva su: adsorpcija ispitivane supstance na površinu ispitivanih posuda, nestabilnost ispitivane supstance u vremenu potrebnom da se sprovede ispitivanje, slaba adsorpcija koja rezultira neznatnom promjenom koncentracije ispitivane supstance u rastvoru, ili jaka adsorpcija, koja rezultira tako niskom koncentracijom ispitivane supstance u rastvoru da se ne određuje tačno. Ako se ispitivana supstanca obilježi radioizotopom, ekstrakciju zemljišta se izbjegava analizom čvrste faze, sagorijevanjem i brojanjem pomoću tečnog scintilacionog brojača. Brojanje tečnim scintilacionim brojačem nespecifična je tehnika kojom se ne razlikuju početne supstance od produkata transformacije; pa se koristi isključivo ukoliko je ispitivana hemikalija stabilna u toku studije.

1.5. Podaci o ispitivanoj supstanci

Hemijski reagensi su analitičke čistoće. Upotrebljavaju se neobilježene ispitivane supstance poznatog sastava i hemijske čistoće od najmanje 95%, ili se upotrebljavaju radioizotopom obilježene ispitivane supstance poznatog sastava i radiološke čistoće. Ako se koriste kratko živeći radioizrastvori, učiniti korekcije s obzirom na njihovo vrijeme poluraspada.

Prije izvoĐenja ispitivanja adsorpcije/desorpcije koristiti sljedeće podatke o ispitivanoj supstanci: - rastvorljivost u vodi (Metoda A.6. koja je data u ovom pravilniku);
- napon pare ispitivane supstance (Metoda A.4. koja je data u ovom pravilniku), odnosno Henrijeva konstanta;
- abiotička razgradnja, odnosno hidroliza kao funkcija pH vrijednosti (Metoda C.7. koja je data u ovom prilogu);
- koeficijent raspodjele u sistemu n-oktanol/voda (Metoda A.8. koja je data u ovom pravilniku);
- brza biorazgradljivost (Metoda C.4. koja je data u ovom prilogu), odnosno aerobna i anaerobna transformacija u zemljištu;
- pK_a supstanci podložnih jonizaciji;
- direktna fotoliza u vodi (tj. UV-vis apsorpcioni spektar u vodi, kvantni doprinos) i fotorazgradnja na zemljištu.

1.6. Primjenljivost metode

Metoda ispitivanja je primjenljiva za ispitivanje hemijskih supstanci za koje je dostupna analitička metoda zadovoljavajuće tačnosti. Važan parametar, koji utiče na pouzdanost rezultata, posebno ako se koristi indirektna metoda, je stabilnost ispitivane supstance u vremenu potrebnom da se ispitivanje izvede. Kao preduslov za izvoĐenje ovakvog ispitivanja provjeriti stabilnost ispitivane supstance u preliminarnoj studiji. Ako se primjeti da je došlo do transformacije ispitivane supstance u vremenu potrebnom da se ispitivanje izvrši, glavno ispitivanje se izvodi tako da se analizira i čvrsta i tečna faza.

Teškoće se javljaju ako se ovom metodom ispituju supstance slabo rastvorljive u vodi (Sw od 10 g/l do 4 g/l), kao i supstance visokog naboja i to zbog toga što se koncentracije ovakvih supstanci u tečnoj fazi ne mogu dovoljno tačno analitički izmjeriti. U ovakvim slučajevima preduzeti dodatne korake. Uputstvo o tome kako riješiti ovakve probleme dato je u ovoj metodi.

Ako se ispituju isparljive supstance, preduzeti mjere opreza kako bi se u toku studije izbegli gubici.

1.7. Opis metode

1.7.1. Aparatura i hemijski reagensi

Oprema za ispitivanje sadrži standardnu laboratorijasku aparaturu, naročito: 1) kivete, odnosno posude u kojima će se izvesti ispitivanje i koje:
- staju direktno u centrifugu kako bi se greške nastale prilikom rukovanja i prenošenja uzoraka svele na minimum;
- budu od inertnog materijala, čime se adsorpcija ispitivane supstance na njihove površine svodi na najmanju moguću mjeru; 2) uređaj za miješanje
- dodatni vibracioni uređaj (shaker ili Vortex) ili ekvivalentna oprema (za vrijeme protresanja u uređaju zemljište mora ostati suspendovano); 3) centrifugu
- po mogućnosti velike brzine (npr. sile centrifugiranja> 3000 g), termostatirana, sposobna da iz vodenog rastvora ukloni čestice prečnika većeg od 0,2 μm. Tokom protresanja i

centrifugiranja posude za ispitivanje su zatvorene, da bi se izbjeglo isparavanje i gubitak vode. Upotrijebiti deaktivirane čepove (npr. navojni čepovi od teflona) kako bi se adsorpcija na čepove svela na minimum;

4) uređaj za filtraciju (opciono)

- filteri prečnika 0,2 µm, sterilni, za jednokratnu upotrebu. Posebnu pažnju posvetiti izboru materijala za filtere, kako bi se izbjegli gubici ispitivane supstance na njima. Za slabo rastvorljive ispitivane supstance ne koriste se filteri od organskog materijala;

5) analitički uređaji

- prikladni za mjerenje koncentracije ispitivane hemikalije;

6) laboratorijaska sušnica

- u stanju da održava temperaturu (termostat) od 103 °C do 110 °C.

1.7.2. Karakterizacija i izbor zemljišta

Zemljište se karakteriše sa tri parametra koji su u velikoj mjeri odgovorni za adsorpcijski kapacitet: sadržajem organskog azota, ilovače, teksturom zemljišta i pH vrijednošću. Kako je ranije napomenuto (dio 1.2. ove metode), na adsorpciju/desorpciju određene supstance utiču i druga fizička i hemijska svojstva, koja u ovakvim slučajevima treba uzeti u obzir.

Metode karakterizacije zemljišta od izuzetne su važnosti i imaju značajan uticaj na rezultate. PH zemljišta se mjeri u 0,01 M rastvoru $CaCl_2$ (rastvor koji se koristi pri ispitivanju adsorpcije/desorpcije) u skladu sa odgovarajućom ISO metodom (MEST ISO-10390-1). Ostala relevantna svojstva zemljišta odrediti u skladu sa standardnim metodama (npr. ISO "Priručnik za analizu zemljišta"). Radi kalibracije metoda ispitivanja zemljišta preporučljivo je koristiti referentna zemljišta.

Smjernice u pogledu izbora različitih tipova zemljišta za ispitivanje adsorpcije/desorpcije, date su u Tabeli 1. Sedam odabranih tipova zemljišta pokriva vrste zemljišta sa kojima se susreće u geografskim područjima umjerenog klimatskog pojasa. Ako se ispituju supstance podložne jonizaciji, odabrani tipovi zemljišta pokrivaju širok opseg pH vrijednosti, kako bi se vrednovala adsorpcija jonizovanog i nejonizovanog oblika supstance. Smjernice u pogledu toga koliko različitih tipova zemljišta se koristi u različitim fazama ispitivanja, date su u dijelu 1.9. ove metode.

Ako se prednost daje drugim vrstama zemljišta, označiti ih istim parametrima kao i zemljišta navedena u Tabeli 1, čak i ako u potpunosti ne zadovoljavaju kriterijume. Varijabilnost njihovih svojstava je jednaka.

Tabela 1: Smjernice u pogledu izbora uzoraka zemljišta za ispitivanje adsorpcije/desorpcije

Tip zemljišta	pH (u opseg 0, M 01 $CaCl_2$)	Sadržaj organskog ugljenika (%)	Sadržaj gline (%)	Tekstura zemljišta
1	4,5-5,5	1,0-2,0	65-80	glina
2	> 7,5	3,5-5,0	20-40	glinovita ilovača
3	5,5-7,0	1,5-3,0	15-25	muljevita ilovača
4	4,0-5,5	3,0-4,0	15-30	ilovača

5	< 4,0 - 6,0	< 0,5-1,5	< 10-15[l]	ilovačasti Pijesak
6	> 7,0	< 0,5-1,0	40-65	glinovita ilovača/ glina
7	< 4,5	> 10	< 10	Pijesak / ilovačasti Pijesak

1.7.3. Sakupljanje i čuvanje uzoraka zemljišta

1.7.3.1. Sakupljanje

Ne upotrebljava se posebnea tehnika ni alat za uzimanje uzorka zemljišta. Tehnika zavisi od cilja studije.

Uzeti u obzir:

- da je potrebno rapolagati detaljnim podacima o terenskom lokalitetu. Ovo uključuje lokaciju, biljni pokrivač, tretmane pesticidima, odnosno Đubrivima, biološke dodatke i slučajno zagaĐenje. U pogledu opisa lokaliteta sa koga se uzimaju uzorci, pridržavati se preporuka sadržanih u MEST ISO 10381-6 standardu za uzimanje uzoraka zemljišta;

- da se lokalitet sa kojeg se uzimaju uzorci definiše pomoću UTM mreže (Universal Transversal Mercator-Projection/ European Horizontal Datum), ili geografskih koordinata. Ovo omogućava da se uzorak zemljišta ubuduće ponovo uzme sa istog lokaliteta, ili pomaže da se zemljište definiše u različitim klasifikacionim sistemima, korišćenim u različitim zemljama. Uzorke zemljišta prikupljati isključivo iz horizonta A, na dubini do najviše 20 cm. Pogotovo ako se radi o zemljištu tipa br. 7. Ako u zemljištu kao integralni deo postoji sloj O_h, uzorak uzeti i iz ovog horizonta.

Uzorke zemljišta prevesti u kontejnerima i pod temperaturnim uslovima koji obezbjeđuju da se prvobitna svojstva zemljišta neće značajno promjeniti.

1.7.3.2. Skladištenje

Prednost se daje upotrebi uzoraka zemljišta neposredno uzetih sa terena. Samo u slučaju kada to nije moguće, uzorci zemljišta se skladište na ambijentalnoj temperaturi, s tim da se sprječava isušivanje na vazduhu. Preporuka u pogledu ograničenja trajanja skladištenja nema, ali se uzorci zemljišta skladišteni duže od tri godine prije upotrebe ponovo analiziraju, kako bi se utvrdio sadržaj ugljenika, pH i CEC.

1.7.3.3. Rukovanje uzorcima zemljišta i njihova priprema za ispitivanje

Uzorke zemljišta osušiti na vazduhu, na ambijentalnoj temperaturi (između 20°C i 25 °C). Uzorke zemljišta rastresti, primjenom najmanje moguće sile, da se što je manje moguće promjeni izvorna tekstura zemljišta. Uzorci zemljišta se prosijavaju do čestica veličine ≤ 2 mm. Kod procesa prosijavanja, pridržavati se preporuka sadržanih u MEST ISO 10381-6 standardu za uzimanje uzoraka zemljišta. Uzorci se pažljivo homogenizuju, jer to poboljšava ponovljivost rezultata. Sadržaj vlage u svakom tipu zemljišta određuje se u tri alikvota, sušenjem na 105 °C dovoljno dugo dok značajne promjene u težini više nema (oko 12 sati). U svim iizračunavanjima pojam mase zemljišta odnosi se na u sušilici postignutu suvu masu, tj. na težinu zemljišta korigovanu u odnosu na sadržaj vlage.

1.7.4. Priprema ispitivane supstance za nanošenje na zemljište

Ispitivana supstanca se rastvori u 0,01 M rastvoru $CaCl_2$ u destilovanoj ili dejonizovanoj vodi. Da bi se centrifugiranje poboljšalo, a izmjena katjona svela na najmanju mjeru, rastvor $CaCl_2$ se koristi kao tečna faza rassupstancaača. Koncentracija osnovnog rastvora je tri reda veličine veća od granice detekcije upotrijebljene analitičke metode. Ovakav prag obezbjeđuje tačnost mjerenja metodologijom uobičajenom za ovu metodu ispitivanja. Koncentracija osnovnog rastvora je niža od rastvorljivosti ispitivane supstance u vodi.

Osnovni rastvor pripremiti neposredno prije nanošenja na uzorke zemljišta i čuvati zatvoren u mraku na temperaturi od 4 °C. Trajanje skladištenja zavisi od stabilnosti ispitivane supstance i njene koncentracije u rastvoru. Samo kod teško rastvorljivih supstanci ($S_w < 10^{-4}$ g/l) postoji potreba za upotrebom adekvatnog sredstva koje olakšava rastvaranje ispitivane supstance. Ovo sredstvo: 1. se miješa sa vodom, kao što je to slučaj kod metanola ili acetonitrila,

2. njegova koncentracija ne prelazi 1% ukupne zapremine osnovnog rastvora, a udio je manji od onoga u rastvoru ispitivane supstance koja dolazi u dodir sa zemljištem (po mogućnosti manji

0,1%) i

3. nije surfaktant, niti podliježe solvolitičkim reakcijama sa ispitivanom hemikalijom.

U izvještaju navesti i opravdati upotrebu sredstva koje olakšava rastvaranje.

Druga mogućnost, koja stoji na rapolaganju kada su u pitanju teško rastvorljive supstance, je da se u sistem za ispitivanje supstanca doda režimom pulsacije. Ispitivana supstanca se rastvori u organskom rassupstancaaču, a potom se alikvot tog rastvora doda u sistem zemljišta i 0,01 M rastvor $CaCl_2$ u destilovanoj ili dejonizovanoj vodi. Udio organskog rassupstancaača u tečnoj fazi održavati što je moguće manjim, u uobičajenim okolnostima ne višim od 0,1%. Problem koji se pri ovakvom načinu rada javlja je nemogućnost da se pri sljedećem dodavanju ponovno doda ista zapremina. Ovakvo dodavanje ispitivane supstance iz organskog rastvora dovodi do dodatne greške, zbog toga što se dešava da koncentracije ispitivane supstance i dodatnog rassupstancaača u svim ispitivanjima ne budu iste.

1.8. Preduslovi za primjenu metode ispitivanja adsorpcije/desorpcije

1.8.1. Analitička metoda

U ključne parametre koji utiču na tačnost mjerenja adsorpcije spadaju: tačnost analitičke metode upotrijebljene za analizu rastvora i za analizu adsorbovane faze; stabilnost i hemijska čistoća ispitivane supstance; postizanje adsorpcione ravnoteže; veličina promjena u koncentraciji rastvora, odnos zemljišta i rastvora, kao i promjene u strukturi zemljišta do kojih je došlo u toku procesa dostizanja ravnoteže. Primjeri u kojima se daju podaci o tačnosti, navedeni su u Dijelu II ove metode.

Pouzdanost upotrijebljene analitičke metode se provjerava u opsegu koncentracija za koji je vjerovatno da će biti primjenjen u ispitivanju. Lice koje izvodi ispitivanje ima slobodu da razvije adekvatnu metodu, zadovoljavajuće tačnosti, preciznosti, ponovljivosti, granica detekcije i efikasnosti. Smjernice kako izvesti ovakvo ispitivanje navedene su u ovoj metodi.

Adekvatna zapremina 0,01 M rastvora $CaCl_2$, npr. 100 cm^3, protrese se u toku 4 sata sa nešto zemljišta, npr. 20 g zemljišta visoke moći adsorpcije, tj. visokog sadržaja ugljenika i ilovače. U zavisnosti od analitičkih potreba, ove težine i zapremine variraju, ali primjerenu ishodišnu tačku čini odnos zemljišta i rastvora od 1:5. Smješa se centrifugira, a tečna faza se i filtrira. Kako bi se postiglo da nominalna koncentracija ispitivane supstance bude unutar

opsega koncentracija za koji je vjerovatno da će u toku ispitivanja biti aktuelan, u tečnu fazu se dodaje izvjesna zapremina osnovnog rastvora ispitivane supstance. Ova zapremina ne prelazi 10% konačne zapremine tečne faze, kako bi promjena prirode rastvora kojom se rapolaže prije postizanja ravnotežnog stanja, bila što manja. Da bi se provjerilo da li u analitičkoj metodi postoje artefakti, kao i za efekte matriksa uzrokovanog zemljišta, ispitati i jedan kontrolni uzorak, koji se sastoji od sistema zemljišta i rastvora $CaCl_2$ (bez ispitivane supstance).

U analitičke metode koje se upotrebljavaju za mjerenja sorpcije, spadaju gasno-tečna hromatografija (gas-liquid chromatography, u daljem tekstu: GLC), tečna hromatografija visokih performansi (high-performance liquid chromatography, u daljem tekstu: HPLC), spektrometrija
(npr. GC/masena spektrometrija, HPLC/masena spektrometrija) i brojanje pomoću tečnih scintilacionih brojača (kod ispitivanja supstanci obleženim radioizotopom). Nezavisno od analitičke metode koja se upotrijebi, zadovoljavajuća efikasnost analitičke tehnike je između 90% i 110% nominalne vrijednosti. Da bi detekcija i vrednovanje uslijedili nakon raspodjele, granice detekcije upotrijebljene analitičke metode su najmanje dva reda veličine niže od nominalne koncentracije ispitivane supstance.

Svojstva i granice detekcije analitičke metode odabrane za proučavanje adsorpcije imaju važnu ulogu u definisanju ispitivanih uslova, kao i u cjelokupnoj postavci. Ova metoda slijedi opšti tok ispitivanja i daje preporuke i smjernice za alternativna rješenja kojima se pribjegava u slučajevima kada analitička metoda i opremljenost laboratorijae nameću izvjesna ograničenja.

1.8.2. Izbor optimalnog odnosa zemljište/rastvor

Izbor odnosa zemljišta i rastvora primjerenih za izučavanje sorpcije zavisi od koeficijenta raspodjele K_d, kao i od toga koji se relativni stepen adsorpcije želi postići. S obzirom na oblik jednačine adsorpcije i domet analitičke metodologije, pri odreĐivanju koncentracije hemikalije u rastvoru, statističku tačnost mjerenja određuje promjena te koncentracije. Stoga je u rutinskoj praksi korisno uspostaviti nekoliko fiksnih odnosa, pri kojima je procenat adsorpcije viši od 20%, a po mogućnosti i viši od 50%, pri čemu voditi računa da se koncentracija ispitivane supstance u tečnoj fazi održava dovoljno visokom da se tačno izmjeri. Ovo je naročito važno u slučaju kada se adsorpcija zbiva u visokim procentima.

Praktičan pristup izboru dobrog odnosa zemljište/voda ubazirajun je na utvrĐivanju K_d vrijednosti preliminarnim studijama ili utvrĐenim tehnikama (Dio IV ove metode). Adekvatan odnos izbora se na osnovu krive na kojoj je, za fiksne procente adsorpcije, odnos zemljišta i rastvora dat u odnosu na K_d (Slika 1). Ova kriva se bazira na pretpostavci da je jednačina adsorpcije linearna. Primjenljiv odnos se dobija prepravkom jednačine od K_d, u oblik jednačine: $C^{des}_{s}eq \square K_d \square C_{aq}^{des}eq$

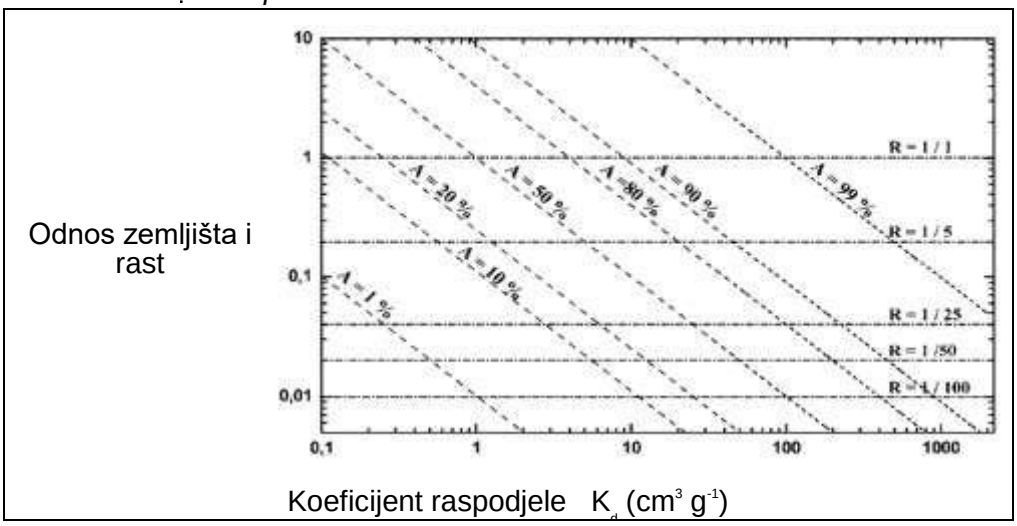
$m^{V0} \square \square \square \square \square mads^{m0}_{eq}1 \square \square \square K_d$ ili u njenom logaritamskom obliku, uz pretpostavku da je $R=$

$\frac{mzemljišta_{Vo}}{soil \square s}$

$\frac{Aeq\ \%}{100} \square \frac{m_s adseq}{m_0}$

$\square A^{eq}\ \%/100 \square$

$$\log R = -\log K_d \log \frac{}{1\ Aeq\ \%/100}$$



Slika 1: *Odnos zemljišta i rastvora i Kd pri različitim procentima adsorpcije ispitivane supstance* Potrebni odnosi količina zemljišta i rastvora dati su na Slici 1. kao funkcija K_d, i to pri različitim nivoima adsorpcije. Na primjer, pri odnosu zemljišta i rastvora od 1:5 i vrijednosti K_d od 20, adsorbovaće se približno 80% ispitivane supstance. Da bi se pri istom Kd dobila adsorpcija od 50%, upotrijebiti odnos od 1:25. Ovaj pristup izboru pogodnih odnosa zemljišta i rastvora istraživaču daje fleksibilnost potrebnu da zadovolji zahtjeve ispitivanja.

Teže rješiva je situacija kada se hemikalija dobro ili neznatno adsorbuje. Kad je adsorpcija slaba, upotrebljava se odnos zemljišta i rastvora od 1:1, iako kada su u pitanju neke izrazito organske vrste zemljišta, dobijanje žitkog, gustog rastvora iziskuje i manje odnose. Izabranom analitičkom metodologijom je potrebno izmjeriti male promjene u koncentraciji rastvora. U suprotnom bi mjerenje adsorpcije bilo netačno. Kako bi u rastvoru ostala značajna količina hemikalije, pri vrlo visokim koeficijentima raspodjele (K_d) odnos zemljišta i rastvora dolazi i do 1:100. Potrebno je dobro miješanje zemljišta i rastvora i sistem se ostavlja odgovarajuće vrijeme da se uravnoteži.

Alternativni pristup tome kako se nositi sa ovakvim ekstremnim slučajevima, za koje nema odgovarajuće metodologije, je da se vrijednost K_d predvidi primjenom tehnika procjene baziranim, npr. na vrijednostima K_{ow} (Dio IV ove metode). Ovo je korisno ako se ispituju neznatno adsorbovane/polarne hemikalije, čiji je K_{ow} < 20 kao i lipofilne/visokosorptivne hemikalije čija K_{ow} iznosi > 104.

1.9. IzvoĐenje metode 1.9.1. Uslovi ispitivanja Ispitivanja se izvode na ambijentalnoj

konstantnoj temperaturi u opsegu između 20 °C i 25 °C.

Uslovi pod kojima se centrifugira omogućavaju da se iz rastvora odstrane čestice veće od 0,2 μm. Ova donja granična vrijednost izabrana je ciljano, jer odgovara prečniku najmanje čestice koja se smatra čvrstom i predstavlja granicu između čvrstih i koloidnih čestica. Smjernice o tome kako odrediti uslove pod kojima će se centrifugirati date su u Dijelu V ove metode.

Ako raspoloživa oprema za centrifugiranje ne garantuje odstranjivanje čestica većih od 0,2 µm, primjenjuje se kombinacija centrifugiranja i filtracije. Da bi se izbjegli gubici ispitivane supstance bilo koje vrste, ovi filtri su od prikladnog inertnog materijala. Dokazati da u toku filtracije nije došlo ni do kakvih gubitaka ispitivane supstance.

1.9.2. Etapa 1: preliminarna studija

Cilj preliminarne studije naveden je u dijelu 1.2. ove metode. Smjernice o postavljanju ovakvog ispitivanja navedene su u ovoj metodi.

1.9.2.1. Izbor optimalnih odnosa količina zemljišta i rastvora

Koriste se dvije vrste zemljišta i tri odnosa količina zemljišta i rastvora (šest eksperimenata). Jedna vrsta zemljišta ima visok sadržaj organskog ugljenika i nizak sadržaj ilovače, a druga nizak sadržaj organskog ugljenika i visok sadržaj ilovače. Koriste se sljedeći odnosi:

- 50 g zemljišta i 50 cm^3 vodenog rastvora ispitivane supstance (odnos 1/1),
- 10 g zemljišta i 50 cm^3 vodenog rastvora ispitivane supstance (odnos 1/5), - 2 g zemljišta i 50 cm^3 vodenog rastvora ispitivane supstance (odnos 1/25).

Najmanja količina zemljišta na kojoj se eksperiment izvodi zavisi od opremljenosti laboratorijae i efikasnosti primjenjenih analitičkih metoda. Da bi se ispitivanjem dobili pouzdani rezultati, upotrebljava se 1 g, a po mogućnosti i 2 g uzorka zemljišta.

Da bi se provjerila stabilnost ispitivane supstance u rastvoru $CaCl_2$ i moguća adsorpcija na površine posude za ispitivanje, jedan kontrolni uzorak, u kom se nalazi samo ispitivana supstanca u 0,01 M rastvoru $CaCl_2$ (bez zemljišta) podvrgava se istim pokolonama kao i ispitivani sistemi. Istoj ispitivanoj proceduri podvrgava se i po jedna slijepa proba za svaki uzorak zemljišta, koju čini ista količina zemljišta i 0,01 M rastvora $CaCl_2$ (ali bez ispitivane supstance), ukupne zapremine od 50 cm^3. Tokom analize, ovaj uzorak služi kao osnovna kontrola koja omogućava otkrivanje interferentnih supstanci, ili zagaĐenih zemljišta.

Sva ispitivanja, uključujući i ona koji se obavljaju na kontrolama i slijepim probama, postaviti najmanje u duplikatu. Ukupan broj uzoraka koji se pripremaju za studiju iizračunavaju se prema metodologiji koja se primjenjuje.

Metode koje se primjenjuju u okviru preliminarne studije su iste kao metode koje se primjenjuju u glavnoj studiji, a izuzeci od tog pravila su navedeni. Uzorci zemljišta, osušeni na vazduhu, uravnotežuju se tako što se dan prije početka ispitivanja, u toku noći (12 sati) protresu zajedno sa najmanje 45 cm^3 0,01 M rastvora $CaCl_2$. Potom se dodaje izvjesna zapremina osnovnog rastvora, kako bi se dobila krajnja zapremina od 50 cm^3. Ova zapremina dodatog osnovnog rastvora:

1. ne prelazi 10% krajnje zapremine tečne faze od 50 cm^3, kako bi se priroda rastvora prije uravnoteženja što manje promijenila i
2. treba da postigne prvobitnu koncentraciju ispitivane supstance koja se nalazi u dodiru sa zemljištem (C_0) za najmanje dva reda veličine više od granice detekcije upotrijebljene analitičke metode.

Ovakav prag obezbjeĐuje tačna mjerenja čak i u slučajevima jake adsorpcije (> 90%), ali i naknadno određivanje adsorpcionih izotermi. Početna koncentracija ispitivane supstance (C_0) ne prelazi polovinu vrijednosti njene granične rastvorljivosti.

U ovoj metodi dat je primjer kako se iizračunava koncentracija osnovnog rastvora (C_{st}). Granica detekcije od 0,01 μg/cm^3 i adsorpcija od 90% se pretpostavljaju, pa početna koncentracija ispitivane supstance koja je u dodiru sa zemljištem iznosi 1 μg/cm^3 (da za dva reda veličine prelazi granicu detekcije analitičke metode). Uz pretpostavku da je dodata najviša preporučena zapremina osnovnog rastvora, tj. 5 cm^3 do 45 cm^3 0,01 M uravnoteženog rastvora $CaCl_2$ (= 10% osnovnog rastvora, dodate u vodenu fazu do ukupne zapremine od 50 cm^3), koncentracija osnovnog rastvora iznosi 10 μg/cm^3, jer tako prelazi granicu detekcije analitičke metode za tri reda veličine.

Vrijednost pH tečne faze se mjeri prije i nakon dodira sa zemljištem, jer je pH vrijednost značajna u cjelokupnom procesu adsorpcije, posebno supstanci podložnih jonizaciji.

Smješa se protrese dok se ne postigne adsorpciona ravnoteža. Vrijeme potrebno da se u zemljištu postigne ravnoteža je varijabilno i zavisi od hemikalije i zemljišta. Uglavnom je dovoljan period od 24 sata. U okviru preliminarnog ispitivanja, uzorci se kroz period miješanja od 48 sati prikupljaju redno (npr. 4-ti, 8-mi, 24. i 48. sat). Vremenski raspored obavljanja analize se razmotra fleksibilno, poštujući radno vrijeme i radni raspored laboratorijae.

Analiza ispitivane supstance u tečnoj fazi obavlja se na dva moguća načina - paralelnom i rednom metodom. Paralelna metoda sa ispitivanog gledišta je dugotrajnija i zamornija, a matematička obrada dobijenih rezultata je jednostavnija (Dio VI ove metode). Izbor metodologije koja se primjenjuje prepušta se licu koje izvodi ispitivanje, a koje pri donošenju odluke uzima u obzir opremljenost dostupne laboratorijae i resurse koji su joj stavljeni na rapolaganje.
1. Paralelna metoda - pripreme se uzorci međusobno istog količinskog odnosa zemljišta i rastvora, u broju koji odgovara broju vremenskih intervala u kojima se želi proučiti kinetika adsorpcije. Nakon centrifugiranja i filtracije, tečna faza prve kivete iznova se prikuplja u mjeri u kojoj je to moguće i izmjeri, npr. nakon 4 sata, tečna faza druge kivete nakon 8 sata, treće kivete nakon 24 sata, itd. 2. Redna metoda - za svaki količinski odnos zemljišta i rastvora pripremaju se najviše dva uzorka. U definisanim vremenskim razmacima, smješa se centrifugira da bi se faze razdvojile. Manji alikvot tečne faze odmah se analizira na prisustvo ispitivane supstance. Ispitivanje se nastavlja sa početnom smješom. Ako se nakon centrifugiranja primjenjuje filtracija, laboratorijaa mora biti adekvatno opremljena za postupak filtracije manjih tečnih alikvota. Da se odnos zemljišta i rastvora ne bi značajno promjenio i da bi se u toku ispitivanja umanjila masa rastvorene supstance podložna adsorpciji, preporučuje se da zapremina uzetih alikvota ne prelazi 1% zapremine rastvora.

Procenat adsorpcije At_i u svakoj od vremenskih tačaka (t_i) računa se na osnovu početne nominalne koncentracije i koncentracije izmjerene u vrijeme uzimanja uzorka (t_i), korigovane na vrijednost slijepe probe. Krive na kojima je At_i dat u funkciji vremena (Slika 1 u VI Dijelu ove metode) crtaju se da bi se utvrdilo vrijeme u kom je je postignut plato ravnotežnog stanja. Uz to se računa i vrijednost K_d u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja. Na osnovu te vrijednosti se iz krive date na Slici 1. izaberu adekvatni količinski odnosi zemljišta i rastvora sa ciljem da procenat adsorpcije pređe 20%, a po mogućnosti dostigne > 50%[61]. Sve primjenljive jednačine i sva načela koja važe za crtanje krivih, dati su u dijelu 2. ove metode, kao i u Dijelu šestom ove metode.

1.9.2.2. Određivanje trenutka u kom je postignuto ravnotežno stanje adsorpcije i količina supstance koja se adsorbovala

Krive At_i ili C^{ads}_{aq} u funkciji vremena omogućavaju utvrĐivanje ravnotežnog stanja adsorpcije, kao i količine ispitivane supstance koja se adsorbovala u trenutku postizanja ravnotežnog stanja. Primjeri krivih dati su na Slikama 1. i 2. koje su date u Dijelu VI ove metode.

Ako se pri eksperimentisanju sa određenom vrstom zemljišta ne doĐe do platoa, već se bilježi siguran porast adsorpcije, razlog biorazgradljivost, odnosno spora difuzija. Biorazgradljivost se potvrđuje ponavljanjem ispitivanja na sterilisanom uzorku zemljišta. Ako se ni u tom slučaju ne dostigne plato, lice koje izvodi ispitivanje traži druge pojave, potencijalno uključene u specifična istraživanja koja sprovodi, određenim modifikacijama ispitivanih uslova (temperature, trajanja protresanja, količinskog odnosa zemljišta i rastvora). Licu koje izvodi ispitivanje prepušta se odluka hoće li nastaviti ispitivanje, uprkos mogućnosti da ne uspije da postigne ravnotežno stanje.

1.9.2.3. Adsorpcija na površinu posude za ispitivanje i stabilnost ispitivane supstance

Podaci o adsorpciji ispitivane supstance na površinu posude za ispitivanje, kao i o njenoj stabilnosti, dobijaju se analizom kontrolnih uzoraka. Osiromašenje sadržaja ispitivane supstance veće od standardne greške analitičke metode je povezano sa abiotičkom razgradnjom, odnosno adsorpcijom na površinu posude za ispitivanje. Razlikovanje ove dvije pojave postiže se pranjem zidova posude poznatom zapreminom rassupstancaača i analiziranjem rastvora za pranje na prisustvo ispitivane supstance. Ako na površini posude za ispitivanje doĐe do adsorpcije, osiromašenje ukazuje na abiotičku nestabilnost ispitivane supstance. Ako je došlo do adsorpcije, postojeće posude za ispitivanje zamijeniti onima od drugačijeg materijala. Podaci o adsorpciji dobijeni ovim ispitivanjem ne mogu se ekstrapolisati na metodu koja se tiče količinskog odnosa zemljišta i rastvora. Na ovu adsorpciju utiče prisustvo zemljišta.

Dodatni podaci o stabilnosti ispitivane supstance dobijaju se određivanjem prvobitnog masenog balansa, praćenog u toku vremena. Tečna faza, ekstrakti zemljišta i zidovi posude za ispitivanje se analiziraju na prisutnost ispitivane supstance. Razlika u masi dodate ispitivane hemikalije i zbira njenih hemijskih masa u tečnoj fazi, ekstraktima zemljišta i zidovima posude za ispitivanje, jednaka je razgraĐenoj, odnosno uparenoj, odnosno neekstrahovanoj masi supstance. Da bi se odredio maseni balans u toku ispitivanja potrebno je postići ravnotežno stanje adsorpcije.

Maseni balans se određuje na zemljištima i za onaj količinski odnos zemljišta i rastvora koji u određenom tipu zemljišta dovodi do osiromašenja sadržaja ispitivane supstance za više od 20%, po mogućnosti > 50% u ravnotežnom stanju. Kada se ispitivanje, usmjereno na pronalaženje najpovoljnijeg količinskog odnosa zemljišta i rastvora koji je potrebno upotrijebiti u glavnom ispitivanju, nakon 48 sati završi analizom posljednjeg uzorka tečne faze, faze se dijele centrifugiranjem i po potrebi filtracijom. Tečna faza se sakuplja u mjeri u kojoj je to moguće, a zatim se zemljištu dodaje adekvatan ekstrakcioni rassupstancaač (koeficijenta ekstrakcije od najmanje 95%), kojim se iz zemljišta ekstrahuje ispitivana supstanca, najmanje dvije uzastopne ekstrakcije. Zatim se odredi količina ispitivane supstance u ekstraktima dobijenim iz zemljišta i posuda za ispitivanje i izračuna maseni balans. Ako količina ispitivane supstance iznosi manje od 90%, ispitivana supstanca će biti nestabilna. Istraživanja se nastavljaju vodeći računa o nestabilnosti ispitivane supstance u ovom slučaju se u okviru glavne studije preporučuje analiza obije faze.

1.9.3. Etapa 2: Kinetika adsorpcije pri jedinoj koncentraciji ispitivane supstance

Koristi se pet tipova zemljišta, izabranih iz Tabele 1. Zemljišta korišćena već u preliminarnoj studiji nije potrebno ponovo ispitivati u etapi 2.

Vrijeme potrebno da doĐe do ravnotežnog stanja, količinski odnos zemljišta i rastvora, težina uzorka zemljišta, zapremina tečne faze koja je u dodiru sa zemljištem i koncentracija ispitivane supstance u rastvoru bira se na osnovu rezultata preliminarne studije. Analizu uraditi nakon 2, 4, 6 ili 8 sati (ako je moguće i nakon 10 sati), kao i nakon 24 sata kontakta ispitivane supstance i zemljišta. Ako rezultati ispitivanja usmjerenog na pronalaženje pogodnog odnosa zemljišta i rastvora pokažu da je potrebno duže vrijeme da ispitivana hemikalija dostigne ravnotežno stanje, vrijeme protresanja se produžava na najviše 48 sati. Pri razmatranju i sastavljanju vremenskog rasporeda analiza, moguća je i određena fleksibilnost.

U cilju utvrĐivanja varijanse rezultata, svaki eksperiment (jedan uzorak zemljišta i jedan rastvora) postaviti najmanje u duplikatu. U okviru svakog ispitivanja, analizira se i jedna slijepa proba. Slijepa proba se sastoji od zemljišta i 0,01 M rastvora $CaCl_2$, bez ispitivane supstance, pri čemu su težina zemljišta i zapremina rastvora zastupljeni u njoj, identični onima upotrijebljenim u ispitivanom uzorku. Kontrolni uzorak koji se sastoji isključivo od ispitivane supstance u 0,01 M rastvoru $CaCl_2$ (bez zemljišta), podvrgava se identičnom postupku ispitivanja, čime se sprječavaju neočekivani obrti.

Procenat adsorpcije računa se za svaku od vremenskih tačaka At_i, odnosno vremenski interval $A_{\Delta ti}$
(prema potrebi), a na krivoj se prikazuje u funkciji vremena. Računaju se i koeficijent raspodjele (K_d) u ravnotežnom stanju, kao i (za nepolarne organske hemikalije) adsorpcioni koeficijent normalizovan na sadržaj organskog ugljenika (K_{oc}).

Linearna K_d vrijednost opisuje sorpciono ponašanje u zemljištu i predstavlja izraz inherentne pokretljivosti hemikalija u zemljištu. Na primjer, hemikalije kod kojih je $K_d \leq 1 cm^3/g$ smatraju se kvalitativno pokretljivim. Na sličan način razvijena je shema klasifikacije pokretljivosti bazirana na K_{oc} vrijednostima. Postoje i sheme klasifikacije u odnosu na procjeĐivanje kroz zemljište, bazirane na odnosu između K_{oc} i DT_{50}.

Prema rezultatima studija u okviru kojih je analizirana greška, K_d vrijednosti niže od 0,3 cm^3/g ne mogu se utvrditi na osnovu opadanja koncentracije ispitivane supstance u tečnoj fazi, čak i kad se primjeni količinski odnos zemljišta i rastvora 1:1, tada se analiziraju obije faze: zemljišta i rastvora.

Studiju adsorpcionog ponašanja hemikalije u zemljištu i njene moguće pokretljivosti nastaviti određivanjem Frojndlihovih adsorpcionih izotermi za ove ispitivane sisteme, za koje je moguće tačno odrediti Kd, ako se slijedi dosledno ispitivani protokol ove metode ispitivanja. Tačno određivanje istog moguće je ako vrijednost koja se dobije množenjem Kd sa odnosom zemljišta i rastvora iznosi > 0,3 u slučaju kada su mjerenja zasnovana na opadanju koncentracije u tečnoj fazi (dakle na indirektnoj metodi) ili u slučaju kada se analiziraju obije faze (direktnom metodom) i kada vrijednost iznosi> 0,1[61].

1.9.4. Etapa 3: Adsorpcione izoterme i kinetika desorpcije/desorpcijske izoterme

1.9.4.1. Adsorpcione izoterme

Koristi se pet koncentracija ispitivane supstance, koje pokrivaju dva reda veličine. Pri izboru ovih koncentracija voditi računa o rastvorljivosti ispitivane supstance u vodi i njenim krajnjim

koncentracijama koje se u tečnoj fazi bilježe u trenutku postizanja ravnotežnog stanja. Količinski odnos zemljišta i rastvora za vrijeme cijelog trajanja studije je nepromijenjen. Ispitivanje adsorpcije obavlja se sa razlikom što se u vremenskom razdoblju potrebnom da se dostigne ravnotežno stanje, prethodno određeno u Etapi 2 ispitivanja, tečna faza analizira jednom. U rastvoru se određuju ravnotežne koncentracije, a količina adsorbovane supstance iizračunava se iz osiromašenja sadržaja ispitivane supstance u rastvoru, tj. opadanja koncentracije ispitivane supstance u njoj, ili direktnom metodom. Adsorbovana masa ispitivane supstance po jedinici mase zemljišta grafički se prikazuje kao funkcija ravnotežne koncentracije ispitivane supstance.

Frojndlihova izoterma koristi se kao matematički model koji opisuje proces adsorpcije. [54]

1.9.4.2. Kinetika desorpcije

Cilj ove metode ispitivanja je da se utvrdi da li se hemikalija reverzibilno ili ireverzibilno adsorbuje na čestice zemljišta. Ako se unesu u bazu podataka, podaci o desorpciji korisni su pri kompjuterskom modelovanju u okviru simulacije procjeĐivanja rastvorene hemikalije iz zemljišta. Ako se želi izvesti studija desorpcije studija data u ovoj metodi sprovedi se na svakom sistemu za koji se u prethodnom ispitivanju kinetike adsorpcije može odrediti K_d. Ispitivanje kinetike desorpcije moguće je izvesti na dva načina - paralelnom i rednom metodom. Izbor metodologije koja ća se primjeniti u toku studije, prepušta se licu koje izvodi ispitivanja, koje će pri donošenju odluke voditi računa o opremljenosti dostupne laboratorijae i sredstvima koja su na rapolaganju.

1. Paralelna metoda - za svaku vrstu zemljišta koja je izabrana za studiju desorpcije, pripremaju se uzorci identičnog količinskog odnosa zemljišta i rastvora i to u broju koji odgovara broju vremenskih intervala u kojima se proučava kinetika desorpcije. Taj broj intervala je identičan broju upotrijebljenom u studiji u kojoj se izučavala kinetika adsorpcije. Da bi se sistemu omogućilo da dostigne tačku ravnotežnog stanja desorpcije, ukupno trajanje ispitivanja se i produžava na primjeren način. U svakom ispitivanju (jedan uzorak zemljišta, jedan rastvora) postavlja se i jedna slijepa proba. Slijepa proba se sastoji od zemljišta i 0,01 M rastvora $CaCl_2$ u kome nema ispitivane supstance, pri čemu su težina zemljišta i zapremina rastvora identični onima u ispitivanom uzorku. Za kontrolni uzorak ispitivana supstanca se u 0,01 M rastvoru $CaCl_2$ (bez zemljišta) ispituje po istom postupku. Sve smješe zemljišta i rastvora protresaju se dovoljno dugo dok se ne dostigne ravnotežno stanje adsorpcije (kako je to ranije utvrĐeno u Etapi 2). Faze se potom dijele centrifugiranjem, a tečne faze se uklanjaju. Uklonjena zapremina rastvora kompenzuje se jednakom zapreminom 0,01 M rastvora $CaCl_2$ u kome nema ispitivane supstance, a nove smješe se protresaju. Tečna faza iz prve kivete iznova se prikuplja u najvećoj mogućoj mjeri i potom izmjeri nakon 2 sata, tečna faza iz druge kivete nakon 4 sata, tečna faza iz treće kivete nakon 6 sati, dok se ne dostigne ravnotežno stanje desorpcije.
2. Redna metoda - po završetku studije kojom se izučavala kinetika adsorpcije, smješa se centrifugira, a tečna faza uklanja. Uklonjena zapremina rastvora nadomiješta se sa 0,01 M rastvora $CaCl_2$, bez ispitivane supstance. Nova smješa se protresa dok se ne dostigne ravnotežno stanje desorpcije. Za to vrijeme se smješa u definisanim vremenskim intervalima ponovo centrifugira, da se razdvoje faze. Manji alikvot tečne faze se analizira na prisustvo ispitivane supstance. Ispitivanje se dalje nastavlja sa izvornom smješom. Zapremina svakog pojedinog alikvota iznosi manje od 1% ukupne zapremine. Da bi se količinski odnos

[54] poreČenje vrijednosti Kf (Frojndlihov adsorpciona konstanta) različitih supstanci moguće je samo ako su izraţene u istim jedinicama mjere

zemljišta i rastvora održao nepromijenjenim, smješi se dodaje ista količina svježeg 0,01 M rastvora $CaCl_2$ i nastavlja se protresanje dok ne nastupi drugi vremenski interval.

Procenat desorpcije računa se za svaku vremensku tačku (D_{ti}), odnosno vremenski interval ($D_{\Delta ti}$), i prikazuje se u funkciji vremena. Računa se i koeficijent desorpcije K_d u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja. Sve jednačine, primjenljive u ovu svrhu, navedene su u dijelu 2. ove metode kao i u Dijelu VI ove metode.

Rezultati ispitivanja kojim se izučava kinetika desorpcije

Uobičajene krive koje prikazuju procenat desorpcije D_{ti} i procenat adsorpcije A_{ti} u funkciji vremena, omogućavaju utvrĐivanje reverzibilnosti procesa adsorpcije. Ako se dostigne ravnotežno stanje desorpcije za vrijeme čak dvostruko duže od onoga koje je bilo potrebno da se dostigne ravnotežno stanje adsorpcije, a ukupna desorpcija prelazi 75% ukupno adsorbovane količine ispitivane supstance, adsorpcija se smatra reverzibilnom.

1.9.4.3. Desorpcione izoterme

Frojndlihove desorpcione izoterme određuju se na istim tipovima zemljišta na kojima su se ispitivanjem odreĐivale i adsorpcione izoterme. Ispitivanje desorpcije sprovodi se na način opisan u dijelu 1.9.4.2. ove metode, sa razlikom što se tečna faza analizira jedanput, u trenutku kada se dostigne ravnotežno stanje desorpcije. Iizračunava se količina desorbovane ispitivane supstance. Sadržaj ispitivane supstance koji je u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja desorpcije ostao adsorbovan na zemljište, grafički se prikazuje kao funkcija ravnotežne koncentracije ispitivane supstance u rastvoru (Dio II ove metode i Dio VI ove metode).

2. Podaci i izvještaj

Podaci dobijeni analizom prikazuju se u obliku tabela (Dio VII ove metode). Navode se rezultati pojedinačnih mjerenja i izračunate prosječne vrijednosti. Prilažu se grafički prikazi adsorpcionih izotermi. Izračunavanja se vrše na način opisan u ovoj metodi. Za potrebe ove metode, uzima se da težina 1 cm^3 vodenog rastvora iznosi 1 g. Količinski odnos zemljišta i rastvora prikazuje se u jedinicama težinskog odnosa, ili odnosa težine i zapremine istim grafikonom.

2.1. Adsorpcija

Adsorpcija (u daljem tekstu: A_{ti}) je procenat supstance adsorbovane na čestice zemljišta, u odnosu na količinu koja je u datim ispitivanim uslovima postojala na početku ispitivanja. Ukoliko je ispitivana supstanca postojana i ne adsorbuje se u značajnoj mjeri na zidove posude, A_{ti} se računa

za svaku vrijemensku tačku t_i prema formuli: $A_{ti}= \frac{msadsti \square 100}{\text{procenat adsorpcije u } m_0} \square \% \square$ gdje je: A_{ti}

tački vremena t_i (%); m $^{ads}{}_{s}\, t_i$ masa (µg) ispitivane supstance adsorbovane na zemljište u vremenu ti; m_0 masa (µg) ispitivane supstance u ispitivanoj posudi na početku ispitivanja.

Iizračunavanje procenta adsorpcije A_{ti} u okolnostima kada se primjenjuje paralelna, odnosno redna metoda, dato je u Dijelu VI ove metode.

Koeficijent raspodjele (K_d) je odnos između sadržaja supstance u čvrstoj fazi i njene masene koncentracije u tečnoj fazi, zabilježen u trenutku u kom je, u datim ispitivanim uslovima, dostignuta tačka ravnotežnog stanja adsorpcije.

Kd= $\frac{Cs}{C}$ $\frac{ads}{ads}$ $\frac{eq}{eq}$ □ $\frac{m}{maq}$ $\frac{sads}{ads}$ $\frac{(eq)}{(eq)}$ □ *mzemljista* $\frac{V0}{}$ □ cm^3 / *g* □ gdje je C $^{ads}{}_{s}$ sadržaj (µg/g) supstance adsorbovane na

aq zemljište u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja adsorpcije; C $^{ads}{}_{aq}$ masena koncentracija (µg/cm^3) supstance u tečnoj fazi u satu dostizanja ravotežnog stanja adsorpcije. Ova koncentracija

a

ds određena je analitički, uzimajući u obzir vrijednosti zabilježene analizom slijepih proba; m $_{s}$ masa supstance adsorbovana na zemljište u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja adsorpcije ((g); m *ads*

$_{aq}$ masa supstance u rastvoru u trenutku postizanja ravnotežnog stanja adsorpcije (µg); $m_{zemljišta}$ količina (g) čvrste faze, iskazana kao suva masa zemljišta; V_0 početna zapremina (cm^3) tečne faze koja se nalazi u dodiru sa zemljištem. Odnos između A_{eq} i K_d dat je formulom: K_d=

$\frac{Aeq}{100}$ □ $\frac{V0}{Aeq}$ □ cm^3 / *g* □ gdje je: A_{eq} procenat (%) adsorpcije u trenutku dostizanja ravnotežnog

mzemljista stanja.

Koeficijent adsorpcije normalizovan na sadržaj organskog ugljenika K_{oc} povezuje koeficijent

$\frac{}{100}$ □ ^{3} / ^{g} □

gdje je raspodjele K_d sa sadržajem organskog ugljenika u uzorku zemljišta: K_{oc}=K_d □ *cm*

%*OC*

%OC procenat organskog ugljenika u uzorku zemljišta (g/g).

Koeficijent K_{oc} je apsolutni broj koji bliže opisuje raspodjelu, naročito nepolarnih organskih hemikalija, između organskog ugljenika u zemljištu ili sedimenta i vode. Adsorpcija ovih hemikalija korelira se sa sadržajem organskog ugljenika u čvrstom sorbensu[55]. Vrijednosti K_{oc} zavise od specifičnih parametara zemljišnih frakcija, koje se, zbog razlika u porijeklu, načinu nastanka, itd.
značajno razlikuju po svom sorptivnom kapacitetu.

2.1.1. Adsorpcione izoterme

Jednačina Frojndlihovih adsorpcionih izotermi povezuje količinu adsorbovane ispitivane supstance sa njenom koncentracijom u rastvoru u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja. Podaci se obraĐuju u odjeljku 2.1. ove metode, a za svaku od ispitivanih posuda izračuna se sadržaj ispitivane

[55] European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, (1993) Monograph No 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels

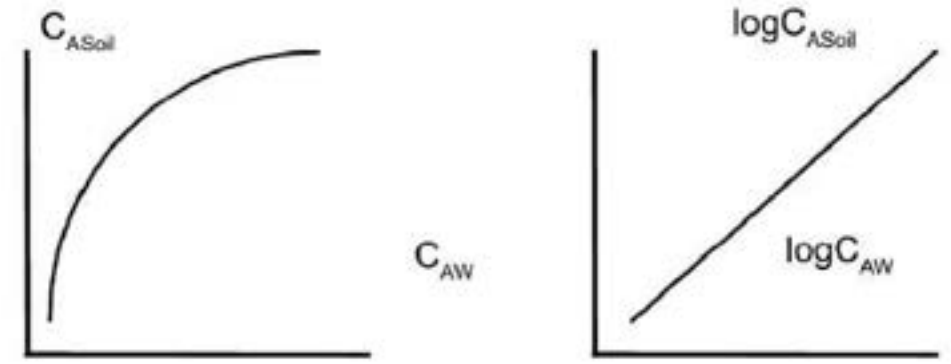
$ads\ eq$na drugim supstance koja se adsorbovala na zemljište po završetku studije adsorpcije C_s $ads\ eq$predstavlja ravnotežnu mjestima oznaka x/m. Ravnotežno stanje postignuto i da C_s vrijednost: $C^{ads}_s eq = \frac{s\ eq\ C0\ Caqads\ eq\ V0}{mzemljista\ \ mzemljista}$ g / g. Frojndlihova jednačina adsorpcije data ^{mads}

1

je u jednačini: $C^{ads}_s eq = K^{ads}_s C_{aq}^{ads\ eq\ n}$ g / g ili u linearnom obliku: $\log C^{ads}_s eq = \log K^{ads}_F \frac{1}{n} \log C_{aq}^{ads\ eq}$ gdje je: K^{ads}_F Frojndlihova konstanta adsorpcije; njegova dimenzija je cm^3/g samo ako je 1/n = 1; u svim drugim slučajevima nagib 1/n uvodi u dimenziju K^{ads}_F ($\mu g 1^{-1/n} (cm^3)^{1/n} g^1$); n konstanta regresije; 1/n je uglavnom unutar opsega 0,7 do 1,0 i sugeriše da su podaci o adsorpciji često blago nelinearni.

Navedene jednačine grafički se prikazuju, a vrijednosti K^{ads}_F i 1/n računaju se pomoću regresione analize, upotrebom druge jednačine. Računa se i koeficijent korelacije logaritamske jednačine r^2. Primjer takvih krivih dat je na slici 2.

Slika 2. Frojndlihova kriva adsorpcije, normalna i aproksimirana na linearnu



2.1.2. Maseni balans

Maseni balans (mass balance, u daljem tekstu: MB) je procenat supstance koji se analitički detektuje, a ostaje nakon ispitivanja adsorpcije, u odnosu na nominalnu količinu supstance na početku ispitivanja.

Ako se rassupstancaač u potpunosti miješa sa vodom, obrada podataka je drugačija. Ako se rassupstancaač miješa u potpunosti sa vodom, u cilju određivanja količine supstance koja se naknadno ekstrahuje rassupstancaačem primjenjuje se način obrade podataka iz dijela 2.2. ove metode. Ako se rassupstancaač ne miješa potpuno sa vodom, odrediti količinu supstance koja se naknadno detektuje.

MB se pri adsorpciji računa na sljedeći način - naziv (m_E) odgovara zbiru masa ispitivane hemikalije, ekstrahovane iz zemljišta i sa površine posude za ispitivanje pomoću organskog

rassupstancaača: MB= $\frac{(Vrec \cdot Caqads\ eq\ mE) \cdot 100}{V0 \cdot C0}$ % gdje je: MB maseni balans (%); m_E ukupna masa (µg) ispitivane supstance ekstrahovana iz zemljišta i sa zidova posude za ispitivanje u dva koraka; C_0 početna masena koncentracija ispitivane supstance koja se nalazi u dodiru sa zemljištem (µg/cm^3); V_{rec} zapremina (cm^{-3}) supernatanta nakon dostizanja ravnotežnog stanja adsorpcije.

2.2. Desorpcija

Desorpcija (u daljem tekstu: D) je procenat ispitivane supstance koji se desorbovao, u odnosu na količinu supstance koja se, u datim ispitivanim uslovima, ranije adsorbovala: Dti=

$\frac{madsaqdes\ eqti}{ms} \cdot 100$ % gdje je: Dti procenat desorpcije u tački vremena ti (%); m $des_{aq}ti$ masa (µg) ispitivane supstance desorbovana iz zemljišta u tački vremena t_i; m $^{ads}{}_{aq}\ t_i$ masa (µg) ispitivane supstance adsorbovana na zemljište u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja adsorpcije.

Način izračunavanja postotka desorpcije D_{ti}, ako se koriste paralelno, odnosno redna metoda, dati su u Dijelu VI ove metode.

U datim ispitivanim uslovima vidljivi koeficijent desorpcije (K_{des}) je odnos sadržaja supstance koji je ostao u čvrstoj fazi i masene koncentracije desorbovane supstance u vodenom rastvoru, u trenutku kada se dostigne ravnotežno stanje desorpcije:

Kdes= $\frac{msads\ eq}{m_{aq}desmaqdeseqeq \cdot VT\ 3\ /\ g}$ gdje je: Kdes koeficijent desorpcije (cm3/g); m $desaq\ eq \cdot cm$ ukupna masa (µg) ispitivane supstance desorbovana iz zemljišta u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja desorpcije; V_T ukupna zapremina tečne faze koji se u toku ispitivanja kinetike desorpcije nalazi u dodiru sa zemljištem (cm^3). Smjernice za iizračunavanje m $^{des}{}_{aq}\ eq$ date su u dijelu 2.2. i u Dijelu VI ove metode.

2.2.1. Desorpcione izoterme

Frojndlihova jednačina desorpcionih izotermi stavlja sadržaj ispitivane supstance koji je ostao adsorbovan na zemljište u odnos sa koncentracijom ispitivane supstance u rastvoru u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja desorpcije.

Za svaku od kiveta u kojima se nalazi ispitivani uzorak, sadržaj supstance koji je u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja desorpcije ostao adsorbovan na zemljište računa se na sljedeći način: C $des_s\ eq$ $\frac{mads\ eq}{mzemljista}$ s $maqdes\ eq$ $g\ /\ g$, m $desaq$ se definiše kao:

$eq\square\ m_m$ ——
$^{des}eq\square VV_{r\ F}^{0}\ m_{aq}^{A}\ \square\square g\square$ gdje je: C $^{des}{}_{s}$ sadržaj (µg/g) ispitivane supstance koji je u trenutku

dostizanja ravnotežnog stanja desorpcije ostao adsorbovan na zemljište; m $^{des}{}_{m}$ masa (µg) supstance, određena u tečnoj fazi u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja desorpcije analitičkim putem; m $_{aq}{}^{A}$ masa (µg) ispitivane supstance koja je zbog nepotpune zamene zapremine ostala nakon dostizanja ravnotežnog stanja adsorpcije; m $^{des}{}_{aq}$ masa (µg) supstance u rastvoru u trenutku

dostizanja ravnotežnog stanja adsorpcije; m $_{aq}A\ \square\ maqads\ eq\square\square\square\square V\underline{0}V0V\underline{R}\ \square\square\square\square$ V *rF* zapremina rastvora uzeta

$\square$

iz posude za ispitivanje u cilju mjerenja u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja desorpcije (cm^3); V_R zapremina supernatanta odstranjenog iz posude za ispitivanje nakon postizanja ravnotežnog stanja adsorbcije i zamenjena istom zapreminom 0,01 M rastvora $CaCl_2$ (cm^3). Frojndlihova

1

jednačina desorpcije: $C^{des}{}_{s}\ eq\square K_F^{des}\ \square C_{aq}^{des}eq\_n\ \square\square g\ /\ g\square$ ili u linearnom obliku: log C $^{des}\ eq\square$ log $K_{\ F}^{des\ 1}\ \square\log C_{aq}^{des}\ eq$ gdje je: K $^{ads}{}_{F}$ Frojndlihova — konstanta desorpcije; n konstanta $_{s}$
n
regresije; C $^{des}{}_{aq}$ masena koncentracija (µg/cm^3) supstance u tečnoj fazi u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja desorpcije. Navedene jednačine prikazuju se grafički, a vrijednosti K i 1/n se računaju regresionom analizom, korišćenjem jednačine.[56]

2.2.2. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži:

1) potpunu identifikaciju upotrijebljenih uzoraka zemljišta, uključujući:
- geografske odrednice lokacije (geografsku širinu i dužinu),
- datum uzimanja uzoraka,
- upotrebljenu vrstu zemljišta (npr. poljoprivredno zemljište, šuma, itd),
- dubinu sa koje je uzet uzorak,
- sadržaj pijeska/mulja/ilovače,
- pH vrijednost (u 0,01 M rastvoru $CaCl_2$),
- sadržaj organskog ugljenika,
- sadržaj organske materije,
- sadržaj azota,
- količinski odnos ugljenika i azota (C/N),
- kapacitet katjonske izmjene (mmol/kg);

[56] Ukoliko Frojndlihov eksponent adsorpcije, odnosno desorpcije, 1/n, iznosi 1, Frojndlihova adsorpciona, odnosno desorpciona konstanta vezivanja (, odnosno) biće jednaka konstantama ravnoteţe adsorpcije, odnosno desorpcije (Kd, odnosno Kdes), a krive Cs u odnosu na Caq biće linearne. Ako ovi eksponenti ne iznose 1, krive Cs u odnosu na Caq neće biti linearne, a konstante adsorpcije, odnosno desorpcije variraće duţ izotermi.

- sve podatke koji se odnose na prikupljanje i skladištenje uzoraka zemljišta;

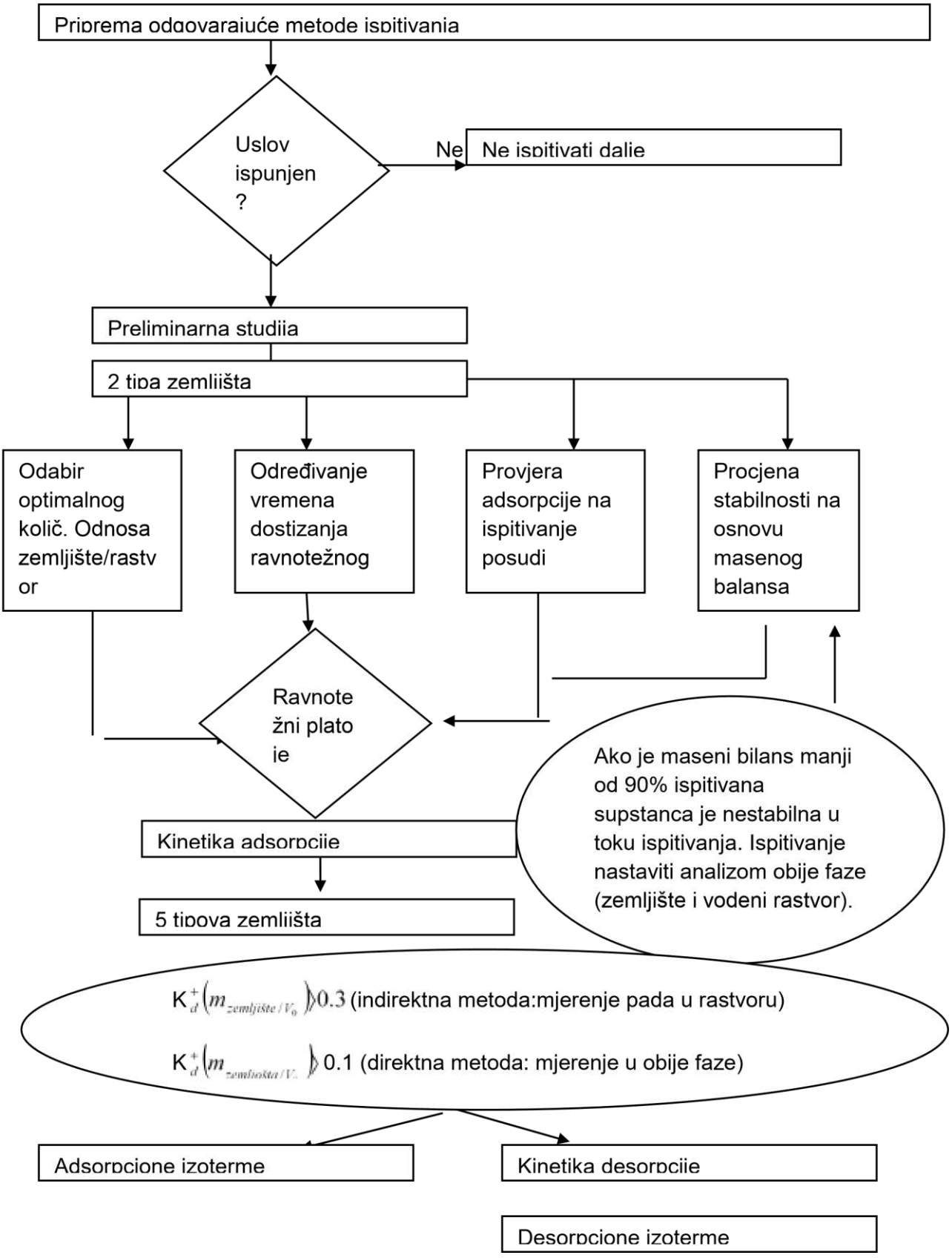
2) sve podatke relevantne za tumačenje adsorpcije/desorpcije ispitivane supstance:

- literaturu u kojoj se navode metode upotrijebljene za određivanje svakog od pokazatelja,
- podatke o ispitivanoj supstanci na za to primjeren način,
- temperaturu pri kojoj se ispitivanje odvijalo,
- uslove pod kojima su uzorci centrifugirani,
- analitički postupak upotrebljen za analizu ispitivane supstance,

- obrazloženje u kom se argumentuju razlozi zbog kojih je pri pripremi osnovnog rastvora ispitivane supstance upotrebljeno sredstvo koje olakšava rastvaranje i
- ukoliko je to relevantno, pojašnjenja korekcija kalkulacija;

3) podatke u skladu sa obrascem (datim u Dijelu VII ove metode) i grafičke prikaze; 4) sve podatke i zapažanja koji doprinose tumačenju rezultata ispitivanja.

DIO II
SHEMA ISPITIVANJA


Priprema odgovarajuće metode ispitivanja
Uslov ispunjen ?
Ne
Ne ispitivati dalje
Preliminarna studija
2 tipa zemljišta
Odabir optimalnog količ. Odnosa zemljište/rastvor
Određivanje vremena dostizanja ravnotežnog
Provjera adsorpcije na ispitivanje posudi
Procjena stabilnosti na osnovu masenog balansa
Ravnotežni plato je
Ako je maseni bilans manji od 90% ispitivana supstanca je nestabilna u toku ispitivanja. Ispitivanje nastaviti analizom obije faze (zemljište i vodeni rastvor).
Kinetika adsorpcije
5 tipova zemljišta
$K_d^+\left(m_{zemljište/V_0}\right) \rangle 0.3$ (indirektna metoda:mjerenje pada u rastvoru)
$K_d^+\left(m_{zemljište/V_0}\right) \rangle 0.1$ (direktna metoda: mjerenje u obije faze)
Adsorpcione izoterme
Kinetika desorpcije
Desorpcione izoterme

DIO III

UTICAJ PRECIZNOSTI ANALITIČKE METODE I PROMJENA KONCENTRACIJE NA PRECIZNOST REZULTATA ADSORBCIJE

Iz tabele je jasno da kada je razlika između početne mase (m_0 = 110 μg) i mase u ravnotežnom stanju ($m^{des}_{aq}eq$= 100 μg) ispitivane supstance u rastvoru mala, greška od 5% kod mjerenja koncentracije pri ravnotežnom stanju rezultira greškom od 50% kod izračunavanja mase supstance adsorbovane na zemljištu ($m^{des}_{aq}eq$) i 52,4% kod izračunavanja K_d. Količina zemljišta je 10 g, a zapremina rastvora V_0 = 100 cm^3.

	m $des_{aq}eq$ (mg)	C $ads_{aq}eq$ (mg/cm^3)	R	m *desaq eq* XXI (mg)	C *adsaq eq*XXI (mg/cm^3)	RXXI	K_dLXXX	R'
	za A = 9%							
m_0 =110 μg ili C_0 = 1,100 μg/cm^3	100	1,000	prava vrijednost	10	1,00	prava vrijednost	1	
	101	1,010	1%	9	0,90	10%	0,891	10,9%
	105	1,050	5%	5	0,50	50%	0,476	52,4%
	109	1,090	9%	1	0,10	90%	0,092	90,8%
	za A = 55%							
m_0 =110 μg ili C_0 = 1,100 μg/cm^3	50,0	0,500	prava vrijednost	60,0	6,00	prava vrijednost	12,00	
	50,5	0,505	1%	59,5	5,95	0,8%	11,78	1,8%
	52,5	0,525	5%	57,5	5,75	4,0%	10,95	8,8%
	55,0	0,550	10%	55,0	5,50	8,3%	10,00	16,7%
	za A = 99%							
m_0 =110 μg ili C_0 = 1,100 μg/cm^3	1,100	0,011	prava vrijednost	108,9	10,89	prava vrijednost	990	
	1,111	0,01111	1%	108,889	10,8889	0.01%	980	1.0%
	1,155	0,01155	5%	108,845	10,8845	0.05%	942	4.8%
	1,21	0,0121	10%	108,790	10,8790	0.10%	899	9.2%

C

ads

LXXXm *s* □ *m*0 *maqadqeq*,*Csads eq*□ □ 0 *Cmsadszemljistaeq*□□*V*0□ *Kd* □ ——— ——— *mmsadszemljisteeq* □ *msmadsaqadseq*□ *mzemljistaV*0

gdje je: m^{ads}_{s} masa ispitivane supstance u zemljišnoj fazi u ravnotežnom stanju μg; m^{ads}_{aq} masa ispitivane supstance u tečnoj fazi u ravnotežnom stanju μg; C^{ads}_{s} sadržaj ispitivane supstance u zemljišnoj fazi u ravnotežnom stanju μg/g; C^{ads}_{aq} masena koncentracija

ispitivane supstance u tečnoj fazi u ravnotežnom stanju μg/cm^3; R analitička greška kod određivanja m $^{ads}_{aq}$; R′ izračunata greška zbog analitičke greške R.

DIO IV
TEHNIKE PROCJENE K_d

Tehnike utvrĐivanja omogućavaju predviĐanje K_d bazirano na korelacijama sa npr. vrijednostima K_{ow}, podacima o rastvorljivosti ispitivane supstance u vodi, odnosno podacima o polaritetu, izvedenim iz podataka dobijenih analizom reverzne faze pomoću HPLC. Kako je dato u Tabelama 1. i 2, iz ovih jednačina se iizračunava K_{oc} ili K_{om}, a potom, indirektno, K_d iz jednačina:

$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc}\ cm^3/g$ i $K_{om} = K_d \cdot \frac{100}{1.724 \cdot \%oc}\ cm^3/g$. Koncept ovih korelacija se bazira na dvije pretpostavke: organska materija u zemljištu dominantno kontroliše adsorbciju supstance i interakcije su nepolarne.

Kao rezultat ove korelacije: nisu ili su samo u manjoj mjeri primjenljive na polarne supstance i nisu primjenljive u slučajevima kada je sadržaj organske materije u zemljištu veoma nizak. Zadovoljavajuće korelacije pronaĐene su između P_{ow} i adsorbcije, ali isto se ne može tvrditi za odnos između rastvorljivosti u vodi i adsorbcije. Studije su kontradiktorne. Primjeri korelacija između koeficijenta adsorbcije i koeficijenta raspodjele u sistemu n-oktanol/voda, kao i rastvorljivosti u vodi dati su u Tabelama 1 i 2.

Tabela 1: Primjeri korelacije između koeficijenta distribucije adsorbcije i koeficijenta raspodjele u sistemu n-oktanol/voda

Supstanca	Korelacija	Autori
Supstituisane uree	$\log K_{om} = 0{,}69 + 0{,}52 \log P_{ow}$	Briggs (1981)
Aromatična hlorovane supstance	$\log K_{oc} = -0{,}779 + 0{,}904 \log P_{ow}$	Chiou et al. (1983)
Različiti pesticidi	$\log K_{om} = 4{,}4 + 0{,}72 \log P_{ow}$	Gerstl i Mingelgrin (1984)
Aromatični ugljovodonici	$\log K_{oc} = -2{,}53 + 1{,}15 \log P_{ow}$	Vowles i Mantoura (1987)

Tabela 2: Primjeri korelacije između koeficijenta distribucije adsorbcije i rastvorljivosti u vodi

Supstanca	Korelacija	Autori
Različiti pesticidi	$\log K_{om} = 3{,}8 - 0{,}561 \log S_w$	Gerstl i Mingelgrin (1984)
Alifatične, aromatične hlorovane supstance	$\log K_{om} = (4{,}040 \pm 0{,}038) - (0{,}557 \pm 0{,}012) \log S_w$	Chiou et al. (1979)
α-naftol	$\log K_{oc} = 4{,}273 - 0{,}686 \log S_w$	Hasset et al. (1981)
Ciklične, aromatične, alifatične supstance	$\log K_{oc} = -1{,}405 - 0{,}921 \log S_w - 0{,}00953 (mp - 25)$	Karickhoff (1981)
Različita jedinjenja	$\log K_{om} = 2{,}75 - 0{,}45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982)

DIO V
IZRAČUNAVANJA ZA DEFINISANJE USLOVA CENTRIFUGIRANJA

1. Trajanje centrifugiranja dato je sljedećom formulom, uz pretpostavku o sfernim česticama: T=

9 □ □ 2rp2 □ □s □aq □ □ □ □ ln $^{R}R^{b}t$ gdje je: ω rotaciona brzina (= 2 π rpm/60), (rad/s); rpm obrtaji u minuti; 2 □ □ □

η viskozitet rastvora, (g/s cm^{-1}); r_p prečnik čestice, (cm); ρ_s gustina zemljišta, (g/cm^3); ρ_{aq} gustina rastvora, (g/cm^3); R_t udaljenost od centra rotora centrifuge do vrha rastvora u kiveti, (cm); R_b udaljenost od centra rotora centrifuge do dna rastvora u kiveti, (cm); R_b - R_t visina stuba smješe zemljište/rastvor u kiveti, (cm). Zbog pojednostavljenja parametri su opisani u jedinicama koje nisu SI jedinice (g, cm).

Opšteprihvaćeno je da se izračunato vrijeme duplira da bi se obezbijedilo kompletno razdvajanje.

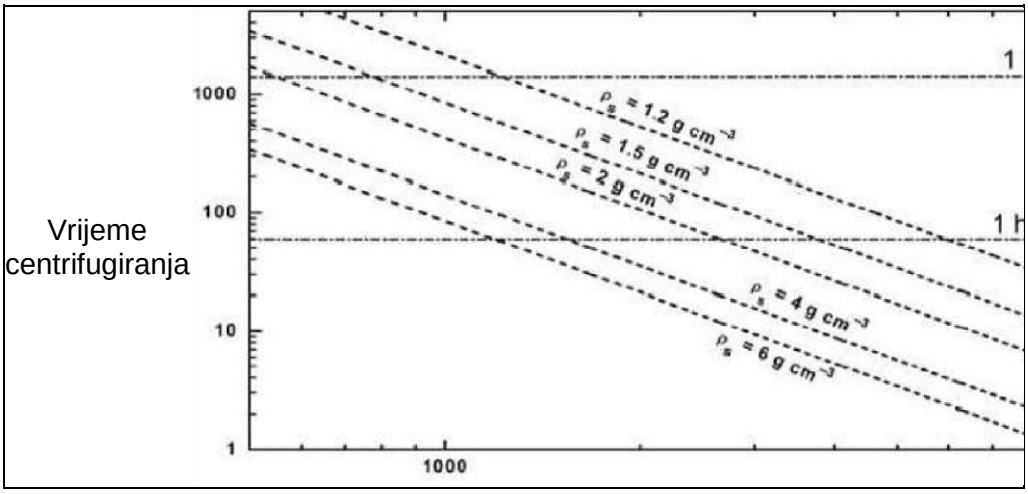
2. Prva jednačina se pojednostavljuje ako se uzme u obzir da su viskozitet (η) i gustina (ρaq) rastvora jednake viskozitetu i gustini vode na 25 °C; slijedi η = 8,95 x 10^{-3} g/scm^{-1} i ρaq = 1,0 g/cm^3. Vrijeme cetrifugiranja je: t □ rpm_2 □$^{3.7}$2 $_1$ln $^{R}_{R}{}^{r}t$ $_{r}p$ □s

3. Iz druge jednačine se vidi da su za definisanje uslova centrifugiranja, tj. njenog trajanja (t) i brzine (rpm), potrebnih za razdvajanje čestica specifične veličine (u našem slučaju prečnika 0,1 μm), važna dva parametra: gustina zemljišta i visina stuba smješe u kiveti za centrifugiranje (R_b - R_t), tj. udaljenost od vrha nivoa rastvora do dna kivete na kojoj se čestica proteže; ako je zapremina fiksna, visina stuba smješe u kiveti će zavisiti od kvadrata njenog prečnika.

Slika 1. prikazuje varijacije u dužini trajanja centrifugiranja (t) u odnosu na brzinu centrifugiranja (rpm), pri različitim gustinama zemljišta (ρ_s) (Slika 1a) i različitim visinama stuba smješe u kivetama za centrifugiranje (Slika 1b). Iz Slike 1a slijedi da je uticaj gustine zemljišta očigledan. Na primjer, pri klasičnom centrifugiranju uzorka zemljišta gustine 1,2 g cm3, brzinom od 3.000 obrtaja u minuti, centrifugiranje traje približno 240 minuta, dok centrifugiranje zemljišta gustine 2,0 g cm3 traje svega 50 minuta. Na sličan način, iz Slike 1b slijedi da ako visina stuba smješe u kiveti iznosi 10 cm, klasično centrifugiranje brzinom od 3.000 obrtaja u minuti traje približno 50 minuta, a ako ta visina iznosi 1 cm, samo 7 minuta. Važno je naći optimalan odnos između centrifugiranja koje iziskuje najmanju moguću visinu stuba smješe u kiveti i jednostavne laboratorijaske obrade u trenutku kada lice koje izvodi ispitivanja, nakon centrifugiranja, razdijeli faze.

4. Kada se definišu ispitivani uslovi pod kojima će se razdijeliti čvrsta faza (zemljište) od tečne faze (rastvor), uzeti u obzir mogućnost postojanja treće, "pseudo-faze", koloida. Ove čestice, manje od 0,2 μm, imaju uticaj na cjelokupni mehanizam adsorpcije supstance u suspenziji zemljišta. Ako se centrifugira na opisani način, koloidi se zadržavaju u tečnoj fazi i analizirani zajedno sa njom. Ovim se podaci o njihovom uticaju gube. Ako laboratorijaa koja izvodi studiju rapolaže opremom koja omogućava ultracentrifugiranje ili ultrafiltraciju, adsorpcija/desorpcija se proučava detaljnije, što uključuje i mogućnost dobijanja podataka o adsorpciji ispitivane supstance na koloide. U ovom slučaju, u cilju razdjeljivanja tri faze (zemljišta, koloida i rastvora) izvršiti ultracentrifugiranje brzinom od 60.000 okretaja/min, odnosno ultrafiltraciju filtrom poroznosti od 100.000 Daltona. U skladu sa tim, da bi se analizi na prisustvo supstance podvrgle sve tri faze, promjeniti i protokol metode ispitivanja.

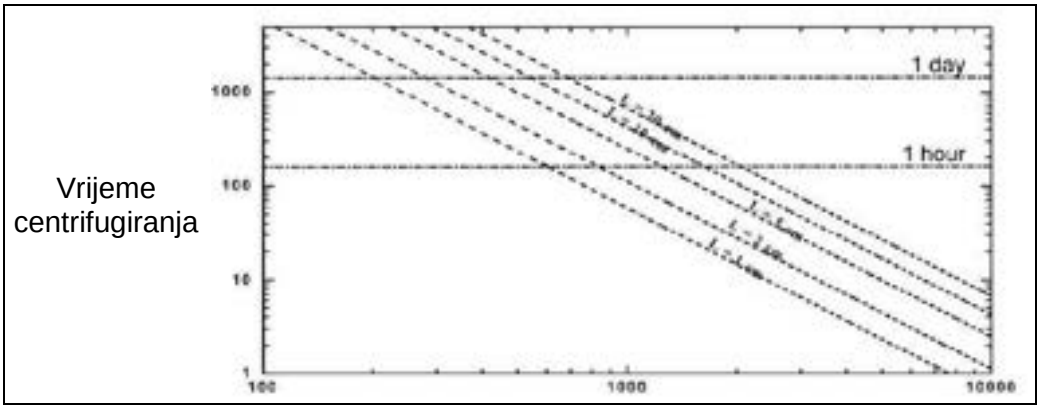
Slika 1a.



Brzina centrifugiranja (rpm)

Varijacije vremena centrifugiranja (t) u odnosu na brzinu centrifuge (rpm) za zemljišta različite gustine (ρ_s). R_t = 10 cm, R_b - R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g/scm^{-1} i ρ_{aq} = 1,0 g/cm^3 na 25 °C.

Slika 1b.

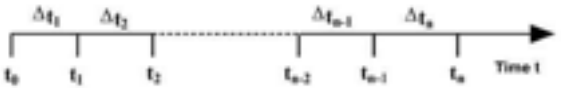


Brzina centrifugiranja (rpm)

Varijacije vremena centrifugiranja (t) u odnosu na brzinu centrifuge (rpm) za različite visine stuba smješe u kiveti (R_b - R_t) = L; R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g/s cm^{-1}, ρ_{aq} = 1,0 g/cm^3 na 25 °C i ρ_s = 2,0 g/cm^3.

DIO VI
IIZRAČUNAVANJE ADSORBCIJE A (%) I DESORPCIJE D (%)

Vrijemenska skala postupka je:



Za sva izračunavanja ispitivana supstanca je stabilna i ne adsorbuje se značajno na zidove posude.

ADSORPCIJA A (%)

Paralelna metoda

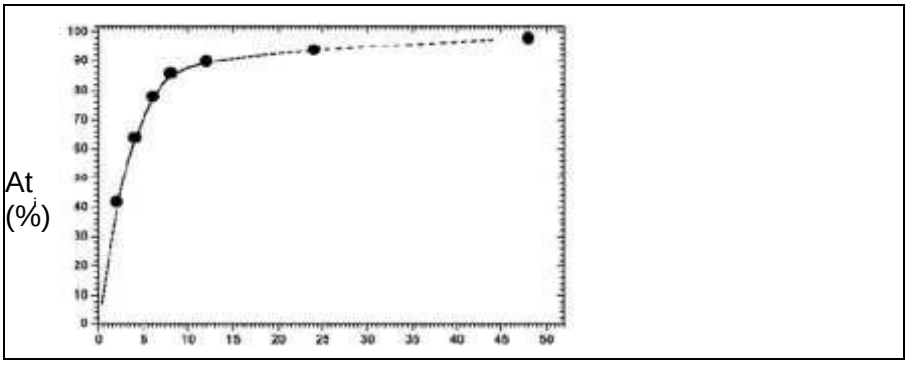
Procenat adsorpcije računa se za svaku ispitivanu posudu u kojoj se nalazi ispitivani uzorak (i), i to u svakoj od vremenskih tačaka (t_i), prema jednačini: $m^{sads}t^{i}$ 100 %. Uslovi iz ove jednačine se iizračunavaju na sljedeći način: $m_0 = C_0$ X V_0 [µg]. A_{ti} m_0

$m_s^{ads}t_i$ $m_0 C_{aq}^{ads}t_i$ V_0 g gdje je: A_{ti} procenat adsorpcije (%) u tački vremena t_i; $m_s^{ads}t_i$
masa (µg) ispitivane supstance u zemljištu u vremenu ti kada je analiza obavljena; m_0 masa (µg) ispitivane supstance u ispitivanoj posudi sa ispitivanom uzorkom, na početku ispitivanja; C_0 početna masena koncentracija (µg/cm3) ispitivanog rastvora koja se nalazi u dodiru sa zemljištem; $C_s^{ads}t_i$ masena koncentracija ispitivane supstance u tečnoj fazi u vremenu ti u kom je raĐena analiza (mg/cm^3); ova koncentracija određena je analitički uzimajući u obzir vrijednosti dobijene u slijepim probama; V_0 početna zapremina ispitivanom rastvora koji se nalazi u dodiru sa zemljištem (cm^3).

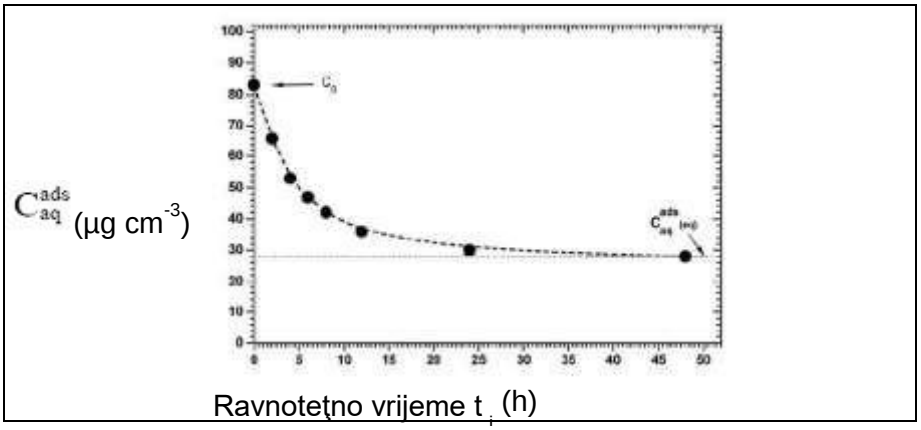
Vrijednosti procenta adsoprcije At_i ili C_s^{ads} grafički su dati u funkciji vremena, pa se određuje vrijeme potrebno da se dostigne ravnotežno stanje adsorpcije. Primjeri krivih dati su na Slici 1, odnosno

Slici 2.

Slika 1. Grafički prikaz ravnotežnog stanja adsorbcije



Slika 2. Masene koncentracije ispitivane supstanci u tečnoj fazi (C_{aq}) u funkciji vremena



Redna metoda

Sljedeće jednačine uzimaju u obzir da se adsorbcija prati mjerenjem ispitivane supstance u malim alikvotima tečne faze u definisanim vremenskim intervalima. Tokom svakog vremenskog intervala količina supstance koja se adsorbuje na zemljište računa se kao:

- za prvi interval vremena $\Delta t_1 = t_1 - t_0$ m $_{ads}^{s}$ □ t_1 □ m_0 $m_m^{ads} t_1$ □ $V v_{aA}^{0}$

- za drugi vremenski interval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$ m $_{s}^{ads}$ □*t*2 □ *mm*^{ads} *t*1 □ *V* $v_a A0$ *mmads t*2 □□□□□*V*_____0 *vaAvaA* □□□□

- za treći vremenski interval Δt3 = t3 - t2 m *adss* □*t*3 □ *mmads t*2 □□□□□*V*_____0 *vaAvaA* □□□□ *mmads t*3 □□□□□*V*_____0 *v2aA*□*vaA* □□□□

- za n-t_i interval $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$ m $_{s}^{ads}$ □t_n□ *mm*^{ads} *tn*1 □□□□_____*vaA* □□ *mmads tn* □□□□□_____*V*0 *vnaA*1*vaA* □□□□ Procenat adsorbcije u svakom vremenskom intervalu AΔt_i računa se prema formuli:

$A_{\square ti}$ □ _____ $^{msads\square ti}$ □100□%□. Dok se procenat adsorbcije (A_{ti}) u tački vremena t_i računa formulom: A m_0

M$_1$

□*msads j*

i□*M*^{1}

ti □ _____ □100□%□ Vrijednosti adsorbcije A_{ti} ili AΔt_i (u zavisnosti od potreba studije) grafički se m_0

prikazuju u funkciji vremena, a određuje se vrijeme nakon dostizanja ravnotežnog stanja adsorbcije.

U trenutku dostizanja ravnotežnog stanja t_{eq}:

- masa ispitivane supstance adsorbovana na zemljište je: $m\ adss\ eq = \sum_{i=1}^{n} msads \cdot ti \cdot t_i$

- masa ispitivane supstance u rastvoru je: $m^{ads}_{aq}\ eq = m_0 - \sum_{i=1}^{n} m_s^{ads} \cdot t_i \cdot t_i$

- procenat adsorbcije u ravnotežnom stanju je: $A = \frac{msadseq \cdot 100}{\%}$ gdje su: m *adss* (Δti), m *adss* m_s

(Δt_2)... m $^{ads}_{s}$ (Δt_n) masa (μg) supstance adsorbovane na zemljište u toku vremenskih intervala Δt_i, Δt_2... Δt_n; m $^{ads}_{m}$ (t_1), m $^{ads}_{m}$ (t_2)... m $^{ads}_{m}$ (t_n) masa (μg) supstance izmjerena u alikvotu V $_a^A$ u tačkama vremena t_1, t_2...t_n; m $^{ads}_{s}$ (eq) masa supstance adsorbovana na zemljište u ravnotežnom stanju adsorbcije (μg); m $^{ads}_{aq}\ eq$ masa supstance u rastvoru u ravnotežnom stanju adsorbcije (μg); V $_a^A$ zapremina alikvota u kome je mjerena ispitivane supstanca (cm^3); $A\Delta t_i$ procenat adsopcije u vremenskom intervalu Δti (%); $_{Aeq}$ procenat adsorpcije u ravnotežnom stanju adsorbcije (%).

DESORPCIJA D (%)

Početno vrijeme (t_0) ispitivanja kinetike desorpcije je trenutak (nakon postizanja ravnotežnog stanja adsorpcije) u kom je najveća zapremina rastvora ispitivane supstance zamijenjena jednakom zapreminom 0,01 M rastvora $CaCl_2$.

Paralelna metoda

U vremenu t_i masa ispitivane supstance u tečnoj fazi mjeri se iz i-te kivete (V $_r^i$), a desorbovana masa računa se formulom:

$m^{des}_{aq}\ t_1 = m_m^{des}\ t_1 - \frac{V}{V_r^0}\ m_{aq}^A$. U trenutku dostizanja ravnotežnog stanja desorpcije $t_i = t_{eq}$,

$m\ des_{aq}\ t_1 = m_{eq} des\ eq$.

Masa ispitivane supstance desorbovana u toku vremenskog intervala (Δt_i) je: $m = \sum_{i=1}$

$$desaq\ t_i = m_{aq}des\ t_i + m_{aq}des\ j \quad (j = 1)$$

Procenat desorpcije se računa:

- u tački vremena ti iz formule: $D_{ti} = \frac{m_{aq}des\ t_i}{mads\ eq} \cdot 100\%$

- u toku vremenskog intervala (Δt_i) iz formule: $D_{\Delta ti} = \frac{m_{aq}des\ \Delta t_i}{mads_{\ eq}} \cdot 100\%$ gdje je: Dt_i procenat (%)

desorpcije u tački vremena t_i; $D\Delta t_i$ procenat (%) desorpcije koji odgovara vremenskom intervalu Ati; m $^{des}_{aq}$ (t_i) masa (µg) ispitivane supstance desorbovana u tački vremena t_i; m $^{des}_{aq}$ (Δt_i) jmasa (µg) ispitivane supstance desorbovana u toku vremenskog intervala Δt_i m $^{des}_{aq}$ (t_i) masa (µg) ispitivane supstance analitički izmjerena u tački vrijeme t_i u rastvoru zapremine V^{i}_{r} koja je uzeta za analizu;

m $^{A}_{aq}$ masa (µg) ispitivane supstance koja preostaje nakon dostizanja ravnotežnog stanja adsorbcije zbog nekompletne izmjene zapremine;

m $^{A}_{aq}$ = m $^{ads}_{aq}$ $eq \cdot \frac{V}{V_0} \cdot V_g$ gdje je: m $^{ads}_{aq}$ eq (eq) masa (µg) ispitivane supstance u rastvoru u

trenutku dostizanja ravnotežnog stanja adsorbcije; V_R zapremina supernatanta uklonjena nakon postizanja ravnotežnog stanja adsorbcije i zamenjena istom zapreminom 0,01 M rastvora $CaCl_2$ (cm^3); V^{i}_{r} zapremina (cm^3) rastvora uzetog iz i-tekivete za mjerenje ispitivane supstance, u eksperimentu kinetike desorpcije.

Vrijednosti desorpcije Dt_i i $D\Delta t_i$ (u skladu sa potrebama situacije) grafički se prikazuje u funkciji vremena i određuje se vrijeme nakon kojeg se dostiže ravnotežno stanje desorpcije.

Redna metoda

Jednačine date u ovom dijelu uzimaju u obzir da je protokol ispitivanja adsorbcije koji je prethodio ovome, podrazumjevao mjerenje ispitivane supstance u malim alikvotima (V^{i}_{r}) tečne faze (tačka 1.9. ove metode). Podrazumjeva se da je: zapremina supernatanta, uklonjenog iz epruvete nakon ispitivanja kojim se proučavala kinetika adsorpcije, zamijenjen jednakom zapreminom 0,01 M rastvora $CaCl_2$ (V_R) i da je ukupna zapremina tečne faze koja je u dodiru sa zemljištem (V_T) u toku ispitivanja kojim se proučava kinetika desorpcije ostala nepromijenjena i data formulom:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} V_a^{A}\ i.$$ trenutku t_i:

i□1

-masa ispitivane supstance mjeri se u malim alikvotima V $_a^D$, a desorbovana masa se računa

primjenom formule: *maqdes ti* □ *mmdes ti* □□□□ *vVaDi* □□□□□ *maqA* □□□□□*V*

*r iVt*1□*vaD* □□□□ □

- u momentu dostizanja ravnotežnog stanja desorpcije $t_i = t_{eq}$, pa je m $_{aq}^{des}$ *t*$_i$ □ *m*$_{aq}^{des}$ *eq*

m^{aqdes} *t*^{i}

- procenat desorpcije D_t računa se iz sljedeće formule: *D*$_{ti}$ □ *mads* $_{eq}$□100□%□

s

U vremenskom intervalu (Δt_i):

- za prvi vremenski interval $\Delta t_1 = t_1 - t_0$, količina desorbovane supstance je:

maqdes □□*i* □ *mmdes t*1 □□□□ ^{V}*v*$_a$*T*$_D$ □□□□ *maqA* I *msdes t*1□ *msaq eqmaqdes* □*t*1 □

- za drugi vremenski interval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$, količina desorbovane supstance je:

maqdes □*t*2 □ *mmdes t*2 □□□□*vaD* □□ *maqdes* □*t*1 □□□□□*VT VTvaD* □□□□ *maqA*
□□□□□*VT VT vaD* □□□□ I *VT* □□
□

m$_s$*des t*$_2$ □ *m*$_s$*adseq*□*m*$_{aq}$*des* □*t*$_1$ *m*$_{aq}$*des* □*t*$_2$ □

- za n-ti vremenski interval $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$, količina desorbovane supstance je:

□*V* □

maqdes □*tn* □□*mmdes tn* □□□□*vaTD* □□□ *maqA* □□□□□*VT VnT*1*vaD* □□□□
i□□*n*1,*n*1□1□□□□*VT nvaA i*□*vaD* □*maqdes* □*ti* □□□□I
□
n

msdes tn □ *msadseq* □*maqdes*□*ti*
i□1,*n*□1

Na kraju, procenat desorpcije u svakom vremenskom intervalu $D_{\Delta ti}$ se računa pomoću sljedeće *m*$_{aq}$*des* □*t*$_i$
formule: *D*$_{□ti}$ □ *m*$_{sads\ eq}$ □100□%□ Procenat desorpcije u vremenu t_i je:

□*ti*

D$_{ti}$ □
^{j}□□*m*□^{t}1$_{sads}$*maq*
des$_{eq}$*j*□100 □

$_{m}msadsaqdes_{eq}ti$ □100□%□ gdje su navedeni parametri: *des ti* , *msdes* (Δt2)... *ms* □

m_s^{des} (Δt_n) masa (µg) supstance koja ostaje adsorbovana na zemljištu nakon vremenskih intervala Δt_i, Δt_2... Δt_n; m_{aq}^{des} (Δt_i), m_{aq}^{des} (Δt_2)... m_{aq}^{des} (Δt_n) masa (µg) ispitivane supstance desorbovana u toku vremenskih intervala Δt_i, Δt_2... Δt_n; m_m^{des} (t_1), m_m^{des} (t_2)... m_m^{des} (t_n) masa (µg) supstance izmjerena u alikvotima u tačkama vremena t_i, t_2... t_n; V_T ukupna zapremina tečne faze u kontaktu sa zemljištem u toku ispitivanja kinetike desorpcije izvedenog rednom metodom (cm^3); m_{aq}^{A} masa (µg) ispitivane supstance koja ostaje nakon dostizanja ravnotežnog stanja adsorbcije zbog nekompletne izmjene

□□□□V_0 □n v_aA i□□$\tilde{}$$VR$ □□

zapremine; m_{aq}^{A} □□□_____□ i□1 n □

□□□m_{aq}^{ads} *eq* gdje je V_R zapremina supernatanta uklonjena

□□ V_0 □v_a^A i □□

□ i□1 □

iz epruvete nakon postizanja ravnotežnog stanja adsorbcije i zamenjena istom zapreminom 0,01 M rastvora $CaCl_2$ (cm^3); v_a^D zapremina (cm^3) alikvota uzetog iz i-te epruvete za analizu u toku ispitivanja kinetike desorpcije izvedenog rednom metodom; v_a^D □ 0.02□V_T

Dio VII
ADSORPCIJA - DESORPCIJA U ZEMLJIŠTU: FORMULARI ZA IZVJEŠTAJ

Ispitivano zemljište:

Sadržaj suve mase zemljišta (105°C, 12 sati):	%
Temperatura:	°C

PRILADNOST ANALITIČKE METODE

Težina zemljišta	g
Zemljište: suva masa	g
Zapremina $CaCl_2$sol.	cm^3
Nominalna koncentracija finalnog rastvora	µg/cm^3
Analitička koncentracija finalnog rastvor	µg/cm^3

Princip korišćene analitičke metode:
Kalibracija analitičke metode: Ispitivana supstanca: Ispitivano zemljište:

Sadržaj suve mase zemljišta (105°C, 12 sati):.	% °C

Temperatura:

Praćena analitička metodologija:	Indirektna	Paralelna	Redna
	Direktna		

Simbol	Jedinica mjere	Vrijeme dostizanja ravnotežnog stanja	Vrijeme dostizanja ravnotežnog stanja		Vrijeme dostizanja ravnotežnog stanja		Vrijeme dostizanja ravnotežnog stanja	
Epruveta br.								
Težina zemljišta	-	g						
Zemljište: suva masa	$m_{zemljišta}$	g						
Zapremina vode u izvaganog zemljištu izračunata)	V_{WS}	cm^3						
Zapremina 0.01 M$CaCl_2$ rastvora za ravnotežu zemljišta		cm^3						
Zapremina osnovnog rastvora		cm^3						

Metode ispitivanja adsorpcije: ispitivani uzorci

(

Ukupna zapremina tečne faze u dodiru sa zemljištem	V_0	cm^3						
Početna koncentracija ispitivanog rastvora	C_0	$\mu g/cm^3$						
Masa ispitivane supstance na početku ispitivanja	m_0	µg						
Nakon miješanja i centrifugiranja								
INDIREKTNA METODA								
Paralelna metoda								
Koncentracija ispitivane supstance u tečnoj fazi (uključujući i slijepu probu)	C $ads_{aq}\,t_i$	$\mu g/cm^3$						
Redna metoda								
Izmjerena masa ispitivane supstance u alikvotima V $_a^A$	m $ads_m\,t_i$	µg						
DIREKTNA METODA								
Masa ispitivane supstance adsorbovane na zemljište	m $ads_s\,t_i$	µg						
Iizračunavanje adsorpcije								
Adsorpcija	At_i	%						
	$A\Delta t_i$	%						
Srednja vrijednost								
Konstanta adsorpcije	K_d	cm^3/g						
Srednja vrijednost								

Konstanta adsorpcije	K_{oc}	cm^3/g						
Srednja vrijednost								

Ispitivana supstanca:

Ispitivano zemljište:

Sadržaj suve mase zemljišta (105°C, 12 sati):	%
Temperatura: ..	°C

Metode ispitivanja adsorpcije: slijepe probe i kontrolni uzorci

	Simbol	Jedinica mjere	Slijepa proba		Slijepa proba		Kontrola	
Epruveta br.								
Težina zemljišta		g					0	0
Sadržaj vode u izmjerenom zemljištu (izračunato)		cm^3						
Dodata zapremina 0.01 M rastvora $CaCl_2$		cm^3						
Dodata zapremina osnovnog rastvora ispitivane supstance		cm^3	0	0				
Ukupna zapremina tečne faze (izračunato)		cm^3					-	-
Početna koncentracija ispitivane supstance u tečnoj fazi		cm^3						
Nakon miješanja i centrifugiranja								
Koncentracija u tečnoj fazi		$\mu g/cm^3$						

Napomena: Ako je potrebno dodati kolone.

Ispitivana supstanca:

Ispitivano zemljište:

Sadržaj suve mase zemljišta (105°C, 12 sati):	%
Temperatura:	°C

Maseni balans

	Simbol	Jedinica mjere				
Epruveta br.						
Težina zemljišta	-	g				
Zemljište: suva masa	$m_{zemljišta}$	g				
Zapremina vode u odmjerenom zemljištu (izračunato)	V_{WS}	ml				
Zapremina 0.01 M rastvora $CaCl_2$ za uravnoteženo		ml				

zemljište						
Zapremina osnovnog rastvora		cm^3				
Ukupna zapremina tečne faze u kontaktu sa zemljištem	V_0	cm^3				
Početna koncentracija ispitivanog rastvora	C_0	$\mu g/cm^3$				
Vrijeme dostizanja ravnotežnog stanja	-	h				
Nakon miješanja i centrifugiranja						
Koncentracija ispitivane supstance u tečnoj fazi u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja uključujući korekciju za slijepu probu	C ads_{aq} eq	$\mu g/cm^3$				
Vrijeme dostizanja ravnotežnog stanja	teq	h				
Prvo razblaživanje sa rassupstancaačem						
Uklonjena zapremina tečne faze	V_{rec}	cm^3				
Dodata zapremina rassupstancaača	ΔV	cm^3				
Prva ekstrakcija rassupstancaačem						

Signal analiziran u rassupstancaaču	S_{E1}	var.				
Koncentracija ispitivane supstance u rassupstancaaču	C_{E1}	µg/cm^3				
Masa supstance ekstrahovane iz zemljišta i sa zidova Eksperimentalnih posuda	m_{E1}	µg				
Drugo razblaživanje sa rassupstancaačem						
Uklonjena zapremina tečne faze	ΔV_s	cm^3				
Dodata zapremina rassupstancaača	ΔV_a	cm^3				
Druga ekstrakcija rassupstancaačem						
Signal analiziran u rassupstancaaču	S_{E21}	var.				
Koncentracija ispitivane supstance u rassupstancaaču	C_{E21}	µg/cm^3				
Masa supstance ekstrahovane iz zemljišta i sa zidova Ispitivanih posuda	m_{E21}	µg				
Ukupna masa ispitivane supstance ekstrahovana u dva koraka	m_E	µg				
Maseni balans	MB	%				

Ispitivana supstanca:

Ispitivano zemljište:

Sadržaj suve mase zemljišta (105°C, 12 sati):	%
Temperatura:	°C

Adsorpcione izoterme

	Simbol	Jedinica mjere						
Epruveta br.								
Težina zemljišta	-	g						
Zemljište: suva masa	E	g						

Sadržaj v ode u izmjerenom zemljištu (izračunato)	V_{WS}	cm^3						
Dodata zapremina 0.01 M rastvora $CaCl_2$		cm^3						
Dodata zapremina osnovnog rastvora ispitivane supstance		cm^3	0	0				
Ukupna zapremina tečne faze (izračunato)	V_0	cm^3						
Koncentracija rastvora	C_0	cm^3						
Vrijeme za dostizanje ravnotežnog stanja	-	h						
Nakon miješanja i centrifugiranja								
Koncentracija supstance u tečnoj fazi uključujući i korekciju na slijepu probu	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg/cm^3						
Temperatura		°C						
Adsorbovana masa po jedinici zemljišta	$C_s^{ads}(eq)$	µg/cm^3						

Regresiona analiza:

Vrijednost K^{ads}_F:

Vrijednost l/n:

Regresioni koeficijent r^2:

Ispitivana supstanca:

Ispitivano zemljište:

%

Sadržaj suve mase zemljišta (105°C, 12 sati):
Temperatura: .

°

Praćena analitička metodologija:	Indirektna	Paralelna	Redna

Ispitivanje desorpcije

		Simbol	Jedinica mjere	Vremenski interval	Vremenski interval	Vremenski interval	Vremenski interval
Epruveta br. (iz adsorcionog koraka)							
Masa supstance adsorbovana na zemljište u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja		$_{m}des_{m}t_{i}$	µg				
Uklonjena zapremina tečne faze, zamenjena 0.01 M rastvorom $CaCl_2$		V_R	cm^3				
Ukupna zapremina tečne faze u kontaktu sa zemljištem	PM	V_0	cm^3	0	0		
	SM	V_T	cm^3				
Masa ispitivane supstance zaostala nakon dostizanja ravnotežnog stanja adsorbcije usled nekompletne izmjene zapremine		m *aqA*	µg				
Kinetika desorpcije							
Izmjerena masa supstance desorbovana u vremenu t_i		$_{m}des_{m}t_{i}$	µg				
Zapremina rastvora uzetog iz kivete (i) za mjerenje ispitivane supstance	PM[57]	V *ir*	cm^3				
	SM[58]	V *aD*	cm^3				
Masa supstance desorbovane sa zemljišta u vremenu ti (izračunato)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	g				
Masa supstance desorbovane sa zemljišta u vremenskom intervalu ti (izračunato)		m *desaq ti*	g				

[57] paralelna metoda

[58] redna metoda

Procenat desorbcije						
Desorpcija u vremenu t_i	Dt_i	%				
Desorpcija u vremenskom intervalu Δt_i	$D\Delta t_i$	%				
Prividni koeficijent desorbcije	K_{des}					

C.19. ODREĐIVANJE KOEFICIJENTA ADSORPCIJE (Koc) NA ZEMLJIŠTU I OTPADNOM MULJU UPOTREBOM TEČNE HROMATOGRAFIJE VISOKIH PERFORMANSI (HPLC)

DIO I

1. Metoda ispitivanja

Određivanje koeficijenta adsorpcije (Koc) na zemljištu i otpadnom mulju upotrebom tečne hromatografije visokih performansi (HPLC) se zasniva na OECD TG121 (2000) uputstvu ispitivanja.

1.1. Uvod

Adsorpciono ponašanje supstanci u zemljištu, odnosno otpadnim muljevima, opisuju parametri koji se određuju metodom ispitivanja C.18. Važan parametar je adsorpcioni koeficijent koji se definiše kao odnos između koncentracije supstance u zemljištu/mulju i koncentracije supstance u vodenoj fazi u ravnotežnom stanju adsorpcije. Koeficijent adsorpcije normalizovan na sadržaj organskog ugljenika u zemljištu (u daljem tekstu: K_{oc}) je pokazatelj kapaciteta vezivanja hemikalije za organsku materiju zemljišta odnosno otpadnog mulja i omogućava međusobno poređenje različitih hemikalija. Ovaj parametar se utvrđuje putem korelacija sa rastvorljivošću supstance u vodi i njenim koeficijentom raspodjele u sistemun-oktanol/voda.

Za utvrĐivanje koeficijenta adsorpcije u zemljištu i otpadnom mulju, koristi se tečna hromatografija visokih performansi (u daljem tekstu: HPLC). Ove procjene su pouzdanije od onih dobijenih QSAR iizračunavanjima. Kao metoda koja služi za procjenu, ona ne može u potpunosti da zamijeni studije ravnotežnog stanja iz metode C.18. koja je data u ovom prilogu. UtvrĐeni K_{oc} može biti od koristi pri izboru adekvatnih parametara za ispitivanje adsorpcije/desorpcije prema metodi C.18. Primjenom jednačine iz dijela 1.2. ove metode iizračunava se koeficijent raspodjele, odnosno Frojndlihova konstanta adsorpcije.

1.2. Definicije

Koeficijent raspodjele (u daljem tekstu: K_d) je odnos između ravnotežnih koncentracija (C) ispitivane supstance, rastvorene u dvofaznom sistemu koji se sastoji od sorbensa (zemljište ili otpadni mulj) i vodene faze. Ukoliko se koncentracije u obije faze iskažu kao težinski odnos, ova vrijednost je broj bez jedinice mjere. Ako se koncentracija u vodenoj fazi iskazuje kao odnos težine i zapremine, jedinice u kojima će biti iskazan K_d su ml/g. K_d varira u zavisnosti od sorpcijskih svojstava i zavisi od koncentracije.

$C^{zemljista}$ C^{mulja}

K_d= _____ ili K_d=_____ gdje je: $C_{zemljišta}$ koncentracija (µg/g) ispitivane supstance u zemljištu u
Caq *Caq*
trenutku dostizanja ravnotežnog stanja; C_{mulja} koncentracija (µg/g) ispitivane supstance u mulju u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja; C_{aq} koncentracija (µg/g, µg/ml) ispitivane supstance u vodenoj fazi u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja.

Frojndlihova konstanta adsorpcije (u daljem tekstu: K_f) jeste koncentracija ispitivane supstance u zemljištu, odnosno otpadnom mulju (x/m) u trenutku kada ravnotežna koncentracija C_{aq} u vodenoj fazi iznosi jedan. K_f se izražava u µg/g sorbensa. U zavisnosti od svojstava sorbensa, njegova vrijednost može varirati. $\frac{h}{m} = K_f \cdot C_{aq}^{\frac{1}{n}}$ gdje je: h/m količina ispitivane supstance h (µg), adsorbovane na
$\log \frac{h}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \log C_{aq}$
količinu sorbensa m (g) u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja; 1/n nagib Frojndlihove adsorpcione izoterme; C_{aq} koncentracija (µg/g) ispitivane supstance u vodenoj fazi u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja.

$\frac{h}{m}$
AtC$_{aq}$=1; logK_f=log

Koeficijent adsorpcije (u daljem tekstu: K_{oc}) je normalizovan K_d, odnosno K_f, na sadržaj organskog ugljenika (f_{oc}) u sorbensu. K_{oc} je posebno u slučaju nejonizovanih hemikalija, približni pokazatelj obima adsorpcije između supstance i sorbensa i omogućava međusobno poređenje različitih hemikalija. U zavisnosti od veličine K_d i K_f, K_{oc} je broj bez jedinice mjere ili je iskazan u ml/g ili u µg/g organske materije.

$\overline{K^d}$ bez jedinice mjere ili u ml/g, odnosno K_{oc}= $\overline{K^f}$ □□*g* / *g*□
K_{oc}=
foc *foc*

Odnos između K_{oc} i K_d nije linearan, pa vrijednosti K_{oc} variraju od zemljišta do zemljišta, ali je njihova varijabilnost znatno manja u poređenju sa varijabilnošću vrijednosti K_d, odnosno K_f. K_{oc} se izvodi dedukcijom iz faktora kapaciteta (k_) upotrebom kalibracione krive u kojoj je log k_ iskazan u odnosu na log K_{oc} izabranih referentnih jedinjenja.

K‘= $\frac{t_R - t_0}{t_0}$ gdje je: t_R vrijeme (minuti) zadržavanja ili retenciono vrijeme ispitivane i referentne supstance, koje se bilježi pri HPLC; t_0 HPLC "mrtvo vrijeme" u minutima (tačka 1.8.2. ove metode).

K_{ow} koeficijent raspodjele u sistemu n-oktanol/voda, odnos između koncentracija supstance rastvorene u n-oktanolu i one rastvorene u vodi. Ova vrijednost iskazuje se kao broj bez jedinice mjere.

_____ *Cok* tanol k_{ow}

Pow= C_{aq}

1.3. Referentne supstance

Prije upotrebe ove metode neophodno je poznavati strukturnu formulu, čistoću i konstantu disocijacije (ako je primjereno) ispitivane supstance, kao I podatke o rastvorljivosti, podionom koeficijentu oktanol-voda i svojstvima hidrolize ispitivane supstance.

Da bi izmjereni podaci o retencionom vremenu ispitivane supstance, dobijeni primjenom HPLC, korelirali sa adsorpcionim koeficijentom K_{oc}, izraditi kalibracionu krivu u kojoj je log Koc iskazan u odnosu na log k. Upotrijebiti najmanje šest referentnih tačaka, od kojih najmanje jednu iznad i jednu ispod očekivane vrijednosti ispitivane supstance. Tačnost metode se povećava ukoliko se koristi referentna supstanca koja je po strukturi bliska ispitivanoj supstanci. Ako takvi podaci nisu dostupni, izbor primjerenih kalibracionih supstanci predstavlja odgovornost lica koje izvodi ispitivanje. U tom slučaju izabrati opšte primjenljiv set supstanci. Supstance i vrijednosti K_{oc} koje se ovom prilikom upotrebljavaju koriste se i u ispitivanju otpadnog mulja, a date su u Tabeli 1. iz Dijela I ove metode. Ostale, koje se koriste u ispitivanju zemljišta date su u Tabeli 3. iz Dijela I ove metode. Izbor drugih kalibracionih supstanci obrazložiti.

1.4. Princip metode

HPLC se izvodi na analitičkim kolonama koje se pakuju zajedno sa tržišno dostupnom cijanopropilnom čvrstom fazom, koja sadrži lipofilne i polarne grupe. Za ove namjene koristi se umjereno polarna stacionarna faza čiju osnovu čini silikagel: - O – Si – silikagel, - CH_2 - CH_2 - CH_2 - nepolarni dio I – CN - polarni dio.

Princip metode sličan je metodi ispitivanja A.8. koja je data u ovom pravilniku (podioni koeficijent, HPLC metoda ispitivanja). Dok prolazi kroz kolonu zajedno sa mobilnom fazom, ispitivana supstanca ossupstancauje interakciju sa stacionarnom fazom. Kao rezultat raspodjele između mobilne i stacionarne faze, ispitivana supstanca se zadržava, tj. njen prolaz kroz kolonu se usporava. Dvojaki sastav stacionarne faze, tj. postojanje polarnih i nepolarnih grupa, omogućava interakciju polarnih i nepolarnih grupa molekula, sličnu onoj koja se zbiva pri interakciji sa organskom materijom u okolnostima kada matriks čini zemljište, odnosno otpadni mulj. Ovo omogućava uspostavljanje odnosa između vremena retencije na koloni i koeficijenta adsorpcije na organsku materiju.

Vrijednost pH ima značajan uticaj na adsorpciono ponašanje supstanci, pogotovo polarnih. Ako se radi o poljoprivrednim zemljištima, odnosno otpadnom mulju sa postrojenja za obradu komunalnih otpadnih voda, pH se najčešće kreće između 5,5 i 7,5 jedinica. Ako se radi o supstancama podložnim jonizaciji, ispitati i njihov jonizovani i nejonizovani oblik u adekvatnim puferima, ali samo u slučaju kada će se pri pH 5,5 do 7,5 disosovati barem 10% ispitivane supstance.

Kako se pri vrednovanju koristi odnos između retencije na HPLC koloni i koeficijenta adsorpcije, ne primjenjivati bilo kakvu kvantitativnu analitičku metodu, ali odrediti retenciono vrijeme. Ukoliko je na rapolaganju prikladan set referentnih supstanci i ako se ispitivanje izvodi u standardnim ispitivanim uslovima, ova metoda predstavlja brz i efikasan način određivanja koeficijenta adsorpcije K_{oc}.

1.5. Primjenljivost metode

HPLC metoda je primjenljiva na hemijske supstance (označene i neoznačene) za koje je dostupan adekvatan sistem detekcije (npr. spektrofotometar, detektor radioaktivnosti) i koje su u toku trajanja ispitivanja dovoljno stabilne. Metoda je korisna za ispitivanje hemikalija koje je teško proučavati u drugim ispitivanim sistemima (npr. isparljive supstance; supstance koje u vodi nisu rastvorljive u koncentraciji koja bi bila analitički mjerljiva; supstance koje imaju afinitet za površine inkubacionih sistema). Metoda se upotrebljava za ispitivanje smješa koje pri eluaciji ssupstancaaju nerastvorne veze. U ovom slučaju navesti gornje i donje granične vrijednosti log K_{oc} jedinjenja koja čine ispitivanu smješu.

Pri tumačenju rezultata dobijenih HPLC metodom, probleme pričinjavaju nečistoće, ali dokle god se ispitivana supstanca jasno i nedvosmisleno analitički određuje i od njih odvaja, ovi problemi nisu od značaja. Metoda je vrednovana za supstance date u Dijelu II Tabela 1 ove metode, a bila je primjenjena i pri ispitivanju niza drugih hemikalija, koje spadaju u sljedeće hemijske grupe:

a) aromatični amini (npr. trifluralin, 4-hloroanilin, 3,5-dinitroanilin, 4-metilanilin, nmetilanilin, 1-naftilamin);
b) aromatične estere karboksilne kiseline (npr. metilester benzoeve kiseline, etilester
3,5-dinitrobenzoeve kiseline);
c) aromatične ugljovodonike (npr. toluen, ksilen, etilbenzen, nitrobenzen);
d) estre ariloksifenoksipropionske kiseline (npr. diklofop-metil, fenoksaprop-etil, fenoksaprop-P-etil);
e) fungicide iz grupa benzimidazola i imidazola (npr. karbendazim, fuberidazol, triazoksid);
f) amide karboksilne kiseline (npr. 2-hlorobenzamid, N,N-dimetilbenzamid, 3,5dinitrobenzamid, n-metilbenzamid, 2-nitrobenzamid, 3-nitrobenzamid);
g) hlorovane ugljovodonike (npr. endosulfan, DDT, heksahlorobenzen, kvintozen, 1,2,3trihlorobenzen);
h) organofosfatne insekticide (npr. azinfos-metil, disulfoton, fenamifos, izofenfos, pirazofos, sulprofos, triazofos);
i) fenole (npr. fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentahlorofenol, 2,4,6-trihlorofenol, 1naftol);
j) derivate fenilureje (npr. izoproturon, monolinuron, pensikuron);
k) pigmentne boje (npr. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81);
l) poliaromatične ugljovodonike (npr. acenaften, naftalen);
m) 1,3,5-triazinske herbicide (npr. prometrn, pruočin, simazin, terbutrin);
n) derivate triazola (npr. tebukonazol, triadimefon, tradimenol, triapentenol).

Metoda se ne primjenjuje za ispitivanje supstanci koje reaguju sa efluentom ili sa stacionarnom fazom. Nije primjenljiva ni za ispitivanje supstanci koje ulaze u interakciju sa neorganskim sastojcima na specifičan način (npr. kompleksiranje sa mineralima iz gline). Metoda je neadekvatna za površinski aktivne supstance, neorganska jedinjenja i umjerene ili jake organske kiseline i baze. Njome je moguće odrediti log K_{oc} vrijednosti koje se kreću u opsegu od 1,5 do 5,0. Supstance podložne jonizaciji se mjere pomoću puferisane mobilne faze, uz mjere opreza kako ne bi došlo do precipitacije komponenti pufera ili ispitivane supstance.

1.6. Kriterijumi kvaliteta

1.6.1. Tačnost

U normalnim uslovima koeficijent adsorpcije ispitivane supstance određuje se do unutar ± 0,5 log jedinice vrijednosti utvrĐene metodom ravnotežnog stanja (Dio II Tabela 1. ove metode). Tačnost se povećava upotrebom referentnih supstanci strukturno bliskih ispitivanoj supstanci.

1.6.2. Ponovljivost

Određivanja obavljati najmanje u duplikatu. Vrijednosti log K_{oc} izvedene iz pojedinačnih mjerenja ne smiju varirati za više od 0,25 log jedinica.

1.6.3. Obnovljivost

Ispitivanje HPLC metode ispitivanja, kojom je obuhvaćeno 48 supstanci (većinom pesticida) o čijem K_{oc} na zemljištima postoje pouzdani podaci, rezultiralo je koeficijentom korelacije od R = 0,95[59]. Da bi se ova metoda unaprijedila i vrednovala uraĐeno je meĐulaboratorijasko poređenje u kojem je učestvovalo 11 laboratorijaa. Rezultati su dati u Dijelu II Tabela 2. ove metode.

1.7. Opis metode

1.7.1. Preliminarno utvrĐivanje koeficijenta adsorpcije

Kod nejonizovanih supstanci kao pokazatelji obima adsorpcije koriste se podioni koeficijent oktanol-voda P_{ow} (= K_{ow}) i do određene mjere rastvorljivost u vodi. Ovi parametri se koriste i za preliminarno pronalaženje opsega koncentracija ispitivane supstance. Za nekoliko grupa hemikalija objavljeno je niz korisnih korelacija.

1.7.2. Aparatura

Potrebno je imati tečni hromatograf na koji je priključena nepulsirajuća pumpa i pogodan uređaj za detekciju. Koristi se i ventil za ubrizgavanje sa injekcijskom petljom. Upotrebljavaju se na tržištu dostupne cijanopropilne kolone sa podlogom od silikagela (npr. Hypersil i Zorbax CN). Između sistema za ubrizgavanje i analitičke kolone postavi se zaštitna kolona od istog materijala. Kolone različitih dobavljača variraju u efikasnosti razdvajanja. Treba težiti da se dostignu sljedeći faktori kapaciteta k': log $k_{=}$ > 0,0 za log K_{oc} = 3,0 i log $k_{=}$ > -0,4 za log K_{oc} = 2,0 kada se kao mobilna faza koristi metanol/voda u odnosu od 55% prema 45%.

1.7.3. Mobilne faze

Ispitano je nekoliko mobilnih faza i koriste se: metanol/voda (55/45% zapreminskih%); i metanol/0.01 M citratni pufer pH 6,0 (55/45% v/v).

Za pripremanje rassupstancaača za eluaciju koriste se metanol HPLC čistoće i destilovana voda ili citratni pufer. Prije upotrebe iz smješe se odstranjuje gas. Eluacija je izokratična. Ako nije primjereno upotrijebiti smješe metanola i vode, pokušati i sa drugim smješama

[59] Howes, D., Guy, R., Hadgraft, J., Heylings, J.R. et al. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10. Schaefer, H. and Redelmeier, T.E., (1996). Skin barrier: principles of percutaneousabsorption. Karger, Basel. (12) Roberts, M.S. and Walters, K.A., (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

organskog rassupstancaača/vode, npr. smješama etanola/vode ili acetonitrila/vode. Za jedinjenja podložna jonizaciji koriste se puferi kako bi se stabilizovala pH vrijednost. Preduzeti mjere opreza kako bi se izbjegla precipitacija soli i propadanje kolone koji se javljaju pri upotrebi nekih smješa organske faze i pufera.

Pri izvoĐenju ove metode ne koristiti aditive kao što su reagensi na bazi jonskih parova, s obzirom na njihov mogući uticaj na sorpcijska svojstva stacionarne faze. Ovakve promjene stacionarne faze su ireverzibilne, pa se ispitivanja u kojima se koriste aditivi obavezno obavljaju na odvojenim kolonama.

1.7.4. Rastvorljive supstance

Ispitivane supstance i referentne supstance rastvoriti u mobilnoj fazi.

1.8. IzvoĐenje metode

1.8.1. Ispitivani uslovi

Tokom mjerenja bilježiti temperaturu. Koriste se uređaji u kojima je temperatura dijela sa kolonama kontrolisana, kako bi se garantovalo da su uslovi pod kojima su obavljeni kalibracija, utvrĐivanje prirode ispitivane supstance i njeno mjerenje u toku trajanja cijelog ispitivanja bili nepromijenjeni.

1.8.2. Određivanje "mrtvog vremena" t_0

Za određivanje "mrtvog vremena" t_0 (kada vršna vrijednost ispitivane supstance dostigne i aktivira detektor) koriste se dvije metode (tačka 1.2. ove metode).

1.8.2.1. Određivanje "mrtvog vremena" t_0 homolognim serijama

Dokazano je da primjena ovog postupka rezultira pouzdanim i standardizovanim t_0 vrijednostima (metoda A.8: koeficijent raspodjele u sistemun-oktanol/voda; HPLC metoda ispitivanja koja je data u ovom prilogu).

1.8.2.2. Određivanje "mrtvog vremena" t_0 inertnim supstancama koje kolona ne zadržava

Ova tehnika ubazirajuna je na ubrizgavanju rastvora formamida, uree ili natrijum nitrata. Mjerenja obaviti najmanje u duplikatu.

1.8.3. Određivanje retencionih vremena t_R

Referentne supstance izabrati na način opisan u dijelu 1.3. ove metode i ubrizgati kao standardnu smješu, kako bi se utvrdilo njihovo retenciono vrijeme, pod uslovom da je potvrĐeno da na retenciono vrijeme ni jednog od referentnih standarda ne utiče prisutnost ostalih. Kalibraciju obavljati u pravilnim vremenskim razmacima, najmanje dva puta dnevno, kako bi se uzele u obzir neočekivane promjene u efikasnosti kolone. U cilju postizanja najboljih rezultata i prevencije otklona u retencionim vrijemenima, kalibracija se vrši prije i

nakon ubrizgavanja ispitivane supstance. Ispitivane supstance se ubrizgavaju posebno u najmanjim mogućim količinama (kako bi se izbjeglo preopterećenje kolone), a potom se određuju njihova retenciona vremena.

Da bi mjerenja bila pouzdanija, određivanja se obavljaju najmanje u duplikatu. Vrijednosti log K_{oc} izvedene iz pojedinačnih mjerenja ne variraju za više od 0,25 log jedinica.

1.8.4. Procjena

Faktori kapaciteta k‘ računaju se iz "mrtvog vremena" i retencionih vremena t_R izabranih referentnih supstanci, u skladu sa jednačinom iz dijela 1.2. ove metode. Podaci o log k‘ referentnih supstanci se potom grafički prikazuju u odnosu na vrijednosti njihove l_{og} K_{oc}, dobijene metodom ravnotežnog stanja navedene u Dijelu II Tabele 1 i 3 ove metode. Potom se koristeći krivu za određivanje vrijednosti log K_{oc} supstance upotrebi vrijednost log $k_{=}$. Ukoliko konkretni rezultati pokažu da se log K_{oc} ispitivane supstance nalazi izvan kalibracionog opsega, ispitivanje ponoviti koristeći druge primjerenije referentne supstance.

2. Podaci i izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži:

- identitet ispitivane i referentnih supstanci i njihove hemijske čistoće i ukoliko je od značaja vrijednosti pK_a;
- opis opreme i uslova ispitivanja, tj. vrste i veličine analitičke (i zaštitne) kolone, načina detekcije,

mobilne faze (odnos sastojaka i pH), temperaturnog opsega u toku mjerenja;

- "mrtvo vrijeme" i metoda kojom je odreĐivano;
- količine ispitivane i referentnih supstanci ubrizganih u kolonu;
- retenciona vremena referentnih sastojaka korišćenih za kalibraciju;
- detalji o prilagoĐenoj regresionoj pravoj (log k‘ prema log K_{oc}) i grafički prikaz regresione prave;
- prosječne podatke o retenciji i procjenjen d log K_{oc} vrijednosti ispitivanih jedinjenja; - hromatogrami.

Dio II

TABELA 1: POREĐENJE K_{OC} VRIJEDNOSTI ZA ZEMLJIŠTA I KANALIZACIONI MULJ I VRIJEDNOSTI DOBIJENE HPLC METODOM

Referentna supstanca	CAS br.	log K_{oc} otpadne vode	log K_{oc}	Δ	log Koc zemljišta	log K_{oc} HPLC	Δ
Atrazin	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fention	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantren	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Fenilester benzoeve kiseline	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07

Benzamid	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobenzamid	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilid	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilin	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Dihloranilin	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2.58	0,03

Tabela 2: rezultati međulaboratorijskog poređenja (11 laboratorijaa) obavljenog u cilju poboljšanja i validacije hplc-metode[83]

Referentna supstanca	CAS-br.	log K_{oc} (OECD 106)	K_{oc} (HPLC - metoda)	log K_{oc}
Atrazin	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapentenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fention	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

Tabela 3: preporučene referentne supstance za hplc metodu na osnovu podataka o adsorpciji u zemljištu

Referentna supstanca	CAS-br.	log K_{oc} srednje vrijednosti metode ravnotežnog stanja	Br. podataka o K_{oc}	log S.D.	Izvor
acetanilid	103-84-4	1,25	4	0,48	84
fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	XXV
2-nitrobenzamid	610-15-1	1,45	3	0,90	85
N,N-dimetilbenzamid	611-74-5	1,52	2	0,45	XXV
4-metilbenzamid	619-55-6	1,78	3	1,76	XXV
metilbenzoat	93-58-3	1,80	4	1,08	XXV
atrazin	1912-24-9	1,81	3	1,08	86
izoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	XXVII
3-nitrobenzamid	645-09-0	1,95	3	1,31	XXVI
anilin	62-53-3	2,07	4	1,73	XXV
3,5-dinitrobenzamid	121-81-3	2,31	3	1,27	XXV
karbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	XXVII

triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	XXVII
triazoksid	72459-58-6	2,44	3	1,66	XXVII
triazofos	24017-47-8	2,55	3	1,78	XXVII
linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	XXVII
naftalen	91-20-3	2,75	4	2,20	XXV
endosulfan-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	XXVII
metiokarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	XXVII
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	XXV
1,2,3-trihlorobenzen	87-61-6	3,16	4	1,40	XXV
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	XXV
fention	55-38-9	3,31	3	2,49	XXVII
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	XXV
pirazofos	13457-18-6	3,65	3	2,70	XXVII
(-endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	XXVII
diklofop-metil	51338-27-3	4,20	3	3,77	XXVII
fenantren	85-01-8	4,09	4	3,83	XXV
Basic Blue 41(smješa)	26850-47-5 12270-132	4,89	4	4,46	XXV
DDT	50-29-3	5,63	1	-	XXVI

C.20. METODA ISPITIVANJA TOKSIČNOSTI PO REPRODUKCIJU VRSTE **DIO I**

Daphnia magna

1. Metoda ispitivanja

Metoda ispitivanja toksičnosti po reprodukciju vrste se zasniva na OECD TG 211 (1998) uputstvu ispitivanja.

1.1. Uvod

Osnovni cilj metode ispitivanja toksičnosti po reprodukciju je procjena uticaja hemikalija na reprodukciju Daphnia magna.

1.2. Definicije i mjerne jedinice

Ispitivane jedinke su ženke dafnije koje su na početku ispitivanja u stadijumumumu neonate i kod kojih se ispituje sposobnost ssupstancaanja potomstva.

Potomstvo su mlade dafnije nastale partenogenezom ispitivanih jedinki u toku trajanja ispitivanja.

Najniža efektivna koncentracija (Lowest Observed Effect Concentration, u daljem tekstu: LOEC) je najniža koncentracija ispitivane supstance koja dovodi do statistički značajnih promjena na nivou razmnožavanja i preživljavanja ispitivanog organizama (pri $p < 0,05$) u poređenju sa kontrolom unutar navedenog perioda izloženosti. Sve ispitivane koncentracije iznad LOEC imaju štetan uticaj, jednak ili veći od onih primjećenih kod LOEC. Kada se ne zadovoljavaju ova dva uslova, daje se detaljno objašnjenje na koji je način izabrana LOEC (a time i NOEC) .

Koncentracija bez uočenog efekta (No Observed Effect Concentration, u daljem tekstu: NOEC) je najviša ispitivana koncentracija, a prva ispod LOEC, koja u poređenju sa kontrolom ne dovodi do statistički značajne promjene ($p < 0,05$) posmatranog parametra unutar navedenog perioda izloženosti.

EC_x je koncentracija ispitivane supstance rastvorene u vodi koja rezultira sa x posto smanjenja reprodukcije Daphnia magna unutar naznačenog perioda izloženosti.

Ssupstancana brzina rasta je mjera rasta populacije koja objedinjuje sposobnost razmnožavanja i smrtnost specifičnu za određenu starost. Ako je populacija u ravnotežnom stanju ssupstancana brzina rasta biće nula. Za rastuće populacije ssupstancana brzina rasta biće pozitivna, a za populaciju koja se smanjuje biće negativna i dovešće do njenog izumiranja.

Granica detekcije je najniža koncentracija koja se može detektovati, ali ne i kvantifikovati.

Granica određivanja je najniža koncentracija koja se kvantitativno određuju.

Mortalitet životinja je slučaj kada se jedinka smatra uginulom, odnosno kada ne može da zapliva, ili kada nema vidljivih pokreta ekstremiteta ili postabdomenalni 15 sekundi nakon pažljivog protresanja posude za ispitivanje.

1.3. Princip metode

Mlade ženke dafnija (ispitivane jedinke - neonate) stare manje od 24 sata na početku ispitivanja, izlažu se ispitivanoj supstanci koja se dodaje u vodu u određenom opsegu koncentracija. Dužina ispitivanja je 21 dan. Na kraju ispitivanja određuje se ukupan broj preživjelog potomstva koje je dobijeno partenogenezom jedinki koje su preživjele ispitivanje.

Ne broji se potomstvo ispitivanih jedinki koje su u uginule u toku studije. Sposobnost razmnožavanja ispitivanih jedinki se izražava i na druge načine (npr. kao živo potomstvo po ispitivanoj jedinki na određeni dan, od prvog dana kad se uoče prvi potomci), ali bi se o njima informisalo zajedno sa ukupnim brojem potomstva po živoj ispitivanoj jedinki na kraju ispitivanja. Sposobnost razmnožavanja životinja izloženih ispitivanoj supstanci poredi se sa kontrolama da bi se odredili LOEC i NOEC. Podaci se analiziraju pomoću regresionog modela kako bi se odredila koncentracija koja dovodi do smanjenja sposobnosti reprodukcije za x% (tj. EC_{50}, EC_{20} ili EC_{10}).

1.4. Podaci o ispitivanoj supstanci

Potrebni su rezultati ispitivanja akutne toksičnosti (Dio II metode C.2. ovog priloga) izvedenog sa vrstom Daphnia magna. Rezultat je koristan pri izboru odgovarajućeg opsega ispitivanih koncentracija kod ispitivanja toksičnosti po reprodukciju. Rastvorljivost u vodi i napon para ispitivane supstance su poznati i dostupna je pouzdana analitička metoda za kvantifikaciju supstance u rastvorima sa naznačenim vrijednostima efikasnosti analitičke metode i granice određivanja. MeĐu podatke o ispitivanoj supstanci koji su korisni u odreĐivanju ispitivanih uslova ubrajaju se strukturna formula, čistoća supstance, stabilnost na svijezemljištu, stabilnost u uslovima ispitivanja, pK_a, P_{ow} i rezultati ispitivanja biorazgradivosti (metoda C.4. koja je data u ovom prilogu).

1.5. Prihvatljivost metode

Da bi ispitivanje bilo prihvatljivo, potrebni su sljedeći kriterijumi kvaliteta u kontrolama: smrtnost ispitivanih jedinki (ženke dafnija) ne prelazi 20% na kraju ispitivanja; i prosečan broj živih potomaka po ispitivanoj jedinki na kraju ispitivanja je ≥ 60.

1.6. Opis metode

1.6.1. Aparatura

Posude za ispitivanje i ostala aparatura koja dolazi u kontakt sa ispitivanim rastvorima je od stakla ili drugog hemijski inertnog materijala. Posude za ispitivanje su staklene čaše.

Dodatno su potrebni:
- oksimetar (s mikroelektrodama ili drugom prikladnom opremom za mjerenje rastvorenog kiseonika u uzorcima male zapremine); - adekvatna oprema za kontrolu temperature;
- pH metar;
- oprema za određivanje tvrdoće vode;
- oprema za određivanje TOC u vodi ili oprema za određivanje HPK;
- adekvatna aparatura za kontrolu svijetlosnog režima i mjerenje jačine svijetlosti.

1.6.2. Ispitivani organizmi

Vrsta koje se koristi u metodi ispitivanja je Daphnia magna Straus. Druge vrste roda Daphnia se koriste ako zadovoljavaju kriterijume prihvatljivosti (za korišćenje vrsta roda Daphnia merodavan kriterijum prihvatljivosti je sposobnost razmnožavanja u kontrolisanim uslovima koji vrijedi za vrste roda Daphnia). Ako se koriste druge vrste roda Daphnia to se definiše i njihova upotreba obrazlaže. Klon se određuje genotipizacijom. Reproduktivni potencijal Klona A konzistentno odgovara kriterijumu prihvatljivosti srednje vijrednosti od ≥ 60 neonata po preživeloj jedinki, uzgajanoj u uslovima opisanim u ovoj metodi. Koriste se i drugi klonovi, pod uslovom da kultura dafnija zadovoljava kriterijume prihvatljivosti.

Na početku ispitivanja, životinje su stare manje od 24 sata (tzv. neonate) i nisu prva generacija potomstva, potiču iz zdrave matične linije (odnosno bez znakova stresa kao što su visoka smrtnost, prisustvo mužjaka i zimskih jaja (ephippia), kašnjenje u pojavi prve generacije potomstva, depigmentisane životinje, itd). Matična linija životinja se održava u konstantnim laboratorijaskim uslovima (svijetlo, temperatura, medijumum, ishrana i broj jedinki po jedinici zapremine) koji su slični onima u ispitivanju. Ako se medijumum sa kulturom dafnija koji se koristi u ispitivanju razlikuje od rutinske kulture dafnija, omogućiti period aklimatizacije prije ispitivanja od obično 3 nedelje (koliko je potrebno da se dobije jedna generacija životinja) da bi se izbjegao stres za ispitivanih jedinki.

1.6.3. Medijumum

Upotrebljava se potpuno definisani medijumum, čime se izbjegava upotreba aditiva (npr. morska trava, ekstrakt zemljišta, itd) koje je teško okarakterisati i unapreĐuje se meĐulaboratorijaska standardizacija. Elandt medijumumi M4 i M7 (Dio II ove metode) su prikladni u ove svrhe. Prihvatljivi su i drugi medijijumi pod uslovom da se pokaže da kultura dafnija zadovoljava kriterijume prihvatljivosti ispitivanja.

Ako se koriste medijumumi sa nedefinisanim aditivima, te aditive navesti i u izvještaju o ispitivanju izneti podatke o sastavu medijumuma, pogotovo s obzirom na sadržaj ugljenika, jer to utiče na hranu kojom se životinje hrane. Preporučuje se da se odredi TOC, odnosno HPK u medijumumu matične linije i da se procjeni njihov udio u TOC/HPK medijumuma u kojem će se izvesti. Sadržaj TOC u medijumumu (prije dodavanja algi) je manji od 3 mg/l[2].

Pri ispitivanju supstanci koje sadrže metale, imati na umu da sastav medijumuma (npr. tvrdoća, nagradnja helata) koji utiče na procjenu toksičnosti ispitivane supstance. Za sada se od sasvim definisanih medijumuma prikladnih za održavanje vrste Daphnia magna u dugotrajnoj kulturi, koristi Elandt medijumume M4 i M7. Oba medijumuma sadrže helatizirajuće jedinjenje EDTA. Pokazalo se da je "prividna toksičnost" kadmijuma generalno niža kada se u ispitivanju toksičnosti po reprodukciju koriste medijumumi M4 ili M7 umjesto medijumuma koji ne sadrže EDTA. Stoga se ne koriste M4 ni M7 za ispitivanje supstanci koje sadrže metale, a ne koristiti ni ostale medijumume za koje se zna da sadrže helatizirajuća jedinjenja. Za ispitivanje supstanci koje sadrže metale koristiti alternativne medijumume, poput, npr. tvrde vode rekonstituisane prema ASTM, koja ne sadrži EDTA i kojoj se dodaje ekstrakt morskih algi. Kombinacija tvrde vode pripremljene prema ASTM i ekstrakta morskih algi prikladna je i za održavanje vrste Daphnia magna[60] u dugotrajnoj kulturi, iako ima slabu helatiziirajuću aktivnost zbog organskih sastojaka dodatog ekstrakta morskih algi.

Na početku i u toku ispitivanja koncentracija rastvorenog kiseonika je iznad 3 mg/l. Vrijednost pH je u opsegu od 6 do 9 i u normalnim okolnostima ne koleba se za više od 1,5 jedinice ni u jednom testu. Tvrdoća veća od 140 mg/l (kao $CaCO_3$). Testovi izvedeni pri toj ili većim koncentracijama pokazali su da je sposobnost razmnožavanja u skladu sa kriterijumima prihvatljivosti[51].

1.6.4. Test rastvori

Test rastvori izabranih koncentracija pripremaju se razblaživanjem osnovnog rastvora. Osnovne rastvore pripremati rastvaranjem supstance u test medijumu. U nekim slučajevima javlja se potreba za korišćenjem organskih rassupstancaača ili disperzionih sredstava, kako

[60] OECD, (2002) Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD,Paris

bi se pripremio osnovni rastvor željene koncentracije. Prikladni rassupstancaači su: aceton, etanol, metanol, dimetilformamid i trietilenglikol. Prikladna disperziona sredstva su: Cremophor RH40, 0,01% metilceluloza i HCO-40. Koncentracija ispitivane supstance u rastvoru nije veća od granične rastvorljivosti te supstance u medijumumu.

Rassupstancaači se koriste za pripremu osnovnog rastvora koji će moći precizno da se dozira. Pri preporučenim koncentracijama rassupstancaača u konačnom medijumumu (≤ 0,1 ml/l) navedeni rassupstancaači ne djeluju toksično i ne povećavaju rastvorljivost ispitivane supstance u vodi.

Disperziona sredstva omogućavaju precizno doziranje i disperziju. Pri preporučenim koncentracijama u konačnom, medijumumu (≤ 0,1 ml/l) navedena disperziona sredstva ne djeluju toksično i ne povećavaju rastvorljivost ispitivane supstance u vodi.

1.7. Postavka ispitivanja

Tretmani (koncentracije) raspoređuju se po posudama za ispitivanje po slučajnom rasporedu. U suprotnom, dobijaju se neobjektivi rezultati koji se pogrešno pripisuju razlikama u koncentraciji ispitivane supstance. Ako se eksperimentalni postupci izvode u stalnom redosledu od niže prema višoj koncentraciji, javljaju se određeni vremenski-zavisni efekati poput zamora lica koje vrši ispitivanje ili neke druge greške, što dovodi do prividnog pojačanja efekta ispitivane supstance u tretmanima sa višim koncentracijama. Ako postoji mogućnost da rezultati ispitivanja zavise od početnih uslova ili uslova okoline, npr. od mjesta u laboratorijai, razmotriti mogućnost ispitivanja u blok-sistemu.

1.8. Postupak

1.8.1. Uslovi pri izlaganju

1.8.1.1. Dužina ispitivanja

Ispitivanje traje 21 dan.

1.8.1.2. Gustina nasada ispitivanih jedinki

Ispitivane jedinke drže se odvojeno, po jedna u svakoj ispitivanoj posudi, u 50 ml do 100 ml medijumuma u svakoj posudi. Da bi se zadovoljili zahtjevi analitičkog postupka koji se koristi za određivanje koncentracije ispitivane supstance, koriste se veće zapremine, a dopušteno je i objedinjavanje uzoraka iz više posuda za ispitivanje istog tretmana potrebnih za hemijsku analizu. Ako se koriste zapremine veće od 100 ml, dozvoljeno je povećati količinu hrane koja se daje dafnijama da bi se obezbijedila adekvatna dostupnost hrane i da bi se zadovoljili kriterijumi kvaliteta. Kod ispitivanja u protočnim uslovima, postavka, zbog tehničkih razloga, je i drugačija (npr. četiri grupe po 10 jedinki, u ispitivanim posudama u većoj zapremini), ali sve izmjene u postavci navesti u izvještaju.

1.8.1.3. Broj jedinki

Za ispitivanja u polu-statičnom sistemu, potrebno je najmanje 10 jedinki po tretmanu (koncentraciji) postavljenih pojedinačno u ispitivanoj posudi i isto toliko u kontrolnom tretmanu.

Kod ispitivanja u protočnim uslovima pokazala se zadovoljavajućom postavka sa 40 jedinki podijeljenih u četiri grupe po 10 jedinki za svaki tretman (koncentraciju ispitivane supstance)[61]. Radi se i sa manjim brojem životinja, ali se preporučuje najmanje 20 životinja po koncentraciji, podijeljenih u dvije ili više paralelnih grupa (replika, kopija) sa jednakim brojem životinja u svakoj grupi (npr. po četiri replike sa po pet dafnija u svakoj). Pri postavci sa više od jedne dafnije po posudi za ispitivanje, nije moguće reprodukciju izraziti kao ukupni broj živih potomaka po ispitivanoj jedinki preživeloj do kraja ispitivanja, ako jedinka ugine prije kraja ispitivanja. U takvim slučajevima reprodukciju izraziti kao ukupni broj živih potomaka dobijen od ispitivanih jedinki prisutnih sa početka ispitivanja.

1.8.1.4. Ishrana

Pri postavci u polu-statičnom sistemu, jedinke hraniti svaki dan, a najmanje tri puta nedeljno (tj. pri promjeni medijumuma). Ako se odstupi od ovakvog režima ishrane (npr. kod postavke u protočnim uslovima), to navesti u izvještaju o ispitivanju.

Tokom trajanja ispitivanja, ispitivane jedinke hraniti živim algama jedne ili više vrsta: vrste roda Chlorella, Selenastrum capricornutum (sada Pseudokirchneriella subcapitata[11]) i Scenedesmus subspicatus. Količinu hrane odrediti prema količini organskog ugljenika (C) potrebnog svakoj ispitivanoj jedinki. Istraživanja su pokazala da je za održavanje vrste Daphnia magna dovoljna koncentracija od 0,1 do 0,2 g/C/jedinki/dan, da bi se dobio broj potomaka potreban u skladu sa kriterijuma za prihvatljivost rezultata ispitivanja. Hranu treba davati ili u stalnoj količini u toku trajanja ispitivanja ili po želji, na početku davati manje količine, a potom u toku ispitivanja kako ispitivane jedinke rastu količinu postepeno povećavati. Količina hrane mora se kretati u preporučenom opsegu od 0,1 do 0,2 g/C/individue/dan.

Ako se za iizračunavanje količine potrebne hrane koriste alternativni pokazatelji, kao što je broj algalnih ćelija ili absorbanca (radi lakše procjene, jer je mjerenje sadržaja ugljenika zahtjevna dugotrajna metoda), svaka laboratorijaa treba da napravi sopstveni nomogram procjene sadržaja ugljenika u algama na osnovu alternativnih pokazatelja (preporuke o izradi nomograma date su u III Dijelu ove metode). Nomogrami se provjeravaju najmanje jednom godišnje ili češće, ako su se promjenili uslovi u kulturama algi. Apsorbancija se pokazala boljim alternativnim pokazateljem sadržaja ugljenika nego broj ćelija.

Dafnije hraniti koncentrovanom suspenzijom algi, kako bi količina medijumuma za algalne kulture koja će se dodati medijumumu svela na minimum. Suspenzija algi se pravi centrifugiranjem i ponovnim resuspendujenjem u destilovanoj vodi, dejonizovanoj vodi ili u medijumu za gajenje dafnija.

1.8.1.5. Svijetlosni režim

16 sati svijezemljišta jačine koja ne prelazi 15-20 $\mu E/m^{2c-1}$.

1.8.1.6. Temperatura

Temperatura medijumuma u kojem se izvodi ispitivanje je opsegu od 18 °C do 22 °C. Bez obzira na vrstu ispitivanja, temperatura unutar opsega ne varira za više od 2 °C (treba npr.

[61] Testing Method B.44. Skin Absorption: In vivo Method.2. OECD, (2002) Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

da je 18 °C do 20 °C, 19 °C do 21°C ili 20 °C do 22 °C). Pripremiti dodatnu posudu za ispitivanje sa medijumumom za praćenje temperature.

1.8.1.7. Aeracija

Posude za ispitivanje ne aerišu se u toku ispitivanja.

1.8.2. Koncentracija ispitivane supstance

Ispitivanje se izvodi u najmanje 5 koncentracija ispitivane supstance u geometrijskoj seriji koncentracija, raspoređenim sa faktorom ne većim od 3,2 i u potrebnom broju ponavljanja (replika) po tretmanu (dio 1.8.1.3. ove metode). Ako se ispitivanje izvodi sa manje od pet koncentracija, obrazložiti razloge. Supstance ne ispitivati u koncentracijama višim od njihove rastvorljivosti u medijumumu. Pri određivanju opsega koncentracija voditi računa o sljedećem:

- ako je cilj dobijanje vrijednosti LOEC/NOEC, najniža ispitivana koncentracija je dovoljno niska, tako da fekunditet pri toj koncentraciji ne bude statistički značajno niži od one u kontrolama. U slučaju drugačijeg odgovora, ispitivanje ponoviti sa sniženom najnižom ispitivanom koncentracijom;
- ako je cilj dobijanje vrijednosti LOEC/NOEC, najviša ispitivana koncentracija je dovoljno visoka, tako da fekunditet pri toj koncentraciji bude statistički niži nego u kontrolisanim uslovima. U slučaju drugačijeg odgovora, ispitivanje ponoviti sa višom najvišom ispitivanom koncentracijom;
- ako se određuje EC_x, efektivna koncentracija koja utiče na sposobnost razmnožavanja, primjeniti dovoljan opseg koncentracija, kako bi se EC_x odredila sa zadovoljavajućim intervalima povjerenja. Ako se određuje EC_{50}, efektivna koncentracija za sposobnost razmnožavanja, najviša primjenjena koncentracija je veća od EC_{50}. U suprotnom će, iako će EC_{50} moći da se odredi, interval povjerenja za EC_{50} biti veoma širok i neće biti moguće na zadovoljavajući način ocjeniti adekvatnost izabranog modela;
- nastojati da se u seriju ispitivanih koncentracija ne uključi nijedna koja ima statistički značajno dejstvo na preživljavanje odraslih životinja, jer bi se time promjenila priroda ispitivanja; to više ne bi bilo samo ispitivanje toksičnosti po reprodukciju, već kombinovano ispitivanje toksičnosti po reprodukciju i smrtnost, pa je statistička analiza dobijenih rezultata složenija.

Prethodno poznavanje toksičnosti ispitivane supstance (npr. rezultati ispitivanja akutne toksičnosti, odnosno rezultati preliminarnog ispitivanja postavljenog u cilju određivanja opsega ispitivanih koncentracija) pomaže pri izboru adekvatne serije adekvatnog opsega ispitivanih koncentracija. U slučajevima kada se za pripremu ispitivanih rastvora koristi rassupstancaač ili disperziono sredstvo (dio 1.6.4), njegova finalna koncentracija u ispitivanim posudama nije veća od 0,1 ml/l i mora biti jednaka u svim posudama.

1.8.3. Kontrole

Pri svakom ispitivanju postaviti jednu kontrolu sa medijumumom i jednu seriju kontrola sa rassupstancaačem ili disperzionim sredstvom. Kada se koristi rassupstancaač ili disperziono sredstvo, njegova koncentracija u kontrolnom medijumumu je jednaka onoj u ispitivanim posudama sa ispitivanom supstancom. Pripremiti potreban broj replika (paralelnih uzoraka, kopija) (dio 1.8.1.3).

Pri dobro izvedenom ispitivanju, koeficijent varijacije broja živih potomaka dobijenih od ispitivanih jedinki u kontrolisanim grupama iznosi ≤ 25%, i to navesti u izvještaju o ispitivanju kada se ispitivanje izvodi sa po jednom jedinkom u svakoj ispitivanoj posudi.

1.8.4. Promjena ispitivanog medijumuma

Dinamika promjene ispitivanog medijumuma zavisi od stabilnosti supstance koja se ispituje, ali medijumum mijenjati najmanje tri puta nedeljno. Ako preliminarno ispitivanje stabilnosti (dio 1.4. ove metode) pokaže da koncentracija ispitivane supstance nije stabilna, tj. da je izvan nominalnog opsega od 80% do 120% ili da iznosi manje od 80% početne koncentracije u toku najdužeg perioda u kome se mijenja medijumum - tri dana, razmotriti mogućnost češće promjene medijumuma, ili ispitivanje u protočnim uslovima.

Kada se medijumum mijenja u toku ispitivanja u semistatičkim uslovima pripremiti još jednu seriju posuda za ispitivanje i u njih prebaciti ispitivane jedinke, npr. pomoću staklenih pipeta adekvatnog prečnika, pri tom u novu posudu sa dafnijom prebaci što manje medijumuma.

1.8.5. Posmatranje

Rezultate posmatranja bilježiti u odgovarajuće obrasce (Dio IV i V ove metode). Ako su potrebna i druga mjerenja (dio 1.3. i 1.8.8. ove metode), potrebno je dodatno posmatranje.

1.8.6. Potomstvo

Potomstvo svake ispitivane jedinke svakodnevno odvajati i brojati, od pojave prve generacije potomaka, kako bi se izbjeglo da potomstvo troši hranu namijenjenu roditeljskim jedinkama. Za potrebe ove metode broje se samo živi potomci i prisustvo abortiranih jaja i uginulih potomaka.

1.8.7. Mortalitet

Smrtnost meĐu ispitivanim jedinkama prati se svakodnevno ili najmanje onoliko često koliko se broje i dobijeni potomci.

1.8.8. Ostali parametri

Iako je ova metoda namijenjena procjeni dejstva supstanci na reprodukcioni potencijal, njome se određuju kvantitativno i drugi efekti, u dovoljnoj mjeri da to omogući statističku analizu. Pratiti rast, jer se time dobija podatak o mogućim subletalnim efektima koji je korisniji od samog mjerenja sposobnosti reprodukcije. Mjeri se i dužina ispitivanih jedinki (dužine tijela bez analnog nastavka) na kraju ispitivanja. MeĐu ostale pokazatelje koji se mjere ili iizračunavaju ubrajaju se vrijeme potrebno za pojavu prve generacije potomaka (i idućih generacija), broj i veličina legla po životinji, broj odbačenih legla, prisutnost mužjaka ili efipija, kao i ssupstancana stopa rasta populacije.

1.8.9. Učestalost analitičkih određivanja i mjerenja

Koncentraciju kiseonika, temperaturu, tvrdoću i pH vrijednost mjeriti najmanje jednom nedeljno, u svježem i starom medijumumu i to u kontrolama i u medijumumu sa najvišom koncentracijom ispitivane supstance.

Tokom ispitivanja se u pravilnim vremenskim intervalima mjeri i koncentracija ispitivane supstance.

Pri ispitivanju u polustatičnom sistemu, kod kojih se očekuje da koncentracije ispitivane supstance ne variraju za više od ± 20% od nominalnih vrijednosti (tj. da se kreću u opsegu 80% do 120% - dio
1.4 i 1.8.4), analiziraju se najviša i najniža ispitivana koncentracija i to pri pripremi svježeg medijumuma i jednom nedeljno u toku ispitivanja, promjeni medijumuma (tj. analizu obaviti u uzorku iste koncentracije, pri pripremi te koncentracije i pri promjeni medijumuma). Ta određivanja ponavljati u intervalima od najmanje jednom nedeljno.

Pri ispitivanjima kod kojih se očekuje da koncentracije ispitivane supstance variraju za više ± 20% od nominalnih vrijednosti, analizirati sve ispitivane koncentracije, pri njihovoj pripremi i pri promjeni medijumuma. Kod ispitivanja kod kojih mjerenje početne koncentracije ispitivane supstance pokaže da ona nije unutar opsega od ± 20% nominalne vrijednosti, ali ima dovoljno dokaza da se te početne koncentracije ponavljaju i da su stabilne (tj. da se kreću u opsegu 80% do 120% od početnih), hemijska određivanja u drugoj i trećoj nedelji ispitivanja se ograničavaju na provjeru najniže i najviše koncentracije. U svakom slučaju, koncentraciju ispitivane supstance prije promjene medijumuma provjeriti samo u jednoj od replika (paralelnih uzoraka) za svaku od koncentracija.

Ako se ispitivanje sprovodi u protočnom sistemu, primjeren je sličan režim uzimanja uzorka kao i u polustatičnom sistemu (osim što se u tom slučaju ne mjeri koncentracija supstance u ranijim uzorcima). Od koristi je da se poveća broj uzoraka uzetih u toku prve nedelje ispitivanja, odnosno da se obavljaju tri kompleta mjerenja kako bi se osiguralo da koncentracije ostanu stabilne. Pri ispitivanjima u protočnom sistemu svakodnevno provjeravati brzinu protoka medijumuma i ispitivane supstance.

Ako se dokaže da se koncentracija ispitivane supstance u toku ispitivanja održava unutar zadovoljavajućeg opsega od ± 20% od nominalne vrijednosti ili vrijednosti izmjerene na početku ispitivanja, rezultati se zasnivaju na nominalnoj ili na izmjerenoj početnoj vrijednosti. Ako odstepena od nominalne ili početne izmjerene vrijednosti prelaze ± 20%, rezultate izraziti u terminima srednje vrijednosti u funkciji vremena (Dio VI ove metode).

2. Podaci i izvještaj

2.1. Obrada rezultata

Cilj ove metode ispitivanja je određivanje uticaja ispitivane supstance na ukupni broj živih potomaka dobijenih po živoj ispitivanoj jedinki na kraju ispitivanja. Ukupni broj živih potomaka po ispitivanoj jedinki izračunati za svaku posudu za ispitivanje (tj. za svaku repliku ili paralelni uzorak). Uzorak u kojem je ispitivana jedinka u toku ispitivanja uginula ili se pokaže da je ispitivana jedinka bila mužjak, isključiti iz analize. U tom slučaju će se analiza zasnivati na smanjenom broju replika.

Kada se, u sklopu procjene uticaja hemikalije na sposobnost reprodukcije određuje LOEC, a time i NOEC, izračunati srednju vrijednost reprodukcije za sve replike pri određenoj koncentraciji, kao i rezidualnu standardnu devijaciju, što se čini analizom varijanse (u daljem tekstu: ANOVA). Srednja vrijednost dobijena za svaku koncentraciju se poredi sa srednjom vrijednošću kontrolnog tretmana, služeći se adekvatnom, statističkom metodom za višestruka poređenja. Provjeriti da li vredi ANOVA pretpostavka o homogenosti varijanse, grafički, a ne formalnim iizračunavanjem statističke značajnosti, može poslužiti i Bartletov

test. Ako pretpostavka ne vrijedi, prije izvoĐenja ANOVA razmotriti mogućnost transformacije podataka radi homogenizovanja varijanse ili umjesto ANOVA izvesti pondiranu ANOVA, izračunati i navesti i osjetljivost ANOVA (najmanju statistički značajnu razliku).

Za određivanje EC_{50} iz dobijenih rezultata izračunati odgovarajuću krivu, npr. logističku krivu, služeći se adekvatnom statističkom metodom, npr. metodom najmanjih kvadrata. Kriva se može parametrizovati, tako da se EC_{50} i njena standardna greška direktno određuju, čime se znatno olakšava iizračunavanje intervala povjerenja za EC_{50}. Navesti dvostrani 95%-tni interval povjerenja, osim ako ne postoje dobri razlozi da se prednost da nekom drugom nivou pouzdanosti. Postupak uklapanja krive obezbijeĐuje i način za ocjenu statističkog značaja izostanka podudarnosti sa krivom. To se radi grafički ili dijeljenjem ostatka sume kvadrata u kategoriju "nedostatak podudarnosti" (lack of fit) i u kategoriju "komponente čiste greške" (pure error components) i testom statističkog značaja za nedostatak podudarnosti. Budući da u tretmanima sa visokim fekunditetom postoji tendencija veće varijanse u broju potomstva nego u tretmanima sa niskim fekunditetom, pa treba razmotriti i mogućnost pondiranja dobijenih vrijednosti, kako bi se uvažila različitost varijansi između tretmana. Pri analizi podataka dobijenih u meĐulaboratorijaskoj provjeri, *c*
logistička kriva je izračunata pomoću sljedećeg modelai: Y= $\frac{\quad}{\square\, x\, \square \quad \frac{\quad}{1\square\square\square\, x_0\, \square\square\square}}$ gdje je: Y ukupni broj

potomaka po živoj roditeljskoj životinji na kraju ispitivanja (izračunato za svaku ispitivanu posudu); x koncentracija ispitivane supstance; s očekivani broj potomaka kada je x = 0; x_0 EC_{50} u populaciji; b nagib krive.

Provjeriti valjanost modela, kao što je gore navedeno, nekada odgovara hormezis model u kom niske koncentracije imaju pojačano dejstvo. Procjeniti i druge efektivne koncentracije, npr. EC_{10} ili EC_{20}, i ako se u tom slučaju prednost daje drugačijoj parametrizaciji modela od one koja se koristila za procjenu EC_{50}.

2.2. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke: 1) ispitivana supstanca:
- priroda supstance i mjerodavna fizičko-hemijska svojstva,
- podaci o identifikaciji hemikalije, uključujući čistoću; 2) ispitivana vrsta:
- klon (genotipiziran ili ne), dobavljač ili izvor (ako je poznat) i uslovi gajenja kulture. Ako se ne koristi vrsta Daphnia magna, navodi se obrazloženje; 3) uslovi ispitivanja:
- korišćeni postupak (npr. semistatični ili protočni sistem, zapremina, broj dafnija po litri),
- fotoperiod i jačina svijezemljišta,
- postavka ispitivanja (npr. broj replika, broj roditeljskih jedinki po replici),
- detalji o korišćenom medijumu za gajenje kulture,
- podaci o organskom materijalu, ako je korišćen, uključujući podatke o sastavu, izvoru, metodi pripreme, TOC/HPK osnovnog rastvora, vrijednosti TOC/HPK izmjerene u medijumumu,
- detaljne podatke o ishrani, uključujući količinu hrane u mg/C/Dafnija/dan) i režim (npr. vrsta hrane
- ako je reč o algama, navesti tačno ime vrste i ako je poznato, navesti soj i uslove gajenja u kulturi),
- metode pripreme osnovnih rastvora i dinamiku izmjene (treba navesti rassupstancaač ili disperziono sredstvo, ako je korišćeno); 4) rezultati:

- rezultati bilo kakvih preliminarnih studija o stabilnosti ispitivane supstance,
- nominalna koncentracija i rezultati svih mjerenja koncentracije ispitivane supstance u ispitivanim posudama (Dio V ove metode), podaci o efikasnosti analitičke metode i granicama detekcije, - kvalitet vode u ispitivanim posudama, tj. podaci o pH, temperaturi i koncentraciji rastvorenog kiseonika, podaci o TOC, odnosno HPK i tvrdoći (Dio IV ove metode);
- potpuni podaci o potomstvu dobijenom od svake roditeljske jedinke (Dio IV ove metode);
- broj uginulih roditeljskih jedinki i dan kada su uginule (Dio IV ove metode);
- koeficijent varijacije fekunditeta u kontrolisanim grupama (zasniva se na ukupnom broju živih potomaka po živoj roditeljskoj jedinki na kraju ispitivanja);
- grafički prikaz zavisnosti ukupnog broja živih potomaka po živoj roditeljskoj jedinki
- LOEC po reprodukciju, uključujući opis primjenjenih statističkih postupaka i naznaka o najnižoj statistički značajnoj razlici koja se može detektovati, kao i ako je primjenjivo, podatak o najvišoj ispitivanoj koncentraciji koja ne dovodi do NOEC. Navesti i podatak o LOEC/NOEC za smrtnost roditeljskih jedinki;
- gdje je prikladno, navesti ECx za reprodukciju, intervale povjerenja i grafički prikaz modela upotrijebljenog za njihovo iizračunavanje, nagib krive dozne zavisnosti i njegovu standardnu grešku;
- ostali uočeni biološki efekti i mjerenja - navesti podatke o svim ostalim biološkim efektima koji su uočeni ili izmjereni (npr. rast roditeljskih jedinki), uključujući odgovarajuće obrazloženje; - obrazloženje za svako odstepene od metode ispitivanja.

PRIPREMA POTPUNO DEFINISANIH MEDIJUMUMA ELANDT M7 I M4
DIO II

Aklimatizacija na medijumume Elandt M7 i M4

Nekada se javljaju poteškoće pri direktnom premiještanju dafnija u medijumume M4 i M7, što se riješilo postupnom aklimatizacijom, odnosno premještanjem životinja iz prirodnog medijumuma u 30%, potom 60% i na kraju 100% Elandt. Aklimatizacioni period traje i do mjesec dana.

Priprema

Elementi u tragovima

Prvo se pripremaju odvojeni osnovni rastvori (I) svakog pojedinog elemenata u tragovima u vodi odgovarajuće čistoće, npr. dejonizovanoj, destilovanoj ili vodom dobijenom reverznom osmozom. Iz tih različitih osnovnih rastvora (II) priprema se jedan rastvor (II) koji sadrži sve elemente u tragovima (kombinovani rastvor), npr.:

Osnovni rastvori (pojedinačne supstance)	Količina koja se dodaje u vodu (mg/l)	Koncentracija (u poreĐenju sa medijumumom M4) puta	Za kombinovanog pripremanje II - dodati rastvora količinu sledeću rastvora I u vodu osnovnog (ml/l)	
			M 4	M 7
H_3BO_3	57.190	20.000	1,0	0,25
$MnCl_2 \times 4H_2O$	7.210	20.000	1,0	0,25

LiCl	6.120	20.000	1,0	0,25
RbCl	1.420	20.000	1,0	0,25
$SrCl_2$ x $6H_2O$	3.040	20.000	1,0	0,25
NaBr	320	20.000	1,0	0,25
Na2MoO4 x 2H2O	1.260	20.000	1,0	0,25
CuCl2 x 2H2O	335	20.000	1,0	0,25
ZnCl2	260	20.000	1,0	1,0
CoCl2 x 6H2O	200	20.000	1,0	1,0
KI	65	20.000	1,0	1,0
Na2SeO3	43,8	20.000	1,0	1,0
NH4VO3	11,5	20.000	1,0	1,0
Na2EDTA x 2H2O	5.000	2.000	-	-
FeSO4 x 7H2O	1.991	2.000	-	-
Rastvori Na_2EDTA i $FeSO_4$ se pripremaju odvojeno, jedinjenjee i odmah autoklaviraju. To daje:				
21 Fe-EDTA Rastvor		1.000 puta	20,0	5,0

Medijumumi M4 i M7

Medijumumi M4 i M7 pripremaju se od rastvora II, makronutrijenata i vitaminima na sljedeći način:

	Količina vodu koja se dodaje u (mg/l)	Koncentracija (u poreĐenju sa medijumumom M4) puta	Za pripremanje kombinovanog rastvora II - dodati sledeću količinu osnovnog rastvora I u vodu (ml/L)	
			M 4	M 7
Kombinovani rastvor II Elementi u tragovima		20	50	50
Osnovni rastvor sama (pojedinačne supstanca) makronutrijenti				
$CaCl_2$ x $2H_2O$	293.800	1.000	1,0	1,0
$MgSO_4$ x $7H_2O$	246.600	2.000	0,5	0,5
KCl	58.000	10.000	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64.800	1.000	1,0	1,0

Na_2SiO_3 x $9H_2O$	50.000	5.000	0,2	0,2
$NaNO_3$	2.740	10.000	0,1	0,1
KH_2PO_4	1.430	10.000	0,1	0,1
K_2HPO_4	1.840	10.000	0,1	0,1
Kombinovani rastvor sa vitaminima	-	10.000	0,1	0,1
Kombinovani rastvor sa vitaminima se priprema dodavanjem 3 vitamina u 1 litru vode kako je dato dole:				
Tiamin hidrohlorid	750	10.000	-	-
Cijankobalamin (B12)	10	10.000	-	-
Biotin	7,5	10.000	-	-
Kombinovani rastvor sa vitaminima se čuva zamrznut u malim porcijama. Vitamini se dodaju medijumumu neposredno pre upotrebe. Napomena 1: Da bi se prilikom pripreme kompletnog medija izbjeglo taloženje soli, alikvote osnovnih rastvora treba dodavati u oko 500 do 800 ml dejonizovane vode i potom dopuniti do 1 L. Napomena 2: Receptura za pripremu medijumuma M4 prvi put je objavljena u "Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructuralapproach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma, 154, p. 25-33."				

ANALIZA UKUPNOG ORGANSKOG UGLJENIKA (TOC) I IZRADA NOMOGRAMA ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA TOC U HRANI OD ALGI
DIO III

Sadržaj ugljenika u hrani od algi u normalnim okolnostima ne određuje se direktno, već na osnovu poreĐenja (tj. nomograma), mjerenjem surogat pokazatelja poput broja algalnih ćelija ili apsorbance svijezemljišta. TOC mjeriti metodom oksidacije pri visokoj temperaturi, a ne UV ili persulfatnom metodom.

Za izradu nomograma, alge centrifugiranjem odvojiti od hranljive podloge i potom resuspendovati u destilovanoj vodi. U svakom uzorku, u triplikatu, izmjeriti surogat pokazatelj i koncentraciju TOC. Kao slijepa proba uzima se destilovana voda. Određuje se i koncentracija TOC u destilovanoj vodi, koja se zatim oduzme od koncentracije TOC dobijene iz uzoraka algi. Nomogram je linearan u opsegu predviĐenih koncentracija ugljenika.

PRIMJER OBRASCA SA PODACIMA O PROMJENI MEDIJUMUMA, PRAĆENJU FIZIČKOHEMIJSKIH SVOJSTAVA, ISHRANI, RAZMNOŽAVANJU DAFNIJA I SMRTNOSTI ODRASLIH JEDINKI

DIO IV Eksperiment broj:

Datum početka: Klon:
Medijumum:
Vrsta hrane:

Ispitivana supstanca:
Nominalna koncentracija:

Dan	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Promjena medijumuma																								
pH																								
O mg/l																								
Temperatura(^{o}C)																								
Hrana data (označiti)																								
Broj živih potomaka																								Ukupno
Posuda 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																								Ukupno
Kumulativna strtnost odraslih jedinki																								

PRIMJER OBRASCA SA PODACIMA O REZULTATIMA HEMIJSKIH ANALIZA
DIO V

Izmjerene koncentracije

Nominalna koncentracija	Uzorak 1. sedmice		Uzorak 2. sedmice		Uzorak 3. sedmice	
	Novo	Staro	Novo	Staro	Novo	Staro

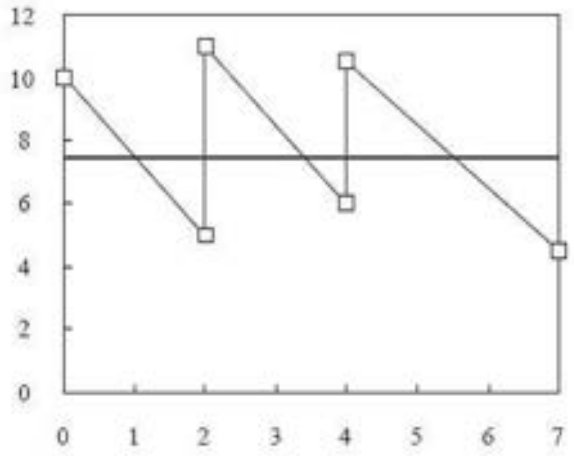
Izmjerene koncentracije kao procenat nominalne

Nominalna koncentracija	Uzorak 1. sedmice		Uzorak 2. sedmice		Uzorak 3. sedmice	
	Novo	Staro	Novo	Staro	Novo	Staro

IIZRAČUNAVANJE SREDNJE VRIJEDNOSTI KONCENTRACIJE U FUNKCIJI VREMENA DIO VI

Težinska srednja vrijednost u funkciji vremena

Ako se uzme da se koncentracija ispitivane supstance smanjuje između dvije promjene medijumuma, odrediti koja će koncentracija predstavljati opseg koncentracija kojima je roditeljska jedinka bila izložena. Izbor se bazira na biološkim i statističkim pokazateljima. Ako na sposobnost razmnožavanja najviše utiče najviša koncentracija ispitivane supstance, onda se najviša koncentracija i uzima. Ako su važniji efekti koji se akumuliraju ili da je važnije dugoročno djelovanje, onda je merodavnija prosječna koncentracija. U tom slučaju primjerenije je služiti se težinskom srednjom vrijednošću koncentracije u funkciji vremena, jer se tako uzimaju u obzir i kolebanja koncentracije koja se zbivaju u toku vremena.



Slika 1: Primjer težinske srednje vrijednosti

Dani

Slika 1 prikazuje (pojednostavljen) primjer ispitivanja koje traje 7 dana sa prosječnom promenom medijumuma nultog, 2. i 4. dana: tanka cik-cak crta prikazuje koncentraciju u bilo kojoj vremenskoj tački. Pretpostavka je da se smanjenje koncentracije zbiva po eksponencijalnom obrascu; šest ucrtanih tačaka predstavljaju koncentracije izmjerene na početku i na kraju svakog perioda promjene medijumuma, dok puna debela crta pokazuje položaj težinske srednje vrijednosti u funkciji vremena.

Težinska srednja vrijednost u funkciji vremena računa se tako da se uzme da je površina ispod krive srednje vrijednosti u toku vremena jednaka površini ispod krive koncentracije. Način računanja u gornjem primjeru dat je u Tabeli 1.

Tabela 1: Iizračunavanje težinske srednje vrijednosti u funkciji vremena

Broj promjena medijumuma	Dani	$Conc_0$	$Conc_1$	$\ln(Conc_0)$	$\ln(Conc_1)$	Površina
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Ukupni dani: 7					Ukupna površina	50,091
					Težinska srednja vrijednost	7,156

Dani označavaju broj dana u razdoblju jedne promjene medijumuma. $Conc_0$ je koncentracija izmjerena na početku svakog perioda promjene medijumuma; $Conc_1$ koncentracija izmjerena na kraju svakog perioda promjene medijumuma; $\ln(Conc_0)$ prirodni logaritam $Conc_0$. $\ln(Conc_1)$ prirodni logaritam $Conc_1$; Površina je površina ispod eksponencijalne krive za svako period promjene medijumuma, a računa se: površina = $\frac{}{Conc^{o}\ Conc^{1}\ \square dani\ \ln Conc_0\ \ln Conc_1}$

Težinska srednja vrijednost je ukupna površina podijeljena ukupnim danima. Za ispitivanje toksičnosti po reprodukciju dafnije tabela obuhvata 21 dan ispitivanja. Ako se mjerenja obavljaju samo na početku i na kraju perioda promjene medijumuma, ne potvrđuje se da je proces smanjivanja koncentracije ispitivane supstance zapravo eksponencijalan. Ako kriva izgleda drugačije, mijenja se i vrijednost površine. Eksponencijalni obrazac smanjivanja koncentracije ispitivane supstance nije neprihvatljiv i to je vjerovatno najupotrebljivija kriva u nedostatku drugih podataka.

Neophodan je oprez ako se hemijskom analizom na kraju perioda promjene medijumuma ispitivana supstanca ne nađe. Osim ako je moguće mjeriti kojom brzinom supstanca nestaje iz rastvora, nema načina da se dobije verodostojna površina ispod krive, te je u tom slučaju zapravo nemoguće dobiti smislenu srednju vrijednost u funkciji vremena.

C.21. ZEMLJIŠNI MIKROORGANIZMI: ISPITIVANJE TRANSFORMACIJE AZOTA

1. Metoda ispitivanja

Metoda ispitivanja transformacije azota se zasniva na OECD TG 216 (2000) uputstvu ispitivanja.

1.1. Uvod

Metoda ispitivanja transformacije azota opisuje laboratorijasku metodu za procjenu dugoročnih efekata hemikalija na proces mikrobiološke transformacije azota u zemljištu, pri jednokratnom izlaganju. U procjeni i evaluaciji toksičnih svojstava ispitivane supstance, u nekim slučajevima određuje se njihov uticaj na aktivnost zemljišnih mikroorganizama. Recimo kada su potrebni podaci o mogućem negativnom djelovanju sredstava za zaštitu bilja na zemljišnu mikrofloru, ili kada se očekuje izloženost zemljišnih mikroorganizama drugim hemikalijama. Ispitivanje transformacije azota služi za procjenu efekata takvih hemikalija na zemljišne mikroorganizme. Ako se ispituju agrohemikalije (sredstva za zaštitu bilja, Đubriva, hemikalije u šumarstvu) izvodi se i ispitivanje transformacije ugljenika uporedo sa ispitivanjem transfromacije azota. Ako se ispituju hemikalije koje se ne koriste u poljoprivredne svrhe, ispitivanje transformacije azota je dovoljno. Ukoliko se vrijednost EC_{50} dobijena iz ispitivanja transformacije azota za date hemikalije nalazi u opsegu EC_{50}

vrijednosti koje su utvrĐene za komercijalno dostupne inhibitore nitrifikacije (npr. nitrapirin), izvodi se ispitivanje transformacije ugljenika da bi se dobilo više podataka.

Zemljište se sastoji od žive i nežive komponente koje egzistiraju u kompleksnim i heterogenim smješama. Mikroorganizmi igraju važnu ulogu u razgradnji i transformaciji organske materije. U plodnim zemljištima, veliki broj vrsta mikroorganizama doprinosi različitim aspektima plodnosti zemljišta. Bilo kakav dugoročni uticaj na ove biohemijske procese potencijalno utiče na procese čvrstenja nutrijenata, što utiče na plodnost zemljišta. Transformacija ugljenika i azota odvija se u svim tipovima plodnih zemljišta. Iako se mikrobiološke zajednice razlikuju od zemljišta do zemljišta, putevi transformacije nutrijenata su u osnovi isti.

Metoda ispitivanja služi za procjenu dugoročnih negativnih efekata supstanci na proces transformacije azota u aerobnim površinskim slojevima zemljišta. Metoda omogućava i procjenu efekta supstance na transformaciju ugljenika od strane zemljišnih mikroorganizama. Obrazovanje nitrata se dogaĐa nakon prekidanja hemijske veze ugljenik-azot. Ako su zabilježene iste brzine obrazovanja nitrata u tretmanima i u kontroli, može se pretpostaviti da ne postoji negativan uticaj na glavne puteve razgradnje ugljenika. Supstrat za potrebe ispitivanja (hranivo od lucerke u prahu) ima povoljan odnos ugljenik/azot (obično između 12/1 i 16/1). Zahvaljujući tome, dovoljna količina ugljenika je na rapolaganju mikroorganizmima u toku ispitivanja, a ukoliko se ipolji negativno dejstvo hemikalija na mikrobnu zajednicu, oporavljaju se u periodu od 100 dana.

Ispitivanja na kojima se zasniva ova metoda primarno su bila osmišljena za supstance za koje se može procjeniti u kojoj količini dospijevaju u zemljište. To je npr. slučaj sa sredstvima za zaštitu bilja za koje je poznat režim primjene. Kad je reč o agrohemikalijama dovoljno je ispitivanje dvije doze koje odgovaraju očekivanom ili predviĐenom režimu primjene u polju. Agrohemikalije se ispituju kao aktivni sastojci ili kao formulacije. Ispitivanje nije ograničeno samo na agrohemikalije. Promjenom količine ispitivane supstance primjenjene na zemljište i načina na koji se podaci evaluiraju ispizuju se i hemikalije za koje nije poznato u kojoj količini dospijevaju do zemljišta. Za hemikalije koje nisu agrohemikalije, određuje se serija koncentracija i ispituje njihov efekat na transformaciju azota. Podaci iz ovih ispitivanja koriste se za dobijanje krive dozne zavisnosti i za procjenu EC_x vrijednosti, gde je x unaprijed definisani procenat efekta.

1.2. Definicije

Transformacija azota je potpuna mikrobiološka razgradnja organske materije koja sadrži azot, preko procesa ssupstancaanja amonijaka i nitrita do obrazovanja nitrata.

Efektivna koncentracija (u daljem tekstu: EC_x) je koncentracija ispitivane supstance u zemljištu za koju se procjenjuje inhibicija transformacije azota u nitrate za unaprijed definisan procenat x.

Srednja efektivna koncentracija (u daljem tekstu: EC_{50}) je koncentracija ispitivane supstance u zemljištu za koju se procjenjuje 50% inhibicija transformacije azota u nitrate.

1.3. Referentne supstance

Za metodu ispitivanja transformacije azota nisu date referentne supstance.

1.4. Princip metode

Prosijano zemljište obogaćuje se biljnim hranivom u prahu i zatim se tretira sa ispitivanom supstancom ili ostavi netretirano (kontrola). Ako se ispituju agrohemikalije, ispituju se minimalno dvije koncentracije ispitivane supstance i one su određene u odnosu na najveću koncentraciju očekivanu na njivama. Nakon 0, 7, 14 i 28 dana inkubacije, uzorci zemljišta za ispitivanu i kontrolnu grupu se ekstrahuju sa odgovarajućim rassupstancaačem i određuje se količina azota u ekstraktima. Brzina obrazovanja azota u ispitivanim grupama poredi se sa brzinom obrazovanja u kontrolisanim grupama i iizračunava se procenat odstepena u odnosu na kontrolu. Sva ispitivanja traju najmanje 28 dana. Ako je 28. dana razlika između ispitivanih i kontrolnih grupa jednaka ili veća od 25%, ispitivanje se produžuje do maksimalno 100 dana. Ako se ispituju hemikalije koje nisu agrohemikalije, ispitivana supstanca se dodaje uzorcima zemljišta u seriji koncentracija i mjeri se količina obrazovanog azota u ispitivanim i kontrolnih grupama nakon 28 dana inkubacije. Rezultati ispitivanja sa više koncentracija ispitivane supstance analiziraju se regresionom analizom i iizračunavaju se EC_x vrijednosti (npr. EC_{50}, EC_{25}, odnosno EC_{10}).

1.5. Validnost ispitivanja

Procjene rezultata dobijenih ispitivanjem agrohemikalija baziraju se na relativno malim razlikama (npr. prosječna vrijednost ± 25%) između koncentracija nitrata u ispitivanim i kontrolnih grupama,pa veliki procenat varijacije rezultata u kontrolisanim grupama dovodi do pogrešnih rezultata. Varijacija u kontroli je manja od ± 15%.

1.6. Opis metode

1.6.1. Oprema

Koriste se posude napravljene od hemijski inertnog materijala. Posude su odgovarajuće zapremine u skladu sa procedurom za inkubaciju zemljišta, npr. inkubacija jedinstvenog uzorka ili u seriji pojedinačnih uzoraka zemljišta (dio 1.7.1.2. ove metode). Preduzimaju se mjere za smanjenje gubitka vode i obezbiječuje se nesmetana razmjena gasova u toku ispitivanja (npr. posude se prekrivaju perforiranom polietilenskom folijom). Pri ispitivanju isparljivih supstanci koriste se posude koje se mogu hermetički zatvoriti. Zapremina posuda je četiri puta veća od zapremine samog uzorka zemljišta

Pored standardne laboratorijaske aparature koriste se:

- miješalica (mehanički uređaj ili druga odgovarajuća oprema);
- centrifuga (3.000 g) ili uređaj za filtraciju (filter papir bez nitrata);
- uređaj za analizu nitrata odgovarajuće osjetljivosti i ponovljivosti mjerenja.

1.6.2. Izbor i broj vrsta zemljišta

Koristi se jedna vrsta zemljišta. Preporučena svojstva zemljišta su:

- sadržaj pijeska ne manji od 50% i ne veći od 75%;
- pH vrijednost 5,5 do 7,5;

- sadržaj organskog ugljenika 0,5% do 1,5%;
- najmanje 1% ukupnog sadržaja organskog ugljenika u zemljištu potiče iz mikrobiološke biomase koju treba izmjeriti.

U većini slučajeva ovakav sastav zemljišta odlikuju veoma loša svojstva, s obzirom na to da je adsorpcija ispitivane supstance minimalna, a njena biodostupnost maksimalna. Prema

tome, ispitivanja sa drugim tipovima zemljišta nisu neophodna. Ipak u određenim slučajevima, npr. kada se očekuje najviša primjena ispitivane supstance na posebnim tipovima zemljišta poput kiselih šumskih zemljišta, ili su u pitanju hemikalije sa elektrostatičkim nabojem, postoji potreba za dodatnim ispitivanjem i drugih vrsta zemljišta.

1.6.3. Sakupljanje i skladištenje uzoraka zemljišta

1.6.3.1. Sakupljanje

Rapolaže se detaljnim podacima o lokalitetu sa kog su uzeti uzorci zemljišta za potrebe ispitivanja. Podaci uključuju tačnu lokaciju uzorkovanja, biljni pokrivač, datume primjene sredstava za zaštitu bilja, tretmane sa organskim i neorganskim Đubrivima, upotrebu bioloških materijala ili kontaminacije usled nesrećnog slučaja. Mjesto izabrano za uzimanje uzoraka zemljišta treba da omogući dugotrajnu upotrebu. Pogodni lokaliteti za uzorkovanje su trajni pašnjaci, njive pod jednogodišnjim žitaricama (osim kukuruza), ili gusto zasejane, naĐubrene površine. Izabrani lokalitet ne smije biti tretiran nikakvim organskim Đubrivom najmanje šest mjeseci. Upotreba mineralnih Đubriva je prihvatljiva samo u količini potrebnoj za normalan rast i razvoj bilja, a uzorci zemljišta se mogu uzimati najmanje tri mjeseca nakon primjene Đubriva. Treba izbjegavati ispitivanje zemljišta tretiranog Đubrivima sa poznatim biocidnim efektima, npr. kalcijumcijanamidom.

Uzorkovanje treba izbjegavati u toku ili neposredno nakon dugih perioda suše (dužih od 30 dana), ili zadržavanja vode. Za preorana zemljišta treba uzimati uzorke sa dubine od 0 cm do 20 cm. Za travnjake (pašnjake) ili druga zemljišta koja nisu duže vrijeme orana (najmanje jednu sezonu), maksimalna dubina uzorkovanja može biti nešto viša od 20 cm, npr. do 25 cm).

Uzorke zemljišta treba transportovati u odgovarajućim posudama i temperaturnim uslovima koji omogućavaju nepromjenjivost svojstva zemljišta u toku transporta.

1.6.3.2. Skladištenje

Poželjno je ispitivati uzorke zemljišta neposredno nakon uzorkovanja. Ukoliko se uzorci ne mogu odmah ispitivati, skladište se u mraku na temperaturi od 4°C ± 2 °C, maksimum tri mjeseca. U toku skladištenja moraju se obezbijediti aerobni uslovi. Ako se uzorci zemljišta uzimaju sa mjesta gde je zemljište smrznuto najmanje tri mjeseca u toku godine, može se razmotriti skladištenje uzorka na temperaturi od -18 °C do - 22 °C. Mikrobiološka biomasa skladištenih uzoraka zemljišta mjeri se pre početka svakog ispitivanja, a sadržaj ugljenika u biomasi treba da bude najmanje 1% ukupnog organskog ugljenika u zemljištu (tačka 1.6.2. ove metode).

1.6.4. Rukovanje i priprema uzoraka zemljišta za ispitivanje

1.6.4.1. Predinkubacija

Ako su uzorci zemljišta skladišteni (tačka 1.6.3.2. ove metode), preporučuje se predinkubacija u trajanju od 2 do 28 dana. Temperatura i sadržaj vlage u uzorcima u toku predinkubacije treba da budu približni zahtjevima ispitivanja (tačke 1.6.4.2. i 1.7.1.3. ove metode).

1.6.4.2. Fizička i hemijska svojstva

Uzorci zemljišta se ručno čiste od velikih predmeta (npr. kamenje, delovi biljaka, itd) i mokro prosijavaju bez suvišnog sušenja na čestice veličine manje ili jednake od 2 mm. Sadržaj vlage u uzorku zemljišta treba podesiti destilovanom ili dejonizovanom vodom na vrijednost između 40% i 60% maksimalnog kapaciteta zadržavanja vode.

1.6.4.3. Obogaćivanje organskim supstratom

Zemljište treba obogatiti odgovarajućim organskim supstratom, npr. hranivom od lucerke u prahu (glavni sastojak: Medicago sativa) sa odnosom C/N između 12/1 i 16/1. Preporučen odnos lucerke i zemljišta je 5 g lucerke po kilogramu zemljišta (suve težine).

1.6.5. Priprema ispitivane supstance za ispitivanje na uzorcima zemljišta

Ispitivana supstanca se obično primjenjuje uz upotrebu nosača. Nosač može biti voda (za supstance rastvorljive u vodi) ili inertni materijal poput finog kvarcnog pijeska (veličina čestica: 0,1 mm do 0,5 mm). Treba izbjegavati upotrebu tečnih nosača, osim vode (npr. organski rassupstancaači kao aceton, hloroform) s obzirom na to da Dijeluju negativno na mikrofloru. Ukoliko se koristi Pijesak kao nosač, može se prekriti sa ispitivanom supstancom rastvorenom ili suspendovanom u odgovarajući rassupstancaač. U takvim slučajevima, rassupstancaač treba ukloniti isparavanjem prije miješanja sa zemljištem. Za optimalnu distribuciju ispitivane supstance u zemljištu, preporučuje se odnos od 10 g pijeska po kilogramu zemljišta (suve težine). Kontrolni uzorci se tretiraju samo sa ekvivalentnom količinom vode, odnosno kvarcnog pijeska.

Kod ispitivanja isparljivih supstanci treba izbjegavati gubitke u toku ispitivanja i omogućiti njenu homogenu raspoDijelu u zemljištu (npr. ispitivanu supstancu injektirati u zemljište na nekoliko mjesta).

1.6.6. Koncentracije ispitivane supstance

Ako se isputuju agrohemikalije, treba koristiti najmanje dve koncentracije ispitivane supstance.
Niža koncentracija treba da odgovara najmanje maksimalnoj količini ispitivane supstance za koju se očekuje da će dospijeti do zemljišta u realnim uslovima, dok viša koncentracija treba da bude umnožak niže koncentracije. Koncentracije ispitivane supstance dodate uzorcima zemljišta iizračunavaju se uz pretpostavku da je ona ravnodnosno raspodijeljena do dubine od 5 cm i da je gustina zemljišta 1,5. Za agrohemikalije koje se primjenjuju direktno na zemljište, ili za hemikalije za koje se može predvidjeti količina koja dospijeva do zemljišta, preporučene koncentracije za ispitivanje su maksimalna predvidljiva koncentracija u životnoj sredini (Predictable Environmental Concentration, u daljem tekstu: PEC) i koncentracije pet puta veće od vrijednosti PEC. Supstance koje će biti primjenjene na zemljište više puta u jednoj sezoni treba ispitivati u koncentracijama dobijenim množenjem vrijednosti PEC sa maksimalnim brojem predviĐenih primjena. Ipak, viša koncentracija ne sme biti veća od desetostruke vrijednosti najveće primjenjene koncentracije po pojedinačnoj primjeni. Ako se ispituju hemikalije koje nisu agrohemikalije. Koristi se geometrijska serija od najmanje pet koncentracija ispitivane supstance. Koncentracije ispitivane supstance bi trebale pokrivati opseg potreban za određivanje EC_x vrijednosti.

1.7. IzvoĐenje ispitivanja

1.7.1. Uslovi izloženost

1.7.1.1. Ispitivane i kontrolne grupe

Ukoliko se ispituju agrohemikalije, zemljišta se dijeli u tri uzorka jednake težine. Dva uzorka se miješaju sa nosačem koji sadrži ispitivanu supstancu, a treći sa nosačem bez ispitivane supstance (kontrola). Preporučuju se minimalno tri ponavljanja za svaki uzorak, sa i bez ispitivane supstance. Ako se ispituju hemikalije koje nisu agrohemikalije, zemljište se dijeli u šest uzoraka jednake težine. Pet uzoraka se miješa sa nosačem koji sadrži ispitivanu supstancu, a šesti sa nosačem bez ispitivane supstance. Preporučujeju se tri ponavljanja po svakom uzorku, sa i bez ispitivane supstance. Treba omogućiti homogenu raspoDijelu supstance u ispitivanim uzorcima zemljišta. Tokom miješanja treba izbjegavati presovanje ili gnječenje zemljišta.

1.7.1.2. Inkubacija uzoraka zemljišta

Razlikuju se dva načina inkubacija uzoraka zemljišta zavisno od toga da li su u pitanju jedinstveni uzorci svakog ispitivanog i svakog kontrolnog uzorka zemljišta ili serije pojedinačnih poduzoraka jednake veličine za ispitivane i za kontrolne uzorke zemljišta. U slučaju isparljivih supstanci ispitivanje, ipak, treba izvesti samo sa serijama pojedinačnih poduzoraka. Kada se zemljište inkubira kao jedan jedinstveni uzorak, pripremaju se velike količine zemljišta za ispitivane i kontrolne grupe i po potrebi uzimaju se poduzorci i analiziraju. Količina inicijalno pripremljenih uzoraka za eksperimenzemljištane i kontrolne grupe zavisi od veličine poduzoraka, broja ponavljanja i predviĐenog maksimalnog broja uzorkovanja. Zemljišta inkubirana kao jedinstveni uzorak treba dobro promiješati pre uzimanja poduzoraka. Kada se uzorci inkubiraju u seriji pojedinačnih poduzoraka zemljišta, osnovni uzorak za ispitivane i kontrolne uzorke dijeli se na traženi broj poduzoraka i oni se koriste po potrebi. U ispitivanjima gde se može očekivati više od dva uzorkovanja, treba obezbijediti dovoljan broj poduzoraka koji može da bude dovoljan za sva ponavljanja i svako uzorkovanje. Treba uraditi najmanje tri ponavljanja po koncentraciji ispitivane supstance i inkubirati u aerobnim uslovima (tačka 1.7.1.1. ove metode). Tokom svih ispitivanja, treba koristiti adekvatne posude koje onemogućavaju razvijanje anaerobnih uslova. U slučaju isparljivih supstanci, ispitivanje se izvodi samo sa serijom pojedinačnih poduzoraka.

1.7.1.3. Uslovi i trajanje ispitivanja

Ispitivanje se vrši u mraku na temperaturi 20°C ± 2 °C. Sadržaj vlage u uzorcima zemljišta treba održavati između 40% i 60% maksimalnog kapaciteta zadržavanja vode u zemljištu (tačka 1.6.4.2. ove metode) sa odstepenima od ± 5%. Po potrebi, može se dodavati destilovana, dejonizovana voda.

Minimalno trajanje ispitivanja je 28 dana. Ako se ispituju agrohemikalije, uporeĐuju se brzine ssupstancaanja nitrata u ispitivanim grupama u odnosu na kontrolu. Ako se 28. dana ove vrijednosti razlikuju za više od 25% ispitivanje se nastavlja dok se ne postigne razlika ≤ 25% ili maksimalno do 100 dana, zavisno koji uslov se pre ispuni. Ako se ispituju hemikalije koje nisu agrohemikalije, ispitivanje se prekida nakon 28 dana. Tada se određuju količine nitrata u ispitivanim i kontrolisanim uzorcima zemljišta i iizračunava EC_x vrijednost.

1.7.2. Uzorkovanje i analiza zemljišta

1.7.2.1. Shema uzorkovanja zemljišta

Kada se ispituju agrohemikalije, određuje se sadržaj nitrata u uzorcima zemljišta na početku ispitivanja, 7, 14. i 28. dana. Ako je potrebno produžiti ispitivanje, treba obaviti dodatna mjerenja svakih 14 dana nakon 28. dana.

Ako se ispituju supstance koje nisu agrohemikalije, ispituje se najmanje pet koncentracija ispitivane supstance i sadržaj nitrata se određuje u uzorcima zemljišta na početku (dan 0) i na kraju perioda izlaganja (28. dan). Ukoliko se pokaže potrebnim dodatno mjerenje se može obaviti sredinom tog perioda, npr. sedmog dana. Podaci dobijeni 28. dana koriste se u odreĐivanju EC_x vrijednosti za datu hemikaliju. Podaci dobijeni iz kontrolnih uzoraka na početku ispitivanja mogu se koristiti i u procjenjivanju sadržaja nitrata u zemljištu.

1.7.2.2. Analiza uzoraka zemljišta

Količina obrazovanog azota u svakom ponavljanju za uzorke zemljišta ispitivane i kontrolne grupe određuje se pri svakom vremenu uzorkovanja. Nitrati se ekstrahuju iz zemljišta miješanjem uzoraka sa odgovarajućim ekstrakcionim sredstvima, npr. 0,1 M rastvor kalijum hlorida.
Preporučuje se odnos od 5 ml rastvora KCl po gramu suve težine ekvivalenta zemljišta. Da bi ekstrakcija bila optimalna, posude sa zemljištem i ekstrakcionim sredstvom ne treba da budu napunjene više od polovine. Smješe se miješaju na 150 rpm 60 minuta. Smkeše se centrifugiraju ili filtriraju i u supernatantu se određuje sadržaj nitrata. Supernatant se može pre analize čuvati do šest mjeseci na - 20°C ± 5 °C.

2. Podaci

2.1. Obrada rezultata

Ako se ispituju agrohemikalije, bilježi se količina obrazovanog azota u svakom poduzorku zemljišta, a srednje vrijednosti svih poduzoraka za kontrolnu i ispitivanu grupu treba prikazati tabelarno. Brzina transformacije azota određuje se odgovarajućim i opšteprihvatljivim statističkim metodama (F-test, nivo značaja 5%). Količina obrazovanog azota izražava se u mg azota/kg suve težine zemljišta/dan. Brzina ssupstancaanja azota u svakoj ispitivanoj grupi poredi se sa kontrolnom grupom i računa se procenat odstepena od kontrole.

Ako se ispituju hemikalije koje nisu agrohemikalije, određuju se količine obrazovanog azota u svakom poduzorku i pravi se kriva dozne zavisnosti za procjenu EC_x vrijednosti. Količine azota (npr. mg azota/kg suve težine zemljišta) u ispitivanim grupama nakon 28 dana porede se sa količinom azota nastalom u kontroli. Iz tih podataka se računa procenat inhibicije za svaku koncentraciju ispitivane supstance. Vrijednosti procenata inhibicije prikazuju se grafički u funkciji koncentracija ispitivane supstance, a za određivanje EC_x vrijednosti koriste se statističke procedure. Intervali povjerenja ($p = 0,95$) za izračunate EC_x određuju se i putem standardnih procedura. Supstance koje sadrže visoke količine azota doprinose količini azota koja nastaje u toku ispitivanja. Ako se te supstance ispituju u višoj koncentraciji (hemikalije za koje se očekuje da će se primjenjivati u više navrata), u ispitivanje se moraju uključiti odgovarajuće kontrole (npr. zemljište sa ispitivanom supstancom, ali bez biljnog hraniva). Podaci iz tih kontrola moraju se uzeti u obzir pri računanju EC_x vrijednosti.

2.2. Tumačenje rezultata

Kada se procjenjuju rezultati ispitivanja sa agrohemikalijama i kad je razlika u brzini ssupstancaanja azota između prve ispitivane grupe u seriji (maksimalna predviĐena koncentracija) i kontrole ≤ 25% u bilo kojem vremenu uzorkovanja nakon 28. dana, za date hemikalije se može ocjeniti da nemaju dugoročni uticaj na transformaciju azota u zemljištu. Kada se procjenjuju rezultati dobijeni ispitivanjem supstanci koje nisu agrohemikalije, koriste se EC_{50}, EC_{25}, odnosno EC_{10} vrijednosti.

3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži:

1) potpunu identifikaciju korišćenog zemljišta, uključujući:

- geografske odrednice mjesta (geografska širina i dužina);
- podatke o istoriji mjesta (npr. biljni pokrivač, tretmani sredstvima za zaštitu bilja, tretmani ĐubrivIma, akcedentne kontaminacije itd);
- upotreba zemljišta (npr. poljoprivredno zemljište, šuma itd);
- dubina uzorkovanja (cm);
- sadržaj pijeska/mulja/gline (% suve težine);
- pH vrijednosti (u vodi);

- sadržaj organskog ugljenika (% suve težine);
- sadržaj azota (% suve težine);
- početna koncentracija azota (mg azota/kg suve težine);
- jonsko izmjenjivački kapacitet (mmol/kg);
- početna biomasa mikroorganizama u procentima u odnosu na ukupan organski ugljenik;
- reference svih metoda korišćenih za određivanje svakog parametra;
- svi podaci u vezi sa sakupljanjem i skladištenjem uzoraka zemljišta; - detalji o predinkubaciji, ako postoje.

2) Podatke o ispitivanoj supstanci:

- fizičke osobine i gdje je bitno, fizičko-hemijske osobine;
- podaci za hemijsku identifikaciju, gde je bitno, uključujući strukturnu formulu, stepen čistoće (npr.

za sredstva za zaštitu bilja, procenat aktivnog sastojka), sadržaj azota. 3) supstrat:

- porijeklo supstrata;
- sastav (npr. hraniva sa lucerkom); - sadržaj ugljenika, azota (% suve težine);
- veličina sita (mm).

4) uslovi ispitivanja:

- opis načina obogaćivanja zemljišta organskim supstratom;
- broj koncentracija ispitivane supstance i gdje je prikladno, opravdanje za izbor datih koncentracija;
- opis uvođenja ispitivane supstance u zemljište;
- temperatura inkubacije;
- sadržaj vlage u zemljištu na početku i u toku ispitivanja;
- korišćena metoda inkubacije zemljišta (npr. kao jedinstveni uzorak ili kao serija pojedinačnih poduzoraka);
- broj ponavljanja;
- broj uzorkovanja;
- metoda korišćena za ekstrakciju azota iz zemljišta; 5) rezultati:
- procedure i oprema za analitičko određivanje azota;
- tabelarni podaci uključujući pojedinačne i srednje vrijednosti za mjerenje azota;
- varijansa u kontrolisanim i eksperimentalnim grupama;
- objašnjene korekcija u iizračunavanju, ukoliko je bitno;

- procenat razlike brzine ssupstancaanja azota pri svakom vremenu uzorkovanja, ili, ako je prikladno, EC_{50} sa 95% intervalima povjerenja, druge EC_x vrijednosti (npr. EC_{25} ili EC_{10}) sa intervalima pouzdanosti i grafik krive dozne zavisnosti;
- statistička obrada rezultata;
- sve dodatne podatke i opažanja potrebne za tumačenje rezultata.

Ispitivanje transformacije ugljenika se zasniva na OECD TG 217 (2000) uputstvu ispitivanja.

1.1. Uvod

Metoda ispitivanja transformacije ugljenika opisuje laboratorijaski postupak za procjenu dugoročnih potencijalnih efekata sredstava za zaštitu bilja i po mogućnosti, drugih hemikalija na aktivnost transformacije ugljenika od strane zemljišnih mikroorganizama pri jednokratnom izlaganju. Metoda se bazira na preporukama Evropske i Mediteranske Organizacije za zaštitu bilja (European and Mediterranean Plant Protection Organization)[1]. Uzete su u obzir i druge smjernice, uključujući smjernice Njemačkog državnog instituta za biologiju (Biologische Bundesanstalt), Amjeričke agencije za zaštitu životne sredine (US Environmental Protection Agency)[3] i SETACPreporuke za sakupljanje, rukovanje i skladištenje uzoraka zemljišta baziraju se na ISO standardu[6] i preporukama radionice.

U procjeni i evaluaciji toksičnih efekata ispitivane supstance, utvrĐivanje efekta na aktivnost zemljišnih mikroorganizama je neophodno, npr. kada se traže podaci o mogućem negativnom djelovanju sredstava za zaštitu bilja na zemljišnu mikrofloru ili kada se očekuje izloženost zemljišnih mikroorganizama drugim hemikalijama koje ne spadaju u sredstva za zaštitu bilja. Ispitivanje transformacije ugljenika izvodi se u cilju procjene efekta hemikalija na zemljišnu mikrofloru. Ako se ispituju agrohemikalije (npr. sredstva za zaštitu bilja, Đubriva, hemikalije u šumarstvu), izvodi se i ispitivanje transformacije ugljenika i transformacije azota. Ako se ispituju druge hemikalije, ispitivanje transformacije azota je dovoljno. Ukoliko se vrijednost EC_{50} dobijena iz ispitivanja transformacije azota za date hemikalije nalazi u opsegu EC_{50} vrijednosti koje su utvrĐene za komercijalno dostupne inhibitore nitrifikacije (npr. nitrapyrin), ispituje se transformacija ugljenika da bi se dobilo više podataka.

Zemljište se sastoji od žive i nežive komponente koje egzistiraju u kompleksnim i heterogenim smješama. Mikroorganizmi igraju važnu ulogu u razgradnji i transformaciji organske materije. U plodnim zemljištima sa velikim brojem vrsta, mikroorganizami doprinose različitim aspektima plodnosti zemljišta. Bilo kakav dugoročni uticaj na biohemijske procese potencijalno se odražava na procese čvrstenja nutrijenata, a navedeno na plodnost zemljišta. Transformacija ugljenika i azota odvija se u svim tipovima plodnih zemljišta. Iako se mikrobiološke zajednice razlikuju od zemljišta do zemljišta, putevi transformacije nutrijenata su u osnovi isti.

Metoda ispitivanja transformacije ugljenika služi za procjenu dugoročnih negativnih efekata supstanci na proces transformacije ugljenika u aerobnim površinskim slojevima zemljišta. Metoda je dovoljno osjetljiva da detektuje promjene u veličini i aktivnosti mikrobnih zajednica koje su odgovorne za transformaciju ugljenika s obzirom na to da su ovim ispitivanjem te zajednice izložene stresu usled izlaganja hemikalijama i stresu zbog smanjene količine ugljenika. Za potrebe ispitivanja koristi se pjeskovito zemljište sa niskim sadržajem organske materije. Zemljište se tretira sa ispitivanom supstancom i inkubira u uslovima koji omogućavaju brz mikrobiološki metabolizam. U ovakvim uslovima izvori rapoloživog ugljenika u zemljištu brzo se iscrpljuju. Smanjenje količine rapoloživog ugljenika na kraju

dovodi do nestanka mikroorganizama ili nastupa faza dormancije, odnosno sporulacije. Ako ispitivanje traje više od 28 dana, poslijedice ovih reakcija mjere se u kontroli (netretirano zemljište) kao progresivan gubitak metabolički aktivne mikrobiološke biomase. Ako na biomasu mikroorganizama sa smanjenom količinom rapoloživog ugljenika u zemljištu, u uslovima definisanim za ovu metodu, Dijeluje ispitivana supstanca, oporavak možda nije moguć. U većini slučajeva negativni uticaji uzrokovani ispitivanom supstancom u bilo kom momentu ispitivanja, traju do kraja ispitivanja.

Ispitivanja na kojima se zasniva ova metoda primarno su bila osmišljena za supstance za koje se procjenjuje u kojoj količini dospijevaju u zemljište. To je slučaj kod sredstava za zaštitu bilja sa poznatim režimom primjene. Za agrohemikalije, dovoljno je ispitivanje dvije doze koje odgovaraju očekivanom ili predviđenom režimu primjene u polju. Agrohemikalije se ispituju kao aktivni sastojci ili kao formulacije. Ispitivanje nije ograničeno samo na hemikalije za koje se predviđaju njihove koncentracije u životnoj sredini. Promjenom količine ispitivane supstance primjenjene na zemljište i načina na koji se podaci procjenjuju, ispitivanje se koristi i za hemikalije za koje se ne zna u kojoj količini dospijevaju do zemljišta. Za hemikalije koje nisu agrohemikalije, određuje se serija koncentracija i ispituje njihov efekat na transformaciju ugljenika. Podaci iz ovih ispitivanja koriste se za dobijanje krive dozne zavisnosti i za procjenu EC_x vrijednosti, gdje je x unaprijed definisan procenat efekta.

1.2. Definicije

Transformacija ugljenika je mikrobiološka razgradnja organske materije u ugljen-dioksid.

Efektivna koncentracija (u daljem tekstu: EC_x) jeste koncentracija ispitivane supstance u zemljištu za koju se procjenjuje inhibicija transformacije ugljenika u ugljen-dioksid za unaprijed definisan procenat inhibicije x.

Srednja efektivna koncentracija (u daljem tekstu: EC_{50}) jeste koncentracija ispitivane supstance u zemljištu za koju se procjenjuje 50% inhibicija transformacije ugljenika u ugljen-dioksid.

1.3. Referentne supstance

Za metodu ispitivanja transformacije ugljenika nisu date referentne supstance.

1.4. Princip metode

Prosijano zemljište se tretira ispitivanom supstancom ili se ostavi netretirano (kontrola). Ako se ispituju agrohemikalije, ispituju se najmanje dvije koncentracije ispitivane supstance i one su određene u odnosu na najveću koncentraciju koja će se primjeniti. Nakon 0, 7, 14 i 28 dana inkubacije, uzorci zemljišta ispitivane i kontrolne grupu miješaju se sa glukozom i mjeri se brzina glukozom indukovane respiracije za narednih 12 sati. Brzina respiracije izražava se kao oslobođeni ugljen-dioksid (mg ugljen-dioksida/ kg suvog zemljišta/h) ili kao utrošeni kiseonik (mg kiseonika/kg zemljišta/h). Srednja vrijednost brzine respiracije u ispitivanim grupama poredi se sa brzinom u kontrolisanim grupama i iizračunava se procenat smanjenja u odnosu na kontrolu. Sva ispitivanja se izvode u trajanju najmanje 28 dana.

Ako su 28. dana razlike u brzini respiracije između ispitivanih i kontrolnih grupa ≥ 25%, mjerenja se nastavljaju na svakih 14 dana u trajanju najviše do 100 dana. Ako su u pitanju supstance koje nisu agrohemikalije, ispituju se i dodatne koncentracije te supstance (ne samo dve) i mjeri se glukozom indukovana brzina respiracije (npr. srednja vrijednost

oslobođenog ugljen-dioksida ili utrošenog kiseonika) nakon 28 dana. Rezultati ispitivanja serije koncentracija analiziraju se korišćenjem regresionih modela i iizračunavaju se EC_x vrijednosti (npr. EC_{50}, EC_{25}, odnosno EC_{10}).

1.5. Validnost ispitivanja

Procjene rezultata dobijenih ispitivanjem agrohemikalija baziraju se na relativno malim razlikama (prosječna vrijednost ± 25%) između oslobođenog ugljen-dioksida ili utrošenog kiseonika u ispitivanim i kontrolisanim grupama, pa veliki procenat varijacije u kontrolisanim grupama može uzrokovati pogrešan rezultat. Varijansa u kontroli je manja od ± 15%.

1.6. Opis metode

1.6.1. Oprema

Koriste se posude napravljene od hemijski inertnog materijala. Posude su odgovarajuće zapremine u skladu sa postupkom za inkubaciju zemljišta, npr. inkubacija jedinstvenog uzorka ili u seriji pojedinačnih poduzoraka zemljišta (dio 1.7.1.2. ove metode). Preduzimaju se mjere za smanjenje gubitka vode i obezbjeđuje se nesmetana razmjena gasova u toku ispitivanja (posude se prekrivaju perforiranom polietilenskom folijom). Kada se ispituju isparljive supstance, koristie se zatvorene posude koje se mogu hermetički zatvoriti. Zapremina posuda je četiri puta veća od zapremine samog uzorka zemljišta.

Za određivanje glukozom indukovane respiracije, koriste se sistemi za inkubaciju i instrumenti za mjerenje produkcije ugljen-dioksida ili potrošnje kiseonika.

1.6.2. Izbor i broj vrsta zemljišta

Koristi se jedna vrsta zemljišta. Preporučena svojstva zemljišta su:

- sadržaj pjeska ne manji od 50% i ne veći od 75%;
- pH vrijednost 5,5 do 7,5;
- sadržaj organskog ugljenika 0,5% do 1,5%;
- najmanje 1% ukupnog sadržaja organskog ugljenika u zemljištu potiče iz mikrobiološke biomase koju treba izmjeriti.

U većini slučajeva ovakav sastav zemljišta odlikuju veoma loša svojstva, s obzirom na to da je adsorpcija ispitivane supstance minimalna, a njena biodostupnost maksimalna. Prema tome, ispitivanja sa drugim tipovima zemljišta nisu neophodna. Ipak u određenim slučajevima, npr. kada se očekuje najviša primjena ispitivane supstance na posebnim tipovima zemljišta poput kiselih šumskih zemljišta, ili su u pitanju hemikalije sa elektrostatičkim nabojem, postoji potreba za dodatnim ispitivanjem i drugih vrsta zemljišta.

1.6.3. Sakupljanje i skladištenje uzoraka zemljišta

1.6.3.1. Sakupljanje

Rapolaže se sa detaljnim podacima o lokalitetu sa kog su uzeti uzorci zemljišta za potrebe ispitivanja. Podaci uključuju tačnu lokaciju uzorkovanja, biljni pokrivač, datume primjene sredstava za zaštitu bilja, tretmane sa organskim i neorganskim Đubrivima, upotrebu bioloških materijala ili kontaminacije usled nesrećnog slučaja. Mjesto izabrano za uzimanje uzoraka zemljišta omogućava dugotrajnu upotrebu. Pogodni lokaliteti za uzorkovanje su trajni pašnjaci, njive pod jednogodišnjim žitaricama (osim kukuruza), ili gusto zasijane,

naĐubrene površine. Izabrani lokalitet nije tretiran nikakvim organskim Đubrivom najmanje šest mjeseci. Upotreba mineralnih Đubriva je prihvatljiva samo u količini potrebnoj za normalan rast i razvoj bilja, a uzorci zemljišta se uzimaju najmanje tri mjeseca nakon primjene Đubriva. Izbjegava se ispitivanje zemljišta tretiranog Đubrivima sa poznatim biocidnim efektima, npr. kalcijum-cijanamidom.

Uzorkovanje izbjegavati u toku ili neposredno nakon dugih perioda suše (dužih od 30 dana), ili zadržavanja vode. Za preorana zemljišta uzeti uzorke sa dubine od 0 cm do 20 cm. Za travnjake (pašnjake) ili druga zemljišta koja nisu duže vrijeme orana (najmanje jednu sezonu), maksimalna dubina uzorkovanja je viša od 20 cm, npr. do 25 cm).

Uzorke zemljišta transportovati u odgovarajućim posudama i temperaturnim uslovima koji omogućavaju nepromjenjivost svojstva zemljišta u toku transporta.

1.6.3.2. Skladištenje

Ispitivati uzorke zemljišta neposredno nakon uzorkovanja. Ukoliko se uzorci ne mogu odmah ispitivati, skladište se u mraku na temperaturi od 4°C ± 2 °C, maksimum tri mjeseca. U toku skladištenja obezbijeĐuju se aerobni uslovi. Ako se uzorci zemljišta uzimaju sa mjesta gdje je zemljište smrznuto najmanje tri mjeseca u toku godine, razmatra se skladištenje uzorka na temperaturi od -18 °C. Mikrobiološka biomasa skladištenih uzoraka zemljišta mjeri se prije početka svakog ispitivanja, a sadržaj ugljenika u biomasi je najmanje 1% ukupnog organskog ugljenika u zemljištu (dio 1.6.2. ove metode).

1.6.4. Rukovanje i priprema uzoraka zemljišta za ispitivanje

1.6.4.1. Predinkubacija

Ako su uzorci zemljišta skladišteni (dio 1.6.3.2. ove metode), predinkubacija traje od 2 do 28 dana. Temperatura i sadržaj vlage u uzorcima u toku predinkubacije su približni zahtjevima ispitivanja (dio 1.6.4.2. i 1.7.1.3. ove metode).

1.6.4.2. Fizička i hemijska svojstva

Uzorci zemljišta se ručno čiste od velikih predmeta (npr. kamenje, djelovi biljaka, itd) i mokro prosijavaju bez suvišnog sušenja na čestice veličine manje ili jednake od 2 mm. Sadržaj vlage u uzorku zemljišta podesiti destilovanom ili dejonizovanom vodom na vrijednost između 40% i 60% maksimalnog kapaciteta zadržavanja vode.

1.6.5. Priprema ispitivane supstance za ispitivanje na uzorcima zemljišta

Ispitivana supstanca se obično primjenjuje uz upotrebu nosača. Nosač je voda (za supstance rastvorljive u vodi) ili inertni materijal poput finog kvarcnog pijeska (veličina čestica: 0,1 mm do 0,5 mm). Izbjegava se upotrebu tečnih nosača, osim vode (npr. organski rassupstancaači kao aceton, hloroform) s obzirom na to da Dijeluju negativno na mikrofloru. Ukoliko se koristi pijesak kao nosač, prekriva se sa ispitivanom supstancom rastvorenom ili suspendovanom u odgovarajući rassupstancaač. U takvim slučajevima, rassupstancaač se uklanja isparavanjem prije miješanja sa zemljištem. Za optimalnu distribuciju ispitivane supstance u zemljištu, koristi se odnos od 10 g pijeska po kilogramu zemljišta (suve težine). Kontrolni uzorci se tretiraju samo sa ekvivalentnom količinom vode, odnosno kvarcnog pijeska.

Kod ispitivanja isparljivih supstanci izbjegavati gubitke u toku ispitivanja i omogućiti njenu homogenu raspoDijelu u zemljištu (npr. ispitivanu supstancu injektirati u zemljište na nekoliko mjesta).

1.6.6. Koncentracije ispitivane supstance

Ako se ispituju sredstva za zaštitu bilja ili druge hemikalije sa predvidljivim koncentracijama u životnoj sredini koriste se najmanje dvije koncentracije ispitivane supstance. Niža koncentracija odgovara najmanje maksimalnoj količini ispitivane supstance za koju se očekuje da će dospjeti do zemljišta u realnim uslovima, dok je viša koncentracija umnožak niže koncentracije. Koncentracije ispitivane supstance dodate uzorcima zemljišta iizračunavaju se uz pretpostavku da je ona ravnodnosno raspodijeljena do dubine od 5 cm i da je gustina zemljišta 1,5. Za agrohemikalije koje se primjenjuju direktno na zemljište, ili za hemikalije za koje se predviĐa količina koja dospijeva do zemljišta, preporučene koncentracije za ispitivanje su PEC i koncentracije pet puta veće od vrijednosti PEC. Supstance koje će biti primjenjene na zemljište više puta u jednoj sezoni ispitivati u koncentracijama dobijenim množenjem vrijednosti PEC sa maksimalnim brojem predviĐenih primjena. Ipak, viša koncentracija nije veća od desetostruke vrijednosti najveće primjenjene koncentracije po pojedinačnoj primjeni.

Ako se ispituju hemikalije koje nisu agrohemikalije. Koristi se geometrijska serija od najmanje pet koncentracija ispitivane supstance. Koncentracije ispitivane supstance pokrivaju opseg potreban za određivanje ECx vrijednosti.

1.7. IzvoĐenje ispitivanja

1.7.1. Uslovi izloženosti

1.7.1.1. Ispitivanjalne i kontrolne grupe

Ukoliko se ispituju agrohemikalije, zemljišta se dijeli u tri uzorka jednake težine. Dva uzorka se miješaju sa nosačem koji sadrži ispitivanu supstancu, a treći sa nosačem bez ispitivane supstance (kontrola). Potrebna su minimalno tri ponavljanja za svaki uzorak, sa i bez ispitivane supstance.
Ako se ispituju hemikalije koje nisu agrohemikalije, zemljište se dijeli u šest uzoraka jednake težine. Pet uzoraka se miješa sa nosačem koji sadrži ispitivanu supstancu, a šesti sa nosačem bez ispitivane supstance. Preporučujeju se tri ponavljanja po svakom uzorku, sa i bez ispitivane supstance. Omogućiti homogenu raspoDijelu supstance u ispitivanim uzorcima zemljišta. Tokom miješanja izbjegavati presovanje ili gnječenje zemljišta.

1.7.1.2. Inkubacija uzoraka zemljišta

Razlikuju se dva načina inkubacija uzoraka zemljišta zavisno od toga da li su u pitanju jedinstveni uzorci svakog ispitivanog i svakog kontrolnog uzorka zemljišta ili serije pojedinačnih poduzoraka jednake veličine za ispitivane i za kontrolne uzorke zemljišta. U slučaju isparljivih supstanci ispitivanje, ipak, izvesti samo sa serijama pojedinačnih poduzoraka. Kada se zemljište inkubira kao jedan jedinstveni uzorak, pripremaju se velike količine zemljišta za ispitivane i kontrolne grupe i po potrebi uzimaju se poduzorci i analiziraju. Količina inicijalno pripremljenih uzoraka za eksperimenzemljištane i kontrolne grupe zavisi od veličine poduzoraka, broja ponavljanja i predviĐenog maksimalnog broja uzorkovanja. Zemljišta inkubirana kao jedinstveni uzorak dobro promiješati prije uzimanja

poduzoraka. Kada se uzorci inkubiraju u seriji pojedinačnih poduzoraka zemljišta, osnovni uzorak za ispitivane i kontrolne uzorke dijeli se na traženi broj poduzoraka i oni se koriste po potrebi. U ispitivanjima gdje se očekuje više od dva uzorkovanja, obezbijediti dovoljan broj poduzoraka koji je dovoljan za sva ponavljanja i svako uzorkovanje. Uraditi najmanje tri ponavljanja po koncentraciji ispitivane supstance i inkubirati u aerobnim uslovima (dio 1.7.1.1. ove metode). Tokom svih ispitivanja, koristiti adekvatne posude koje onemogućavaju razvijanje anaerobnih uslova. U slučaju isparljivih supstanci, ispitivanje se izvodi samo sa serijom pojedinačnih poduzoraka.

1.7.1.3. Uslovi i trajanje ispitivanja

Ispitivanje se vrši u mraku na temperaturi 20°C ± 2 °C. Sadržaj vlage u uzorcima zemljišta održavati između 40% i 60% maksimalnog kapaciteta zadržavanja vode u zemljištu (dio 1.6.4.2. ove metode) sa odstepenima od ± 5%. Po potrebi, dodaje se destilovana, dejonizovana voda.

Minimalno trajanje ispitivanja je 28 dana. Ako se ispituju agrohemikalije, porede se količine nastalog ugljen-dioksida i utrošenog kiseonika u ispitivanim grupama u odnosu na kontrolu. Ako se
28. dana ove vrijednosti razlikuju za više od 25% ispitivanje se nastavlja dok se ne postigne razlika
≤ 25% ili maksimalno do 100 dana, zavisno koji uslov se prije ispuni. Ako se ispituju hemikalije koje nisu agrohemikalije, ispitivanje se prekida nakon 28 dana. Tada se određuju količine nastalog ugljen-dioksida i utrošenog kiseonika u ispitivanim i kontrolisanim uzorcima zemljišta i iizračunava EC_x vrijednost.

1.7.2. Uzorkovanje i analiza zemljišta

1.7.2.1. Shema uzorkovanja zemljišta

Ukoliko se ispituju agrohemikalije, određuje se brzina glukozom indukovane respiracije u uzorcima zemljišta na početku ispitivanja, 7, 14. i 28. dana. Ako se produžava ispitivanje, obaviti dodatna mjerenja svakih 14 dana nakon 28. dana.

Ako se ispituju supstance koje nisu agrohemikalije, ispituje se najmanje pet koncentracija ispitivane supstance i određuje se brzina glukozom indukovane brzine respiracije u uzorcima zemljišta na početku (dan 0) i na kraju perioda izlaganja (28. dan). Ukoliko se pokaže potrebnim dodatno mjerenje se obavlja sredinom tog perioda, npr. sedmog dana. Podaci dobijeni 28. dana koriste se u odreĐivanju EC_x vrijednosti za datu hemikaliju. Podaci dobijeni iz kontrolnih uzoraka na početku ispitivanja koriste se u odreĐivanju inicijalnih količina metabolički aktivne mikrobiološke biomase u zemljištu[12].

1.7.2.2. Mjerenje glukozom indukovane brzine respiracije

Glukozom indukovana brzina respiracije u svakom ponavljanju za uzorke zemljišta ispitivane i kontrolne grupe određuje se pri svakom vremenu uzorkovanja. Uzorci zemljišta se miješaju sa dovoljnom količinom glukoze da se izazove maksimalni respiratorni odgovor. Količina glukoze potrebna za izazivanje maksimalnog respiratornog odgovora za dato zemljište određuje se u preliminarnom ispitivanju ispitujući seriju koncentracija glukoze. Za pjeskovita zemljišta sa sadržajem organskog ugljenika 0,5% do 1,5%, obično je dovoljno 2.000 mg do 4.000 mg glukoze po kilogramu suve težine zemljišta. Glukoza se može samljeti u prah sa

čistim kvarcnim pijeskom (10 g pijeska/kg suve težine zemljišta) i homogenizovati sa zemljištem.

Uzorci zemljišta obogaćeni glukozom inkubiraju se u odgovarajućoj posudi za mjerenje brzine respiracije u kontinuitetu, ili na svaki sat, ili na svaka dva sata (dio 1.6.1. ove metode), na temperaturi 20 °C ± 2 °C. Količina oslobođenog ugljen-dioksida i utrošenog kiseonika mjeri se narednih 12 sati, a mjerenje početi što je prije moguće, poželjno 1 do 2 sata nakon dodavanja glukoze. Ukupna količine oslobođenog ugljen-dioksida ili utrošenog kiseonika u toku 12 sati mjeri se i određuje srednja brzina respiracije.

2. Podaci

2.1. Obrada rezultata

Ukoliko se ispituju agrohemikalije, zabilježiti količinu nastalog ugljen-dioksida ili utrošenog kiseonika za sve uzorke ispitivane grupe, a srednje vrijednosti za sva ponavljanja navesti u tabelarnoj formi. Rezultate procjeniti odgovarajućim i opšte prihvaćenim statističkim metodama (npr. F-test, nivo značaja 5%). Brzina glukozom indukovane respiracije se izražava u mg ugljendioksida/kg suve težine zemljišta/h ili mg kiseonika/suve težine/h. Srednja vrijednost brzine nastajanja ugljen-dioksida ili srednja vrijednost brzine potrošnje kiseonika u svakoj ispitivanoj grupi poredi se sa kontrolnom grupom i računa se procenat odstepena od vrijednosti u kontroli.

Ako se ispituju supstance koje nisu agrohemikalije, određuju se količine oslobođenog ugljendioksida ili utrošenog kiseonika za svaki uzorak ispitivane grupe i pravi se kriva dozne zavisnosti za procjenu EC_x vrijednosti. Brzina glukozom indukovane respiracije (npr. mg CO_2/kg suve težine zemljišta/h ili mg kiseonika/suve težine zemljišta/h) u ispitivanim uzorcima nakon 28 dana poredi se sa vrijednostima u kontroli. Iz tih podataka računa se procenat vrijednosti inhibicije za svaku koncentraciju ispitivane supstance. Ovi rezultati prikazuju se grafički u funkciji koncentracija ispitivane supstance, a za određivanje EC_x vrijednosti koriste se statističke procedure. Intervali povjerenja (p = 0,95) za izračunate EC_x vrijednosti i putem standardnih procedura.

2.2. Tumačenje rezultata

Kada se procjenjuju rezultati ispitivanja sa agrohemikalijama i kad je razlika u brzini respiracije između prve ispitivane grupe u seriji (maksimalna predviĐena koncentracija) i kontrole ≤ 25% u bilo kom vremenu uzorkovanja nakon 28. dana, za date hemikalije se ocjenjuje da nemaju dugoročni uticaj na transformaciju ugljenik u zemljištu. Kada se procjenjuju rezultati dobijeni ispitivanjem supstanci koje nisu agrohemikalije, koriste se EC_{50}, EC_{25}, odnosno EC_{10} vrijednosti.

3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži:

1) potpunu identifikaciju korišćenog zemljišta, uključujući:

- geografske odrednice mjesta (geografska širina i dužina);
- podatke o istoriji mjesta (npr. biljni pokrivač, tretmani sredstvima za zaštitu bilja, tretmani Đubrivima, kontaminacije usled nesrećnog slučaja itd);
- upotreba zemljišta (npr. poljoprivredno zemljište, šuma itd);
- dubina uzorkovanja (cm);

- sadržaj pijeska/mulja/gline (% suve težine); - pH vrijednost (u vodi);
- sadržaj organskog ugljenika (% suve težine);
- sadržaj azota (% suve težine);
- jonsko izmjenjivački kapacitet (mmol/kg);
- početna biomasa mikroorganizama u procentima u odnosu na ukupan organski ugljenik;
- literatura vezano za sve metode korišćene za određivanje svakog parametra;
- svi podaci u vezi sa sakupljanjem i skladištenjem uzoraka zemljišta;
- detalji o predinkubaciji, ako postoje; 2) podatke o ispitivanoj supstanci:
- fizičke osobine i gde je bitno, fizička i hemijska svojstva;
- podaci za identifikaciju hemikalije, uključujući strukturnu formulu i stepen čistoće (npr. za sredstva za zaštitu bilja, procenat aktivnog sastojka), sadržaj azota. 3) podatke o uslovima ispitivanja:
- opis obogaćivanja zemljišta organskim supstratom;
- broj koncentracija ispitivane supstance i gdje je prikladno, objašnjenje za izbor datih koncentracija;
- opis načina uvođenja ispitivane supstance u zemljište; - temperatura inkubacije;
- sadržaj vlage u zemljištu na početku i u toku ispitivanja;
- korišćena metoda inkubacije zemljišta (jedinstven uzorak ili serija pojedinačnih poduzoraka); - broj ponavljanja; - broj uzorkovanja; 4) rezultati:
- metoda i oprema za mjerenje brzine respiracije;
- tabelarni podaci uključujući pojedinačne i srednje vrijednosti za količinu ugljen-dioksida ili kiseonika;
- varijansa u kontrolisanim i eksperimentalnim grupama;
- objašnjenje korekcija u iizračunavanju, ukoliko je bitno;
- procenat razlike glukozom indukovane brzine respiracije pri svakom vremenu uzorkovanja, ili, ukoliko je prikladno EC_{50} sa 95% intervalima provjeravanja, druge EC_x vrijednosti (npr. EC_{25} ili

EC_{10}) sa intervalima povjerenja i grafički prikaz krive dozne zavisnosti;
- statistička obrada rezultata, gde je prikladno;
- sve dodatne podatke i opažanja potrebne za za tumačenje rezultata.

C.23. AEROBNA I ANAEROBNA TRANSFORMACIJA U ZEMLJIŠTU

DIO I

1. Metoda ispitivanja

Metoda aerobne i anaerobne transformacije u zemljištu se zasniva na OECD TG 307 (2002) uputstvu ispitivanja. **1.1. Uvod** Metoda aerobne i anaerobne transformacije u zemljištu bazira se na postojećim smjernicama. Opisana metoda je za procjenu aerobne i anaerobne transformacije hemikalija u zemljištu. Ispitivanja se obavljaju da bi se utvrdila: 1. brzina transformacije ispitivane supstance i 2. priroda i brzina ssupstancaanja i razlaganja proizvoda transformacije kojima bi biljke i zemljišni organizmi mogli biti izloženi. Ovakva ispitivanja su potrebna za hemikalije koje se primjenjuju direktno na zemljište ili koje dospijevaju u zemljište. Rezultati takvih laboratorijaskih ispitivanja koriste se i pri razvijanju protokola uzimanja uzoraka i analize za srodna istraživanja u ovom području.

Aerobne i anaerobne studije sa jednim tipom zemljišta obično su dovoljne za procjenu puteva transformacije. Brzina transformacije se određuje u najmanje tri dodatna tipa zemljišta.

Tipovi ispitivanih zemljišta predstavljaju uslove u životnoj sredini gdje će se hemikalije upotrebljavati ili ispustiti. Na primjer, hemikalije koje se ispuštaju u suptropskim i tropskim klimatima ispituju se na ferasolu i nitosolu (FAO sistem). Date su i preporuke u vezi sakupljanja, rukovanja i skladištenja uzoraka zemljišta, prema ISO standardu. Upotreba pirinčanih polja se podjednako uzima u obzir u ovoj metodi.

1.2. Definicije

Ispitivana supstanca je bilo koja supstanca, izvorna supstanca ili proizvodi transformacije.

Proizvodi transformacija su sve supstance koje su rezultat biotičkih i abiotičkih reakcija transformacija ispitivane supstance, uključujući CO_2 i vezane rezidue.

Vezane rezidue su jedinjenja u zemljištu, biljkama ili životinjama koje se zadržavaju u matriksu u obliku izvorne supstance ili njenih metabolita/proizvoda transformacije poslije ekstrakcije. Metoda ekstrakcije ne mijenja supstance ili strukturu matriksa. Priroda veze se dijelimično objašnjava metodama ekstrakcije koje mijenjaju matriks i sofisticiranim analitičkim tehnikama. Na ovaj način su do danas identifiovani kovalentna jonska i sorptivna veza i molekulske zamke. Vezivanje rezidua znatno smanjuje biodostupnost i biorapoloživost (izmjenjen IUPAC 1984 Izvještaj[13]).

Aerobna transformacije su reakcije koje se odvijaju u prisustvu molekulskog kiseonika .

Anaerobna transformacije su reakcije koje se odvijaju bez prisustva molekulskog kiseonika.

Zemljište jes mješavina mineralnih i organskih hemijskih sastojaka koje čine jedinjenja sa visokim procentom ugljenika i azota, kao i jedinjenja velikih molekulskih masa, u kojima uglavnom žive mikroorganizmi. Zemljište može biti u jednom od dva stanja:

- neporemećeno, kako se vremenom razvilo, u karakterističnim horizontima i raznim tipovima zemljišta;
- poremećeno, kakvo se obično nalazi na oranicama, ili kakvo se javlja u uzorcima koji se iskopaju i koriste u ovoj metodi ispitivanja[14].

Mineralizacija je potpuno razlaganje organske materije na CO_2 i H_2O u aerobnim uslovima i do
CH_4, CO_2 i H_2O u anaerobnim uslovima. U ovoj metodi kad se koristi jedinjenje obilježeno rastvorenog C^{14}, mineralizacija je ekstenzivno razlaganje u toku kojeg označeni ugljenikov atom oksiduje uz otpuštanje određene količine $C^{14}O_2$[14].

Poluživot ($t_{0,5}$) je vrijeme potrebno za transformaciju 50% ispitivane supstance, u slučajevima kada se transformacija može opisati kinetikom prvog reda i ne zavisi od početne koncentracije.

Vrijeme nestajanja 50 (u daljem tekstu: DT_{50}) je vrijeme u toku koga se početna koncentracija ispitivane supstance smanji za 50%, razlikuje se od poluživota $t_{0,5}$ kada transformacija ne slijedi kinetiku prvog reda.

Vrijeme nestajanja 75 (u daljem tekstu DT_{75}) je vrijeme u toku koga se početna koncentracija ispitivane supstance smanji za 75%.

Vrijeme nestajanja 90 (u daljem tekstu: DT_{90}) je vrijeme u toku koga se početna koncentracija ispitivane supstance smanji za 90%.

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance se koriste za identifikaciju i kvantifikaciju proizvoda transformacije spektroskopskim i hromatografskim metodama.

1.4. Primjenljivost metode

Metoda je primjenjiva na supstance (neobilježene ili obilježene) za koje je dostupna dovoljno precizna i osjetljiva analitička metoda. Primjenljiva je na slabo isparljiva jedinjenja, neisparljiva jedinjenja, jedinjenja rastvorljiva u vodi ili jedinjenja nerastvorljiva u vodi. Metoda ispitivanja se ne primjenjuje na jedinjenja koja su jako isparljiva iz zemljišta (npr. fumiganti, organski rassupstancaači) i zato se ne mogu držati u zemljištu u ispitivanim uslovima ove metode.

1.5. Podaci o ispitivanoj supstanci

Neobilježene ili obilježene supstance koriste se za mjerenje brzine transformacije. Za proučavanje puteva transformacije i određivanja masenog balansa koristi se obilježeni materijal. Obolježavanje rastvorenog C^{14} se preporučuje, ali upotreba drugih izotopa kao što su C_{13}, N_{15}, H_3, P_{32} takođe može biti od koristi. Molekul označiti u što je moguće stabilnijem dijlu. Čistoća ispitivane supstance je najmanje 95%.

Prije ispitivanja aerobne i anaerobne transformacije u zemljištu, o ispitivanoj supstanci potrebni su podaci o:

- rastvorljivosti u vodi (Metoda A.6. koja je data u ovom pravilniku);
- rastvorljivosti u organskim rassupstancaačima;
- naponu pare (Metoda A.4. koja je data u ovom pravilniku) i Henrijeva konstanta;
- koeficijentu raspodjele u sistemu n-oktanol/voda (Metoda A.8. koja je data u ovom pravilniku);
- hemijskoj stabilnosti u mraku (hidroliza) (Metoda C.7. koja je data u ovom prilogu);
- pK_a, ako je molekul sklon protonaciji i deprotonaciji (OECD smjernice 112).

Ostali korisni podaci uključuju podatke o toksičnosti ispitivane supstance za zemljišne mikroorganizme (Metode C.21. i C.22. koje su date u ovom prilogu)[16].

Analitičke metode (uključujući metode ekstrakcije i čišćenja) za identifikaciju i kvantifikaciju ispitivane supstance i njenih proizvoda transformacije takođe su dostupne.

1.6. Princip metode

Uzorci zemljišta tretiraju se ispitivanom supstancom i inkubiraju u mraku u bocama tipa biometra ili u protočnim sistemima u kontrolisanim laboratorijaskim uslovima (pri konstantnoj temperaturi i vlažnosti zemljišta). Nakon predviđenih vremenskih intervala, uzorci zemljišta se ekstrahuju i analiziraju na izvorne supstance i proizvode transformacije. Isparljivi proizvodi se takođe skupljaju za analizu koristeći potrebne uređaje za adsorpciju. Koristeći

materijal obilježen sa C^{14}, mjere se razne brzine mineralizacije ispitivane supstance, hvatanjem $C^{14}O_2$ koji se razvio masenim balansom, uključujući stvaranje veznih rezidua zemljišta.

1.7. Kriterijumi kvaliteta

1.7.1. Efikasnost analitičke tehnike

Ekstrakcija i analiza najmanje dva uzorka zemljišta neposredno nakon dodavanja ispitivane supstance daje prvu naznaku o ponovljivosti analitičke metode i ujednačenosti postupka primjene za ispitivanu supstancu. Efikasnost analitičke tehnike u kasnijim fazama ispitivanja određuje se iz masenih balansa. Efikasnost analitičke tehnike je u opsegu od 90% do 110% za obilježene hemikalije[8] i od 70% do 110% za neobilježene hemikalije.

1.7.2. Ponovljivost i osjetljivost analitičke metode

Ponovljivost analitičke metode (isključujući početnu efikasnost ekstrakcije) u kvantifikovanju ispitivane supstance i proizvoda transformacije provjerava se analizama istog ekstrakta zemljišta u duplikatu, inkubiranog dovoljno dugo da bi se stvorili proizvodi transformacije.

Granica detekcije (Limit of Detection, u daljem tekstu: LOD) analitičke metode za ispitivanu supstancu i za proizvode transformacije je najmanje 0,01 mg/kg zemljišta (kao ispitivana supstanca) ili 1% primjenjene doze, koja doza je niža. Granica kvantifikacije (Limit of Quantification, u daljem tekstu: LOQ) takođe je određena.

1.7.3. Preciznost podataka o transformaciji

Regresiona analiza koncentracija ispitivane supstance u funkciji vremena daje adekvatne podatke o pouzdanosti transformacione krive i omogućava iizračunavanje intervala povjerenja za poluživot (ako je primjenljiva kinetika pseudo prvog reda), ili DT_{50} vrijednosti i ako su primjenljive, DT_{75} i DT_{90} vrijednosti.

1.8. Opis metode

1.8.1. Oprema i hemijski reagensi

Inkubacioni sistemi se sastoje od statičkih zatvorenih sistema ili adekvatnih protočnih sistema. Primjeri odgovarajućih aparata za protočnu inkubaciju i boca tipa biometara dati su na slikama 1 i 2. Oba tipa inkubacionih sistema imaju prednosti i ograničenja .

Potrebna je standardna laboratorijaska oprema, a posebno:

- analitički instrumenti kao što su GLC, HPLC, TLC, uključujući odgovarajuće sisteme za detekciju i za analizu radioizrastvorima obilježenih, ili neobilježenih supstanci, ili oprema za metodu inverznog razređenja izotopa;
- instrumenti za identifikaciju (MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, itd.);
- tečni scintilacioni brojač;
- oksidator za spaljivanje radioaktivnog materijala; - centrifuga;

- aparatura za ekstrakciju (na primjer, kivete za centrifugu kod hladne ekstrakcije i Soxhlet aparatura za kontinuiranu ekstrakciju pod refluksom);

- instrumenti za koncentrovanje rastvora i ekstrakta (npr. rotirajući isparivač); - vodeno kupatilo;
- mehanička miješalica (npr. mašina za miješanje, rotirajući mikser). Hemijski reagensi koji se koriste uključuju:
- NaOH, analitičke čistoće, 2 mol/dm^3, ili druge adekvatne baze (npr. KOH, etanolamin);
- H_2SO_4, analitičke čistoće, 0,05 mol/dm^3;
- etilenglikol, analitičke čistoće;
- čvrsti materijali za apsorpciju kao što su krečnjak i poliuretanski čepovi; - organski rassupstancaači, analitičke čistoće, kao što su aceton, metanol itd.;
- scintilacione tečnosti.

1.8.2. Nanošenje ispitivane supstance

Za dodavanje i raspoDijelu u zemljištu, ispitivana supstanca se rassupstancaa u vodi (dejonizovanoj ili destilovanoj), ili u minimalnim količinama acetona ili drugog organskog rassupstancaača u kome je ispitivana supstanca dovoljno rastvorljiva i stabilna. Količina izabranog rassupstancaača ne utiče na mikrobiološku aktivnost zemljišta (odjeljci 1.5. i 1.9.2. do 1.9.3. ove metode). Upotrebu rassupstancaača koji sprečavaju mikrobiološku aktivnost zemljišta, kao što su hloroform, dihlormetan i ostali halogeni rassupstancaači se izbjegavaju.

Ispitivana supstanca se dodaje i kao čvrsta supstanca, npr. miješana sa kvarcnim peskom ili u malim poduzorcima ispitivanog zemljišta koji su osušeni na vazduhu i sterilisani. Ako se ispitivana supstanca dodaje sa rassupstancaačem, rassupstancaač upariti prije nego što se poduzorak doda originalnom nesterilnom uzorku zemljišta.

U slučaju hemikalija, čiji je glavni put unosa u zemljište kanalizacioni mulj, ili njihova upotreba u poljoprivredi, ispitivanu supstancu prvo dodati u mulj, koji se potom uvodi u uzorak zemljišta (i odeljak 1.9.2. i 1.9.3. ove metode).

Prilikom upotrebe ne koriste se rutinski formulisani proizvodi. Za slabo rastvorljive supstance, upotreba formulisanog materijala može biti primjerena alternativa.

1.8.3. Zemljišta

1.8.3.1. Izbor zemljišta

Za određivanje puta transformacije koristi se reprezentativno zemljište: pjeskovita ilovača, muljevita ilovača, ilovača ili pijesak sa ilovačom (po FAO i USDA klasifikaciji) sa pH od 5,5 do 8,0. Koristi se i udio organskog ugljenika od 0,5% do 2,5% i mikrobiološke biomase od najmanje 1% od ukupnog organskog ugljenika[10].

Za ispitivanje brzine transformacije koriste se najmanje tri dodatna tipa zemljišta koji predstavljaju opseg relevantnih tipova. Zemljišta variraju u uDijelu organskog ugljenika, pH vrijednosti, uDijelu gline i mikrobiološke biomase.

Sve vrste zemljišta okarakterisati barem po teksturi (% pijeska, % mulja, % gline, po FAO i USDA klasifikaciji), pH vrijednosti, katjonskom izmjenjivačkom kapacitetu, sadržaju organskog ugljenika, gustini, kapacitetu zadržavanja vode i mikrobiološke biomase (samo za aerobna ispitivanja). Dodatni podaci o karakteristikama zemljišta mogu biti korisni kod

tumačenja rezultata. Mikrobiološku biomasu odrediti koristeći metodu supstrat-indukovanog disanja (SIR) ili alternativnim metodama[20].

1.8.3.2. Sakupljanje, rukovanje i skladištenje zemljišta

Potrebni su detaljni podaci o istorijatu lokacije na terenu odakle se skupljaju uzorci ispitivanog zemljišta. Detalji uključuju tačnu lokaciju, biljni pokrivač, tretiranje hemikalijama, tretman sa organskim i mineralnim Đubrivima, dodatak bioloških materijala ili druge kontaminacije. Zemljišta tretirana sa ispitivanom supstancom ili njenim strukturnim analozima, u prethodne četiri godine ne koriste se u ispitivanju transformacije[10, 15].

Zemljište za ispitivanje je svježe skupljeno sa polja (od horizonta A ili 20 cm površinskog sloja) sa sadržajem vode koje olakšava prosejavanje. Za sva zemljišta osim onih sa pirinčanih polja, uzorke ne bi trebalo uzimati u toku ili odmah nakon dugih perioda (> 30 dana) suše, smrzavanja ili plavljenja[14]. Uzorci se transportuju na način koji minimalizuje promjene u sadržaju vode u zemljištu i treba da se drže u mraku, u prisustvu vazduha, koliko god je moguće. Labavo vezana polietilenska vreća je obično dobra za ovu svrhu.

Zemljište obraditi što je ranije moguće nakon uzimanja uzoraka. Vegetaciju, veću faunu zemljišta i kamenje ukloniti prije prosijavanja zemljišta kroz sito prečnika 2 mm koje uklanja manje kamenje, faunu i ostatke bilja. Treba izbjegavati jače sušenje i drobljenje zemljišta pre prosijavanja[15].

Kad je uzimanje uzoraka otežano, zimi u polju (zemljište je zamrznuto ili prekriveno slojevima snijega), uzorak se uzima sa gomile zemljišta uskladištenog u stakleniku pod biljnim pokrivačem (npr. trava ili miješano trava-djetelina). Za ispitivanja se upotrebljavaju uzorci zemljišta koji su neposredno sakupljeni sa polja, ali ako se obrađeno i procesirano zemljište skladišti prije početka ispitivanja, uslovi skladištenja su adekvatni i samo na ograničeno vrijeme (temperatura od 4 °C ± 2 °C, na maksimalno 3 mjeseca) da bi se održala mikrobiološka aktivnost[XCIII]. Detaljnija uputstva o sakupljanju, rukovanju i skladištenju zemljišta koja se koriste u metodi ispitivanja transformacije. Prije ispitivanja zemljište je predinkubirano da bi se dopustilo klijanje i uklanjanje sjemena kako bi se ponovno uspostavila ravnoteža mikrobiološkog metabolizma, prateći promjene od uzorkovanja, ili uslova skladištenja do uslova inkubacije. Predinkubacioni period između 2 i 28 dana u toku koga se aproksimiraju uslovi temperature i vlage konkretne metode ispitivanja je opšte prihvaćen. Vrijeme skladištenja i predinkubacije zajedno ne traje duže od tri mjeseca.

1.9. Tok ispitivanja

1.9.1. Uslovi u toku ispitivanja

1.9.1.1. Temperatura

Tokom čitavog ispitivanja, uzorke zemljišta inkubirati u mraku na konstantnoj temperaturi reprezentativnoj za uslove klime gdje će se ispitivana supstanca upotrebljavati ili ispuštati. Temperatura od 20 °C ± 2 °C preporučuje se za sve ispitivane supstance koje mogu dopreti do zemljišta u umjerenoj klimi. Temperatura se prati. Za hemikalije koje se primjenjuju ili ispuštaju u hladnijoj klimi (recimo u sjevernim zemljama, u toku jeseni/zime) treba inkubirati dodatne uzorke zemljišta, ali na nižoj temperaturi (10 °C ± 2 °C).

1.9.1.2. Sadržaj vlage

Za ispitivanje transformacije u aerobnim uslovima, sadržaj vlage u zemljištu prilagoditi i održati na pF između 2,0 i 2,5. Sadržaj vlage u zemljištu se izražava kao masa vode po masi suvog zemljišta i redovno se kontroliše (npr. u intervalima od 2 nedjelje) mjerenjem boca za inkubaciju, a gubitak vode nadoknaditi njenim dodavanjem (najbolje sterilnom, filtriranom vodovodnom vodom). Paziti da se pri dodavanju vode spriječe ili minimalizuju gubici ispitivane supstance, odnosno proizvoda transformacije isparavanjem i/ili fotodegradacijom (ako se desi). Za ispitivanje transformacije u anaerobnim uslovima i uslovima pirinčanih polja, zemljište je saturisano vodom, plavljenjem.

1.9.1.3. Aerobni uslovi inkubacije

U protočnim sistemima, aerobni uslovi se održavaju isprekidanim ispiranjem ili kontinuiranim provjetravanjem vlažnim vazduhom. U bocama tipa biometra, razmjena vazduha se postiže difuzijom.

1.9.1.4. Sterilni aerobni uslovi

Da bi se dobili podaci o značaju abiotičke transformacije ispitivane supstance, uzorci zemljišta se sterilišu (metode sterilizacije date su u literaturi[16, 29]), tretirani sterilnom ispitivanom supstancom
(npr. dodavanje rastvora kroz sterilni filtar) i provjetravaju ovlaženim, sterilnim vazduhom kako je opisano u dijelu 1.9.1.3. ove metode. Za zemljišta sa pirinčanih polja, voda i zemljište su sterilisani, a inkubacija se obavlja kako je opisano u dijelu 1.9.1.6. ove metode.

1.9.1.5. Anaerobni uslovi inkubacije

Da bi se uspostavili i održali anaerobni uslovi, zemljište koje je tretirano sa ispitivanom supstancom i inkubirano u aerobnim uslovima 30 dana ili u toku poluživota ili DT_{50} (u zavisnosti od toga koje je vrijeme kraće) stavlja se u vodu (1 cm do 3 cm sloja vode) i inkubacioni sistem se ispere inertnim gasom (npr. azotom ili argonom. Ispitivani sistem omogućava mjerenja poput pH vrijednosti, koncentracije kiseonika i redoks potencijala i sadržavati aparaturu za hvatanje isparljivih proizvoda. Sistem tipa biometra je zatvoren da se izbjegne ulazak vazduha difuzijom.

1.9.1.6. Uslovi inkubacije za zemljišta sa pirinčanih polja

Da bi se ispitala transformacija u zemljištima pirinčanih polja, zemljište se plavi slojem vode od oko 1 cm do 5 cm i ispitivana supstanca se dodaje u vodenu fazu. Dubina zemljišta je od najmanje 5 cm. Sistem se aeriše u aerobnim uslovima. Vrijednost pH, koncentraciju kiseonika i redoks potencijal vodenog sloja pratiti i navesti. Potreban je predinkubacioni period od najmanje dvije nedelje prije početka ispitivanja transformacije (dio 1.8.3.2. ove metode).

1.9.1.7. Dužina ispitivanja

Ispitivanja brzine i puteva nisu duža od 120 dana, jer bi se nakon toga, vremenom, očekivalo smanjenje mikrobiološke aktivnosti, u vještačkom laboratorijaskom sistemu, izolovanom od prirodnog nadopunjavanja. Ispitivanja se mogu produžiti na duže periode tamo gdje je potrebno okarakterisati smanjenje ispitivane supstance i stvaranje i razlaganje glavnih

proizvoda transformacije. (npr. 6 ili 12 mjeseci). Duže periode inkubacije obrazložiti u izvještaju o ispitivanju uz propratna mjerenja biomase u toku i na kraju ovih perioda.

1.9.2. Tok ispitivanja

Otprilike 50 g do 200 g zemljišta (suve mase) stavlja se u svaku inkubacionu bocu (Slika 1 i 2 u Dijlu III ove metode) i zemljište se tretira ispitivanom supstancom, korišćenjem neke od metoda opisanih u dijelu 1.8.2.ove metode. Ako se koriste organski rassupstancaači za nanošenje ispitivane supstance, oni se uklanjaju iz zemljišta isparavanjem. Zemljište se dobro promiješa spatulom, odnosno boca se protrese. Ako se ispitivanje izvodi u uslovima pirinčanih polja, zemljište dobro promiješati sa vodom nakon primjene ispitivane supstance. Manje uzorke (npr. od 1 g) tretiranog zemljišta analizirati na ispitivanu supstancu da bi se provjerila ravnodnosnost raspodjele.

Ispitivana doza je usaglašena sa najvišom primjenjenom dozom sredstva za zaštitu bilja preporučenom u uputstvu za upotrebu i ravnomerne primjene na odgovarajućim dubinama u polju (u gornjih 10 cm sloja zemljišta). Na primjer, za hemikalije koje se primjenjuju na lišće ili zemljište, ali bez inkorporacije, 2,5 cm je prikladna dubina za iizračunavanje koliko hemikalije dodati u svaku bocu je. Za hemikalije unete u zemljište, prikladna dubina je ona navedena u uputstvima za upotrebu. Uopšteno, za hemikalije brzina primjene se procjenjuje prema najznačajnijem putu ulaska. Na primjer, kad je glavni put ulaska preko kanalizacionog mulja, hemikaliju dozirati u mulj, u koncentraciji koja odražava očekivanu koncentraciju mulja, a količina dodatog mulja se odražava na uobičajeni mulj koji se dodaje poljoprivrednim zemljištima. Ako ova koncentracija nije dovoljno visoka da omogući identifikaciju glavnih proizvoda transformacije, mogla bi pomoći inkubacija odvojenih uzoraka zemljišta koji sadrže veći opseg, ali ne koristiti prevelike količine koje utiču na mikrobiološke funkcije zemljišta (odjeljci 1.5. i 1.8.2. ove metode).

Veći komad zemljišta (npr. 1kg do 2 kg) tretira se ispitivanom supstancom, pažljivo pomiješa u odgovarajućoj miješalici i podijeli se u manje porcije od 50 g do 200 g u boce za inkubaciju (korišćenjem razvodnika). Manje alikvote (npr. 1 g) tretiranog zemljišta analizirati na ispitivanu supstancu da bi se provjerila ravnodnosnost raspodjele. Takva procedura ima prednosti, jer dopušta ravnodnosniju raspoDijelu ispitivane supstance u zemljištu.

NeobraĐeni uzorci se takoĐe inkubiraju u istim uslovima (aerobnim) kao i uzorci tretirani ispitivanom supstancom. Ti uzorci se koriste za mjerenje biomase u toku i na kraju ispitivanja.

Kada se ispitivana supstanca primjenjuje na zemljište rastvorena u organskim rassupstancaačima, uzorci zemljišta tretirani istom količinom rassupstancaača inkubiraju se u istim uslovima (aerobnim), kao i uzorci tretirani ispitivanom supstancom. Ovi uzorci se koriste za mjerenje biomase u početku, u toku i na kraju ispitivanja, da bi se provjerili efekti rassupstancaača na mikrobiološku biomasu.

Iizračunavanje početne koncentracije na bazi površine dato je jednačinom:

$C_{zemljišta}$ *mg / kg*$_{zemljišta}$ 1 *m* 10*A kg*$_4$ *ml* / $_2$*ha*/ *ha* 10^6 *d mgkgzemljišta*/ *kg* / *m*3 gdje je: $C_{zemljišta}$ početna koncentracija u zemljištu (mg/kg); A doza za primjenu (mg/kg); l debljina zemljišnog sloja u polju [m]; d = gustina suve zemljišne mase (kg/m^3).

Aproksimativno, doza primjene od 1 kg/ha je približno 1 mg/kg zemljišne koncentracije u sloju od 10 cm (pretpostavljajući gustinu mase od 1 g/cm^3).

Boce koje sadrže tretirano zemljište se ili spajaju na protočne sisteme opisane na Slici 1, ili se zasupstancaaju apsorpcionom kolonom datom na Slici 2 (i Dio IV ove metode).

1.9.3. Uzimanje uzoraka i mjerenje

Duple boce za inkubaciju uklanjaju se u odgovarajućim vremenskim intervalima i uzorci zemljišta ekstrahuju odgovarajućim rassupstancaačima različite polarnosti i analiziraju na ispitivanu supstancu, odnosno proizvode transformacije. Dobro osmišljeno ispitivanje uključuje dovoljno boca tako da se dvije boce mogu odbaciti pri svakom uzimanju uzoraka. Rastvori za apsorpciju ili kruti materijali za apsorpciju uklanjaju se u različitim vremenskim intervalima (7-dnevni intervali u toku prvog mjeseca i 17-dnevni intervali nakon prvog mjeseca), u toku i na kraju inkubacije svakog uzorka zemljišta i analiziraju na isparljive produkte. Osim uzorka zemljišta uzetog neposredno nakon primjene (uzorak, nultog dana) treba uključiti najmanje 5 dodatnih tačaka uzorkovanja. Vremenske intervale izabrati tako da se obrazac opadanja ispitivane supstance i obrasci ssupstancaanja i razlaganja produkata transformacije uspostavljaju (npr. 0, 1, 3, 7. dan; 2, 3. nedjelja; 1, 2, 3. mjesec, itd).

Kada se koristi ispitivana supstanca označena rastvorenog C^{14}, radioaktivnost koja se ne može ekstrahovati kvantifikovaće se spaljivanjem, a maseni balans će se izračunati za svaki interval uzorkovanja.

U slučaju anaerobne inkubacije i inkubacije navodnjavanih uzoraka, faza zemljišta i vode zajedno se analiziraju na ispitivanu supstancu i proizvode transformacije, ili se odvajaju filtracijom, ili centrifugom prije ekstrakcije i analize.

1.9.4. Fakultativna ispitivanja

Aerobna, nesterilna ispitivanja na dodatnim temperaturama su korisna za procjenu uticaja temperature i vlage u zemljištu na brzinu transformacije ispitivane supstance, odnosno njenih proizvoda transformacije u zemljištu.

Dodatna karakterizacija radioaktivnosti koja se ne može ekstrahovati može se pokušati upotrebom, na primjer superkritične tečne ekstrakcije.

2. Podaci

2.1. Obrada rezultata

Količine ispitivane supstance, proizvoda transformacije, isparljivih supstanci (samo u procentima) i supstanci koje se ne mogu ekstrahovati izražavaju se u procentu primjenjene početne koncentracije i kao mg/kg zemljišta (na bazi suve mase zemljišta) za svaki interval uzorkovanja. Maseni balans se izražava kao procenat primjenjene početne koncentracije za svaki interval uzorkovanja. Grafički prikaz koncentracija supstance u funkciji vremena omogućiće procjenu poluživota ili DT_{50}. Glavni proizvodi transformacije identifikuju se i njihove koncentracije se takođe prikazuju u funkciji vremena, da bi se pokazala brzina njihovog nastanka i raspada. Glavni proizvod transformacije je bilo koji proizvod koji predstavlja ≥ 10% primjenjene doze, u bilo koje vrijeme u toku ispitivanja.

Isparljivi proizvodi koji se uhvate daju naznaku potencijala isparljivosti ispitivane supstance i njenih proizvoda transformacije iz zemljišta.

Preciznija određivanja poluživota ili DT_{50} vrijednosti i DT_{75} i DT_{90} vrijednosti postižu se primjenom odgovarajućih kalkulacija pomoću kinetičkih modela. Poluživot ili DT_{50} vrijednosti navode se u izvještaju zajedno sa opisom modela koji je korišćen, kao i redom kinetike i koeficijentom određivanja (r^2). Poželjnija je kinetika prvog reda, osim ako je $r^2 < 0,7$. Ako je prikladno, kalkulacije
se takođe primjenjuju na glavne proizvode transformacije. U slučaju ispitivanja brzina na različitim temperaturama, brzine transformacije opisane su Arenijusovom jednačinom, kao funkcija

$k = A \times e^{-B/T}$ ili $\ln k = \ln A - B/T$ gdje su: ln A i B temperature unutar opsega ispitivane temperature: k konstante regresije iz prekida i nagiba, najbolje aproksimiranog pravca generisanog linearnom regresijom ln k prema 1/T; k konstanta brzine na temperaturi T; T temperatura u kelvinima (K).

Arenijusova relacija će biti važeća za ograničeni opseg temperatura u slučaju da je transformacija dirigovana mikrobiološkom aktivnošću.

2.2. Procjena i tumačenje rezultata

Iako se ispitivanja izvode u vještačkim laboratorijaskim uslovima, rezultati omogućavaju procjenu brzine transformacije ispitivane supstance, kao i brzinu ssupstancaanja i raspada proizvoda transformacije u terenskim uslovima.

Studija puteva transformacije ispitivane supstance daje podatke o načinu na koji se primjenjena supstanca strukturno mijenja u zemljištu hemijskim i mikrobiološkim reakcijama.

3. Izvještaj

Izvještaj o ispitivanju sadrži podatke o:

1) ispitivanoj supstanci:
- ime, hemijski naziv, CAS broj, strukturna formula (naznačujući mjesto obilježavanja, kad se koristi materijal označen radioizrastvorima) i odgovarajuća fizička i hemijska svojstva (dio 1.5. ove metode); - čistoća (nečistoće) ispitivane supstance;
- radiohemijska čistoća obilježene hemikalije i specifična aktivnost (gdje je prikladno); 2) referentnim supstancama:
- hemijski naziv i struktura referentnih supstanci koje se koriste za karakterizaciju, odnosno identifikaciju proizvoda transformacije; 3) ispitivanom zemljištu:
- detalji o mjestu sakupljanja;
- datum i procedura uzimanja uzoraka zemljišta;
- svojstva zemljišta, kao što su pH vrijednost, sadržaj organskog ugljenika, tekstura (% pijeska, % mulja, % gline), katjonski izmjenjivački kapacitet, gustina mase, svojstva zadržavanja vode i mikrobiološka biomasa;
- dužina skladištenja zemljišta i uslovi skladištenja (ako je skladišteno); 4) uslovima u toku ispitivanja:
- datumi ispitivanja;

- količina primjenjene ispitivane supstance;
- upotrijebljeni rassupstancaači i metoda njihove primjene na ispitivanu supstancu;
- masa zemljišta tretiranog u početku i uzorkovanog u svakom intervalu za analizu;
- opis korišćenog sistema za inkubaciju;
- protoci vazduha (samo za protočne sisteme); - temperature u ispitivanom sistemu; - sadržaj vlage u zemljištu u toku inkubacije;
- mikrobiološka biomasa u početku, u toku i na kraju aerobnih studija;
- pH, koncentracija kiseonika i redoks potencijal u početku, u toku i na kraju anaerobnih i studija pirinčanih polja; - metode ekstrakcije;
- metode za kvantifikaciju i identifikaciju ispitivane supstance i glavnih proizvoda a transformacije u zemljištu i apsorpcionim materijalima; - broj replika i broj kontrola. 5) rezultatima:
- rezultat određivanja mikrobiološke aktivnosti;
- ponovljivost i osjetljivost korišćenih analitičkih metoda;
- efikasnost primjenjene analitičke tehnike (procenat vrijednosti za prihvatljivu studiju su date u dijelu 1.7.1. ove metode);
- tabela rezultata izražena u procentima primjenjene početne doze i gde je prikladno, u mg/kg zemljišta (na bazi suve mase);
- maseni balans u toku i na kraju studije;
- karakterizacija radioaktivnosti koja se ne može ekstrahovati (vezana) ili rezidua u zemljištu;
- kvantifikacija ispuštenog CO_2 i ostalih isparljivih materija;
- grafički prikaz koncentracija u zemljištu u funkciji vremena za ispitivanu supstancu i gdje je prikladno, za glavne proizvode transformacije;
- polu-život ili DT_{50}, DT_{75} i DT_{90} za ispitivanu supstancu i gdje je prikladno, za glavne proizvode transformacije uključujući intervale povjerenja; - procjena abiotičke degradacije u sterilnim uslovima;
- procjena kinetike transformacije za ispitivanu supstancu i gdje je prikladno, za glavne proizvode transformacije;
- predložen put transformacije, gdje je prikladno;
- tumačenje rezultata;
- neobraĐeni podaci (npr. primjeri hromatograma, uzorci kalkulacija brzina transformacije i načina za identifikaciju proizvoda transformacije).

DIO II

Napon vode, poljski kapacitet zemljišta (FC) i kapacitet zadržavanja vode (WHC)

Visina vodenog stuba (cm)	pF**XCIX**	bar[C]	Napomene
107	7	104	Suvo zemljište
1,6 x 104	4,2	16	Tačka uvenuća
104	4	10	
103	3	1	
6 x 102	2,8	0,6	
3,3 x 102	2,5	0,33[CI]	Opseg poljskog kapaciteta zemljišta[CII]

102	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (približno)
1	0	0,001	Tlo zasićeno vodom

Napon vode mjeri se u centimetrima vodenog stuba ili u barima. Zahvaljujući velikom opsegu sukcijske tenzije, izražava se kao pF vrijednost koja je ekvivalent logaritmu cm vodenog stuba.

Poljski kapacitet se definiše kao količina vode koja se može zadržati u zemljištu suprotno sili teže dva dana nakon dužeg kišnog perioda, ili nakon dovoljno navodnjavanja. Određuje se u neporemećenom zemljištu na terenu in situ. Mjerenja nisu primjenjiva na poremećene laboratorijaske uzorke zemljišta. FC-vrijednosti određene u poremećenim zemljištima mogu pokazati velike sistemske varijanse.

Kapacitet zadržavanja vode (water holding capacity, u daljem tekstu: WHC) određuje se u laboratorijai sa neporemećenim i poremećenim zemljištima zasićenjem zemljišnog stuba vodom, kapilarnim transportom. Posebno je korisno za poremećena zemljišta i može biti i do 30% veći od poljskog kapaciteta. Ispitivanjem je lakše odrediti WHC od pouzdane FC-vrijednosti.

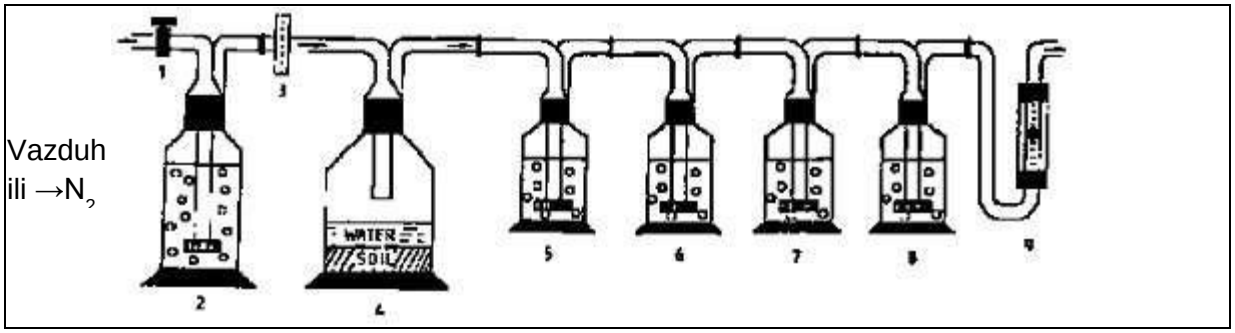
DIO III

Sadržaj vlage u zemljištu (g vode na 100 g suvog zemljišta) različitih tipova zemljišta iz različitih država

tip zemljišta	država	sadržaj vlage u zemljištu pri		
		WHC*	pF = 1,8	pF = 2,5
Pijesak	Nemačka	28,7	8,8	3,9
Pijesak sa ilovačom	Nemačka	50,4	17,9	12,1
Pijesak sa ilovačom	Švajcarska	44,0	35,3	9,2
Muljevita ilovača	Švajcarska	72,8	56,6	28,4
Glinena ilovača	Brazil	69,7	38,4	27,3
Glinena ilovača	Japan	74,4	57,8	31,4
Pješčana ilovača	Japan	82,4	59.2	36,0
Muljevita ilovača	SAD	47,2	33,2	18,8
Pješčana ilovača	SAD	40,4	25,2	13,3
* kapacitet zadržavanja vode (water holding capacity)				

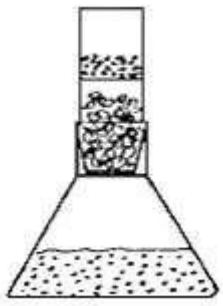
DIO IV

Slika 1: Primjer protočne aparature za ispitivanje transformacije hemikalija u zemljištu[CIII, CIV]



Gdje je: 1 - igličasti ventil; 2 - boca za ispiranje vazduhom koja sadrži vodu; 3 - ultramembrana (samo sterilni uslovi) veličina pora: 0,2 µm; 4 - boca za metabolizam zemljišta (uronjena u vodu samo za aerobne uslove i uslove pirinčanih polja); 5 - etilenglikol za hvatanje organskih isparljivih jedinjenja; 6 - sumporna kiselina za hvatanje alkalnih isparljivih jedinjenja; 7, 8 - natrijum hidroksid za hvatanje CO_2 i drugih kiselih isparljivih materija; 9 - mjerač protoka.

Slika 2: Primjer boca tipa biometra za ispitivanje transformacije hemikalija u zemljištu[cv]



Na - kreč za apsorbovanje CO_2

Staklena vuna tretirana uljem ili poliuretenskom pjenom za apsorbovanje organskih isparljivih jedinjenja

Zemljište + ispitivana supstanca

C.24. AEROBNE I ANAEROBNE TRANSFORMACIJE U SISTEMIMA VODA – SEDIMENT

DIO I

1. Metoda ispitivanja

Metoda aerobne i anaerobne transformacije u sistemima voda – sediment se zasniva na OECD TG 308 (2002) uputstvu ispitivanja.

1.1. Uvod

Hemikalije dospijevaju u plitke ili duboke površinske vode usled neposredne primjene, putem raspršivanja, spiranja, drenaže, odlaganja otpada, otpadnih voda iz industrije, domaćinstava ili poljoprivrede i atmosferskog taloženja. Ova metoda ispitivanja opisuje laboratorijaski postupak za procjenu aerobne i anaerobne konverzije organskih hemikalija u sistemima voda-sediment. Metoda se zasniva na uputstvima koja su navedena u literaturi[1, 2, 3, 4, 5, 6]. Broj i tip sedimenata koji se koriste u ovom ispitivanju utvrđen je u skladu sa OECD o izboru zemljišta/sedimenta[7]. Tom prilikom date su preporuke za sakupljanje, rukovanje i skladištenje uzoraka sedimenata zasnovane na ISO standardu. Ispitivanje je neophodno za

hemikalije koje se neposredno dodaju u vodu ili dospijevaju u vodu ostalim navedenim putevima.

Uslovi u prirodnim sistemima voda-sediment su često aerobni u gornjoj vodenoj fazi. Površinski sloj sedimenta je ili aeroban ili anaeroban, dok je dublji sediment najčešće anaeroban. Da bi se obuhvatile sve ove mogućnosti, pojedinačno su opisana i aerobna i anaerobna ispitivanja. Aerobno ispitivanje simulira aerobni vodeni stub iznad aerobnog sloja sedimenta koji je naglašen anaerobnim gradijentom. Anaerobno ispitivanje simulira potpuno anaerobni sistem voda-sediment. U slučaju značajnog odstepena od navedenih postavki, npr. kada se koriste intaktna sedimentna jezgra ili sedimenti koji su već bili izloženi ispitivanim supstancama, na rapolaganju su druge metode ispitivanja.

1.2. Definicije

Ispitivana supstanca je bilo koja supstanca, bilo da je u pitanju polazna supstanca ili odgovarajući proizvodi konverzije.

Proizvodi transformacije su sve supstance koje proističu iz biotičkih i abiotičkih reakcija transformacije ispitivane supstance uključujući i CO_2 i vezane ostatke.

Vezani ostaci su jedinjenja u zemljištu, biljkama ili životinjama koja opstaju u matriksu bilo u obliku polazne supstance, ili njenih metabolita nakon procesa ekstrakcije. Metoda ekstrakcije ne dovodi do značajne izmjene samih jedinjenja ili strukture matriksa. Priroda veze može se dijelom objasniti metodama ekstrakcije koje mijenjaju matriks i sofisticiranim analitičkim tehnikama. Do danas su, npr. na ovaj način otkrivene kovalente jonske i sorptivne veze, kao imolekulske klopke. U principu, obrazovanje vezanih ostataka značajno smanjuje biodostupnost i biorapoloživost (modifikovani IUPAC 198411[Izvještaj]).

Aerobna konverzija je oksidujuća reakcija koja se odvijaja u prisustvu molekularnog kiseonika[12].

Anaerobna konverzija je redukciona reakcija koja se odvijaja u odsustvu molekularnog kiseonika[12].

Prirodne vode su površinske vode iz jezera, rijeka ili potoka itd.

Sediment je miješavina neorganskih i organskih hemijskih sastojka, organski sastojci sadrže jedinjenja sa visokim sadržajem ugljenika i azota i visoke molekulske mase, taloži se putem prirodne vode i integriše se sa tom vodom.

Mineralizacija je potpuna razgradnja nekog organskog jedinjenja do CO_2, H_2O u aerobnim uslovima, ili do CH_4, CO_2 i H_2O u anaerobnim uslovima. U ovoj metodi ispitivanja, kada se koristi jedinjenje obilježeno radioizotopom, mineralizacija označava sveobuhvatnu razgradnju molekula u toku koje se obiljeeženi atom ugljenika oksiduje ili se redukuje srazmerno oslobođenoj količini $C^{14}O_2$ ili $C^{14}H_4$.

Vrijeme polu-raspada ($t_{0,5}$) je vrijeme potrebno za konverziju 50% ispitivane supstance, u slučaju kada se konverzija može objasniti kinetikom prvog reda, nezavisno od početne koncentracije.

Vrijeme polu-raspada 50 (u daljem tekstu: DT_{50}) je vrijeme tokom kojeg je početna koncentracija ispitivane supstance smanjena za 50%.

Vrijeme polu-raspada 75 (u daljem tekstu: DT_{75}) je vrijeme tokom kojeg je početna koncentracija ispitivane supstance smanjena za 75%.

Vrijeme polu-raspada 90 (u daljem tekstu: DT_{90}) je vrijeme tokom kojeg je početna koncentracija ispitivane supstance smanjena za 90%.

1.3. Referentne supstance

Referentne supstance se koriste za identifikaciju i kvantifikaciju proizvoda konverzije uz pomoć spektroskopskih i hromatografskih metoda.

1.4. Podaci o ispitivanim supstancama

Neobilježene ispitivane supstance kao i ispitivane supstance obilježene izrastvorima se koristie u mjerenju stope transformacije iako se za ovo preporučuje obilježeni materijal. Obilježeni materijal je potreban za proučavanje puteva transformacije i za utvrĐivanje masenog bilansa. C^{14} označavanje se preporučuje, ali i upotreba ostalih izotopa kao što su C^{13}, N^{15}, H^3, P^{32}, je korisno. Kada god je moguće, izotopska oznaka je ugraĐena u najstabilniji dio molekula[l]. Hemijska, odnosno radiohemijska čistoća ispitivane supstance je najmanje 95%. Prije početka ispitivanja sljedeće informacije o supstanci koja se ispituje su na rapolaganju:

- rastvorljivost u vodi (metoda A.6. u Prilogu 1 ovog pravilnika);
- rastvorljivost u organskim rassupstancaačima;
- pritisak pri isparavanju (metoda A.4. u Prilogu 1 ovog pravilnika) i Henrijeva konstanta;
- koeficijent raspodjele u sistemun-oktanol/voda (metoda A.8. u Prilogu 1 ovog pravilnika);
- koeficijent adsorpcije - K_d, K_f ili K_{oc}, kada je moguće (metoda C.18. ovog priloga);
- hidroliza (metoda C.7. ovog priloga);
- konstanta disocijacije - pK_a (smjernice OEBS 112);
- hemijska struktura ispitivane supstance i mjesto vezivanja izotopa, ukoliko je moguće.

Napomena: treba zabilježiti temperaturu na kojoj su raĐena mjerenja.

Korisno je imati i podatke o toksičnosti ispitivane supstance po mikroorganizme, podatke o brzoj, odnosno inherentnoj biorazgradljivosti, i podatke o aerobnoj i anaerobnoj konverziji u zemljištu. Treba da budu dostupne analitičke metode (uključujući i metode ekstrakcije i ispiranja) za identifikaciju i kvantifikaciju ispitivane supstance i proizvoda njene konverzije u vodi i sedimentu (dio 1.7.2 ove metode).

1.5. Princip metode ispitivanja

U ispitivanju se koristi aerobni i anaerobni sistem voda-sediment (Dio II ove metode) koji omogućava:
- mjerenje stope konverzije ispitivane supstance u sistemu voda-sediment;
- mjerenje stope konverzije ispitivane supstance u sedimentu;

- mjerenje stope mineralizacije ispitivane supstance, odnosno produkata konverzije (kada se koristi ispitivana supstanca obilježena radioizotopom C^{14});
- identifikaciju i kvantifikaciju proizvoda konverzije u vodi i sedimentu uključujući i maseni bilans (kada se koristi obilježena ispitivana supstanca);
- mjerenje distribucije ispitivane supstance i njenih proizvoda konverzije između dvije faze u periodu inkubacije u zamračenim uslovima na konstantnoj temperaturi (da bi se izbjeglo, npr.cvjetanje algi). DT_{50}, DT_{75} i DT_{90} vrijednosti se određuju u kratkom roku nakon ispitivanja i ne mogu biti izvedene mnogo poslije perioda ispitivanja (dio 1.2).

Potrebna su dva tipa sedimenta i odgovarajućih uzoraka vodenog stuba kako za aerobno tako i za anaerobno ispitivanje[7]. Postoje slučajevi kada bi trebalo koristiti više od dva tipa sedimenta, npr. za hemikalije koje se mogu naći u slatkovodnom, odnosno morskom očvrstenju.

1.6. Primjena metode

Metoda se u većini slučajeva primjenjuje za ispitivanje supstanci (obilježenih ili neobilježenih) za koje postoji dovoljno precizan i osjetljiv analitički postupak. Primjenjuje se na jedinjenja koja su minimalno isparljiva, neisparljiva, rastvorljiva i nerastvorna u vodi. Ova ispitivanja se ne primjenjuju na hemikalije koje su visoko isparljive iz vodenog rastvora (npr. fumiganti, organski rassupstancaači) i zbog toga se u ne mogu zadržati u vodi, odnosno sedimentu pod ispitivanim uslovima.

Do sada se ovaj metod primjenjivao da bi se izučile konverzije hemikalija u slatkoj vodi i sedimentima, ali se može primjeniti i na estuarske/morske ekosisteme. Nije preporučljivo da se simuliraju uslovi u tekućim vodama (npr. rijeke) ili otvorenom moru.

1.7. Kriterijum kvaliteta

1.7.1. Efikasnost primjenjene analitičke tehnike

Ekstrakcija i analiza, najmanje u duplikatu, svih uzoraka vode i sedimenta, odmah nakon dodavanja ispitivane supstance, daje prve indikacije o efikasnosti analitičke metode i identičnosti postupaka koji se primjenjuju na supstance. Efikasnost u kasnijim fazama ispitivanja su data u odgovarajućem balansu mase (onda kada se koristi obilježeni materijal). Efikasnost je u opsegu od 90% do 110% za obilježene hemikalije i od 70% do 110% za neobilježene hemikalije.

1.7.2. Ponovljivost i osjetljivost analitičke metode

Ponovljivost analitičke metode (isključujući inicijalnu efikasnost ekstrakcije) radi kvantifikacije ispitivane supstance i proizvoda transformacije se provjerava ponovljenom analizom (dva ponavljanja) istog ekstrakta vode ili uzorka sedimenta koji su bili inkubirani dovoljno dugo da bi se formirali proizvodi transformacije.

Granica detekcije (LOD) analitičke metode za ispitivane supstance i proizvode konverzije je najmanje 0,01 mg/kg u vodi ili sedimentu (kao ispitivana supstanca) ili 1% početne količine koja je primjenjena na ispitivani sistem. Kao granica detekcije primjenjuje se uvjek niža vrijednost. Navodi se i granica kvantifikacije (LOQ).

1.7.3. Preciznost podataka konverzije

Regresiona analiza koncentracije ispitivane supstance u funkciji vremena daje odgovarajuće informacije o preciznosti krive konverzije i omogućava iizračunavanje intervala povjerenja za vrijednosti polu-raspada (ako se može primjeniti pseudo kinetika prvog reda) ili vrijednosti DT_{50} i ako više odgovara, vrijednosti DT_{75} i DT_{90}.

1.8. Opis metode

1.8.1. Ispitivanjalni sistem i aparatura

Istraživanje se sprovodi u staklenim posudama (npr. flaše, kivete), osim ukoliko prethodne informacije (poput koeficijenta raspodjele u sistemu n-oktanol/voda, podaci o sorpciji, itd) pokažu da ispitivana supstanca prijanja uz staklo, u tom slučaju se koristi altrenativni materijal (kao što je teflon). Ako je poznato da ispitivana supstanca prijanja uz staklo moguće je prevazići ovaj problem korišćenjem jednog ili više navedenih postupaka:
- odrediti masu ispitivane supstance i proizvoda konverzije koji prijanjaju uz staklo;
- na kraju ispitivanja obezbijediti ispiranje sudova rassupstancaačem;
- korišćenje formulisanih proizvoda (dio 1.9.2. ove metode);
- uvećavanjem količine ko-rassupstancaača radi dodavanja ispitivane supstance u sistem; ukoliko se koristi ko-rassupstancaač onda je takav da ne rastvori ispitivanu supstancu.

Primjeri tipične ispitivane aparature odnosno gas-protočnog i biometarskog sistema, su dati u trećem i četvrtom dijelu. Dizajn apararature koja se koristi pri eksperimentu omogućava razmjenu vazduha ili azota i hvatanje isparljivih proizvoda. Dimenzije aparature su takve da ispunjavaju uslove koji se zahtijevaju u ispitivanju (dio 1.9.1). Ventilacija se obezbjeđuje bilo laganim miješanjem ili propuštanjem vazduha ili azota po vodenoj površini. U drugom slučaju preporučljivo je lagano miješanje vode odozgo radi bolje distribucije kiseonika ili azota u vodi. Vazduh koji ne sadrži CO_2 se ne koristi, jer bi to dovelo do povećanja pH vode. U svakom slučaju poremećaji sedimenta su nepoželjni i treba ih izbjegavati koliko god je to moguće. Blago isparljive hemikalije se ispituju u sistemu biometarskog tipa pri laganom miješanju vodene površine. Koriste se i zatvorene posude sa slobodnim prostorom na vrhu, bilo za atmosferski vazduh ili azot i unutrašnjim sistemom koji služi za zadržavanje isparljivih proizvoda konverzije. Kod ispitivanja aerobnih konverzija neophodna je redovna razmjena gasa na vrhu epruvete da bi se kompenzovala potrošnja kiseonika od strane biomase.

Za sakupljanje isparljivih proizvoda konverzije koristi se 1 mol/dm^3 rastvora natrijum-hidroksida ili kalijum-hidroksida za ugljen dioksidi etilen glukol, etanolamin ili 2% parafinske kiseline za organska jedinjenja. Isparljiva jedinjenja koja nastaju u anaerobnim uslovima, kao što je metan, mogu se sakupiti npr. pomoću molekulskih sita. Takva isparenja se na pr. sagorijevaju do CO_2 prilikom propuštanja gasa kroz kvarcnu cijev napunjenu sa CuO na temperaturi od 900C i hvatanjem nastalog CO_2 u absorber sa bazama[17].

Potrebni su laboratorijaski mjerni instrumenti za hemijsku analizu ispitivane supstance i proizvoda konverzije (npr. hromatografija tečnog gasa - GLC, tečna hromatografija visokih performansi - HPLC, hromatografija tankog sloja - TLC, spektroskopija mase - MS), hromatografija gasaspektroskopija mase - GC-MS, tečna hromatografija-spektroskopija mase - LC-MS, nuklearna magnetska rezonanca - NMR, itd), uključujući i sisteme za otkrivanje hemikalija koje su obilježene ili neobilježene radioizrastvorima, kada je to moguće. Kada se koristi materijal radio izotopski obilježen takođe je potreban i tečni scintilacioni brojač i oksidant sagorijevanja (za sagorijevanje uzoraka sedimenta pre radioaktivne analize).

Po potrebi, može biti neophodna i ostala standardna laboratorijaska oprema za fizičko hemijska i biološka određivanja (Tabela 1 u dijelu 1.8.2.2. ove metode), laboratorijasko staklo, hemikalije i reagensi.

1.8.2. Izbor i broj uzoraka vodenih sedimenata

Mjesto za uzimanje uzorka sedimenta se određuje za svaku posebnu situaciju u skladu sa svrhom ispitivanja. Prilikom izbora mjesta za uzimanje uzorka, uzima se u obzir prethodni uticaj poljoprivrede, industrije i domaćinstava na slivno područje, kao i na sektor neposredno uzvodno od lokaliteta. Sedimenti se ne koriste ukoliko su zagađeni ispitivanom supstancom ili njenim strukturnim analozima u prethodne četiri godine.

1.8.2.1. Izbor sedimenta

Dva tipa sedimenta se obično koriste pri aerobnim studijama. Dva izabrana uzorka sedimenta se moraju razlikovati po sadržaju organskog ugljenika i granulometrijskom sastavu. Jedan sediment treba da ima visok sadržaj organskog ugljenika (2,5-7,5%) i da ga dominantno čine fine frakcije, a drugi sediment treba da ima niži sadržaj organskog ugljenika (0,5-2,5%) i da dominiraju krupne frakcije. Razlika u sadržaju organskog ugljenika je najmanje 2%. Muljevito-glinoviti sediment sadrži > 50% fine frakcije, za razliku od glinovito-muljevitog sedimenta kod koga je taj sadržaj < 50%. Razlika između sadržaja mulja i gline dva sedimenta je najmanje 20%. U slučajevima kada hemikalija dospije u morske vode, najmanje jedan od sistema sediment - voda je morskog porjekla.

Za striktno anaerobna istraživanja, dva uzorka sedimenta (uključujući i pripadajuće vode) uzima se iz anaerobnih zona površinske vode. I uzorci vode i uzorci sedimenta se pažljivo transportuju bez prisustva kiseonika.

Ostali parametri koji mogu biti od važnosti prilikom izbora sedimenta posmatraće se od slučaja do slučaja. Npr. pH vrijednost sedimenta je važan parametar za ispitivanje hemikalija čija razgradljivost, odnosno sorpcija zavisi od pH vrijednosti. pH zavisnost se ogleda preko pK_a ispitivane supstance.

1.8.2.2. Karakterizacija uzoraka sistema voda - sediment
Ključni parametri koji se mjere i bilježe (uz navođenje upotrijebljene metode) kako u vodi tako i u sedimentu, kao i vrijemenska dinamika mjerenja, navedeni su u tabeli ispod.

Zavisno od slučaja može se ukazati potreba za mjerenjem i prikazivanjem vrijednosti i drugih parametara (npr. za svježu vodu - čestice, alkalitet, tvrdoća, provodljivost, NO_3/PO_4 odnos i pojedinačne vrijednosti; za sedimente - jonska izmjena, vodni kapacitet, karbonati, ukupni azot i fosfor; za morske sisteme - salinitet). Analiza sedimenata i vode na nitrate, sulfate, bio dostupno gvožđe i moguće druge elektron akceptore može biti od koristi u procjeni redukcionih procesa, naročito kod anaerobne transformacije.

Mjerenje parametara za karakterizaciju uzoraka sistema sediment-voda.

	Faza postupka					
	uzimanje uzoraka na terenu	naknadno rukovanje uzorkom	početak aklimatizacije	početak ispitivanja	u toku ispitivanja	kraj ispitivanja
Voda						
Porijeklo/ izvor	x					

Temperatura	x					
pH	x		x	x	x	x
TOC			x	x		x
Konc. O_2[CIX]	x		x	x	x	x
Oksido-redukcioni potencijal[XLVII]			x	x	x	x
Sediment						
Porijeklo/ izvor	x					
Dubina sloja	x					
pH		x	x	x	x	x
Granulo-metrijski sastav		x				
TOC		x	x	x		x
Biomasa mikroorganizama		x		x		x
Oksido-redukcioni potencijal[CX]	Opažanje (boja/ miris)		x	x	x	x

1.8.3. Sakupljanje, rukovanje i skladištenje

Za uzorkovanje sedimenta dna koristi se ISO standard. Uzorci se uzimaju iz gornjeg sloja sedimenta dubine 5 cm do 10 cm. Voda koja se koristi se uzima sa istog mjesta ili lokacije i u isto vrijeme kada i sediment. Za anaerobnu studiju, uzorci sedimenta i vode koji se koriste su uzeti bez kiseonika (dio 1.8.2.1. ove metode).

1.8.3.2. Rukovanje

Sediment se odvaja filtracijom kroz sito prečnika 2 mm pomoću viška vode koja se potom odbacuje. Poznata količina sedimenta i vode miješa se u potrebnom odnosu (dio 1.9.1. ove metode) u inkubacionim bocama i priprema za period inkubacije (dio 1.8.4. ove metode). Za anaerbonu studiju svi koraci u postupku se sprovode bez prisustva kiseonika.

1.8.3.3. Skladištenje

Preporučuje se korišćenje svježeg sedimenta i vode, ali ukoliko je potrebno skladištenje, sediment i voda se prosijavaju na gore opisan načini i skladište se zajedno, vodeni stub (6 cm do 10 cm vodenog sloja), u mračnoj prostoriji, najduže dvije nedjelje na temperaturi od (4 ± 2) °C. Uzorci koji se koriste u aerobnim studijama se skladište tako da imaju dotok vazduha (pr. otvoreni kontejneri), dok se oni koji se koriste za anaerobne studije skladište bez kiseonika. Zamrzavanje sedimenta i vode ili isušivanje sedimenta se ne smije dogoditi u toku transporta i skladištenja.

1.8.4. Priprema uzoraka sedimenta/vode za ispitivanje

Period aklimatizacije je prije dodavanja ispitivane supstance i svaki od uzoraka sediment/voda koji se koristi u glavnom ispitivanju stavlja se u inkubacioni sud. Aklimatizacija je pod istim uslovima kao i inkubacija (dio 1.9.1. ove metode). Pod periodom aklimatizacije se podrazumijeva vremenski period potreban za postizanje određene stabilnosti, na šta ukazuju pH vrijednost, koncentracija kiseonika u vodi, oksido-redukcioni potencijal sedimenta u vodi i makroskopska podjela faza. Period aklimatizacije uobičajeno

traje jednu do dvije nedelje, a ne duže od četiri nedelje. Rezultate ispitivanja koja su uraĐena u ovom periodu zabilježiti.

1.9. IzvoĐenje ispitivanja

1.9.1. Uslovi pod kojima se obavlja ispitivanje

Ispitivanje se izvodi u inkubacionoj aparaturi (dio 1.8.1. ove metode) u zapreminskom odnosu voda: sediment između 3:1 i 4:1 i sloja sedimenta dubine 2,5 cm (± 0,5 cm. Minimalna preporučena količina sedimenta je 50 g suve mase po inkubacionom sudu. Ispitivanje se izvodi u mračnoj prostoriji na ujednačenoj temperaturi od 10 °C do 30 °C. Odgovarajuća temperatura je (20 ± 2) °C. Ukoliko je moguće, zavisno od slučaja do slučaja, može se uzeti u obzir dodatna niža temperatura (npr. 10 °C), zavisno od informacije koja se dobija iz ispitivanja. Inkubaciona temperatura se kontroliše i bilježi.

1.9.2. Priprema i uvođenje ispitivane supstance

Koristi se jedna doza ispitivane hemikalije . U slučajevima u kojima su sredstva za zaštitu bilja direktno uneta u vodu, maksimalno dozvoljena količina navedena na etiketi datog sredstva je maksimalna koncentracija na površini suda u kome se obavlja eksperiment. Koristi se maksimalna doza koja je data na etiketi. U svim ostalim slučajevima, koncentracija koja se koristi se bazira na proračunima iz emisija u životnu sredinu. Obezbjeđuje se primjena odgovarajuće količine ispitivane supstance kako bi se izvršila karakterizacija puteva konverzije, kao i obrazovanje i razgradnja proizvoda konverzije. Upotrijebiti veće doze (npr. 10 puta) u situacijama kada su koncentracije ispitivane supstance blizu granice detekcije na početku studije, odnosno kada se glavni produkti konverzije ne mogu odmah uočiti kada su prisutni u uDijelu od najmanje 10% u odnosu na ispitivanu supstancu. Međutiim, ukoliko se koriste veće ispitivane koncentracije one ne bi trebalo da imaju značajnije štetno dejstvo na aktivnosti mikroorganizama sistema voda-sediment. Da bi se postigla stalna koncentracija ispitivane supstance u posudama različitih dimenzija, uzeti u obzir prilagoĐavanje količine materijala koji se koristi, na osnovu dubine vodenog stuba u posudi u odnosu na dubinu vode na terenu (pretpostavlja se da je 100 cm, ali i ostale dubine se mogu uzeti u obzir). Primjer kalkulacije dat je u Dijelu V ove metode.

U idealnim okolnostima ispitivana supstanca se primjenjuje kao vodeni rastvor u vodenoj fazi sistema za ispitivanje. Ukoliko se ne može izbjeći, dozvoljeno je korišćenje male količine rassupstancaača koji se miješaju sa vodom (kao što je aceton, etanol) radi upotrebe i distribucije ispitivane supstance, ali ona nije veća od 1% v/v i ne smije da ima štetno dejstvo na mikrobnu aktivnost sistema za ispitivanje. Obratiti pažnju na sakupljanje vodenog rastvora ispitivane supstance - korišćenje generatora kolone i prethodno miješanje se može koristiti da bi se obezbijedila totalna homogenost. Nakon dodavanja vodenog rastvora u ispitivanjalni sistem, preporučuje se lagano miješanje vodene faze, vodeći računa da se što manje narušava sediment.

Ne preporučuje se rutinsko korišćenje formulisanih produkata pošto sastojci formulacije mogu da utiču na raspored ispitivane supstance, odnosno proizvoda konverzije između vodene i sedimentne faza. Međutiim, korišćenje formulisanih materijala može biti odgovarajuća alternative za supstance koje se slabo rassupstancaaju u vodi.

Broj inkubacionih posuda zavisi od različite dužine vremena prilikom uzimanja uzoraka (dio 1.9.3. ove metode). Uključiti veliki broj ispitivanih sistema da bi se dva eksperimentalna

sistema mogla žrtvovati pri svakom uzorkovanju. Kada se koriste kontrolne jedinice svakog sistema vodasediment, ne držati ih zajedno sa ispitivanom supstancom.

Kontrolne jedinice se mogu koristiti za određivanje biomase mikroorganizama sedimenta i ukupnog organskog ugljenika vode i sedimenta prilikom završetka studije. Dvije kontrolne jedinice (odnosno jedna kontrolna jedinica za svaki sistem voda sediment) se koristi da bi se pratili traženi parametri u sedimentu i vodi u toku perioda aklimatizacije (tabela u dijelu 1.8.2.2. ove metode). Dvije dodatne kontrolne jedinice se uključuju u slučaju da se ispitivana supstanca primjenjuje putem rassupstancaača da bi se izmjerila štetna dejstva na aktivnosti mikroorganizama u ispitivanom sistemu.

1.9.3. Trajanje ispitivanja i uzimanje uzoraka

Eksperiment ne bi trebalo da traje duže od 100 dana, i nastavlja se sve dok se ne uspostave putevi konverzije i distribucije vode/sedimetna ili kada kada doĐe do raspada ispitivane supstance od 90% bilo razgradnjom, odnosno isparavanjem. Broj uzoraka u toku trajanja ispitivanja je najmanje šest (uključujući i nulto vrijeme), uz korišćenje opcione preliminarne studije (dio 1.9.4. ove metode) da bi se ustanovio pravilan režim uzimanja uzoraka i dužina trajanja ispitivanja, osim ukoliko ne postoje dovoljne informacije o ispitivanoj supstanci iz prethodnih studija. Za hidrofobne supstance, u toku inicijalnog perioda studije uzeti dodatne uzorke, da bi se odredila stopa distribucije između vode i sedimentnih faza.

Pri odgovarajućem vremenu uzorkovanja, cijeli inkubacioni sudovi (u kopiji) se sklanjaju radi analize. Sediment koji se nalazi u vodi analizira se posebno. Površinske vode se pažljivo uklanjaju uz minimalno uznemiravanje sedimenta. Ekstrakcija i karakterizacija ispitivane supstance i proizvoda konverzije prati odgovarajuće analitičke procedure. Treba voditi računa da se ukloni materijal koji se absorbovao u inkubacionom sudu ili u povezanim epruvetama koje se koriste za sakupljanje isparenja.

1.9.4. Opciona preliminarna studija

Ukoliko se režim uzimanja uzoraka i njegova dužina ne mogu odrediti iz ostalih relevantnih studija na ispitivanoj supstanci, može se uzeti u razmatranje opciono preliminarno ispitivanje, koja se izvodi u istim uslovima koji su predloženi za krajnju studiju. U slučaju da se preliminarno ispitivanje izvodi treba ukratko navesti merodavne uslove ispitivanja i dobijene rezultate.

1.9.5. Mjerenja i analize

Koncentracija ispitivane supstance i proizvoda konverzije pri svakom uzorkovanju u vodi i sedimentu mjeri se i zapisuje (ili kao koncentracija ili kao procenat od nanete supstance). U bilo kom vremenu uzimanja uzoraka identifikuju se proizvodi konverzije uočeni na ≥ 10% primjenjene radioaktivnosti u ukupnom sistemu voda-sediment, osim ukoliko ne postoje opravdani razlozi da se drugačije postupi. Prilikom identifikacije uzimaju se u obzir i proizvodi konverzije čije se koncentracije konstantno povećavaju tokom ispitivanja, čak i ako njihove koncentracije ne prelaze utvrĐene nivoe, jer ovo ukazuje na njihovu perzistenciju. Perzistentnost supstance se razmatra od slučaja do slučaja i obrazlaže u izvještaju.

Rezultati dobijeni iz sistema za hvatanje gasova/isparenja (CO_2 i ostali, odnosno isparljiva organska jedinjenja) treba da budu zabilježeni pri svakom uzorkovanju. Stope mineralizacije se bilježe. Neizdvojivi (vezani) ostaci u sedimentu se bilježe prilikom svakog uzimanja uzoraka.

2. Podaci

2.1. Postepene sa rezultatima

Ukupan maseni balans ili efikasnost (dio 1.7.1. ove metode) dodate radioaktivnosti se iizračunava pri svakom uzimanju uzoraka. Rezultati se bilježe kao procenat dodate radioaktivnosti. Distribucija radioaktivnosti između vode i sedimenta se bilježi ili kao koncentracija ili kao procenat, pri svakom uzimanju uzoraka.

DT_{50} i ukoliko je moguće, DT_{75} i DT_{90} ispitivane supstance se iizračunava zajedno sa odgovarajućim intervalima povjerenja (dio 1.7.3. ove metode). Podaci o stopi rasipanja ispitivane supstance u vodi i sedimentu se dobijaju korišćenjem odgovarajuće pseudo kinetike prvog reda, odnosno tehnike empirijskog određivanja krive koja primjenjuje grafička ili numjerička rješenja ili još kompleksnijih procjena u vidu pojedinačnih ili multi-dimenzionalnih modela. Svi ovi pristupi imaju svoje dobre i loše strane i značajno variraju u svojoj kompleksnosti. Pretpostavljena kinetika prvog reda se pojednostavljenje konverzije i procesa raspodjele, ali kada je god je to moguće daje vrijemensku odrednicu (stopu konstante ili polu-život), koja se jednostavno razume i od velikog je značaja u modelima simulacije i kalkulacijama procesa konverzije i raspodjele predviđenih koncentracija u životnoj sredini. Empirijski pristupi ili linearna transformacija dovode do boljeg prilagođavanja krive podacima i doprinose boljoj procjeni poluživota, DT_{50} i kad god je moguće, vrijednosti DT_{75} i DT_{90}. Korišćenje izvedenih konstanti je ograničeno. Modeli odvojenih posuda generišu znatan broj korisnih vrijednosnih konstanti u procjeni rizika koje opisuje stopu konverzije u različitim posudama i raspodjele hemikalije. Izbor metode u svakom slučaju mora biti opravdan, a eksperimetnator grafički ili statistički dokumentuje da je izbor metoda odgovarajući.

3. Izvještavanje

3.1. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj sadrži sljedeće podatke o:

1) ispitivanoj supstanci:

- uobičajeni naziv, hemijski naziv, CAS broj, strukturnu formulu (naznačiti poziciju izotop kada se koristi radioobilježeni materijal) i relevantne fizičko hemijske osobine;
- čistoća (nečistoća) ispitivane supstance;
- radiohemijska čistoća obilježene hemikalije i aktivnosti molekula (kada je to moguće); 2) referentnim supstancama:
- hemijski naziv i struktura referentne supstance koja se koristi za karakterizaciju, odnosno identifikaciju proizvoda konverzije;
- sediment i voda korišćeni u ispitivanju:
- lokacija i opis mjesta na kome su uzeti uzorci sedimenta, uključujući, ukoliko ih imamo, podatke o prethodnom zagađenju;
- sve informacije vezane za sakupljanje, skladištenje (ukoliko postoje) i aklimatizaciju sistema voda-sediment;
- svojstva sistema voda-sediment na način dat u tabeli u dijelu 1.8.2.2; 3) uslovima pod kojima se obavlja ispitivanje:
- ispitivanjalni sistem koji se koristi (npr. protočni sistem, biometar, način ventilacije, metod miješanja, zapremina vode, masa sedimenta, visina vode i sedimentnog sloja, dimenzije posuda u kojima se obavlja ispitivanje, itd.

- uvođenje ispitivane supstance u ispitivanjalni sistem: korišćena koncentracija, broj duplikata i kontrola, način primjene ispitivane supstance (npr. korišćenje rassupstancaača ukoliko ih ima), itd; - temperatura inkubacije;
- vrijeme uzimanja uzoraka;
- ekstrakcione metode i efikasnost kao i analitičke metode i granice detekcije;
- metode za karakterizaciju/identifikaciju proizvoda konverzije;
- odstepena od protokola metode ispitivanja ili uslova u kojim se odvija ispitivanje u toku studije; 4) rezultatima:
- neobrađeni podaci repreznetativnih analiza (svi neobrađeni podaci se arhiviraju u skladu sa principima dobre laboratorijaske prakse);
- ponovljivost i osjetljivost korišćenog analitičkog metoda;
- efikasnost analitičke tehnike (% vrijednosti validne studije su dati u dijelu 1.7.1);
- tabele sa rezultatima izražene u % primjenjene doze i u mg/kg vode, sedimenta i ukupnog sistema (samo u %) za ispitivanu supstancu i ukoliko je moguće za proizvode konverzije i neizdvojivu radioaktivnost;
- maseni balans u toku i na kraju ispitivanja;
- grafički prikaz transformacije posebno u vodi i sedimentu kao i u ukupnom sistemu (uključujući i mineralizaciju); - stope mineralizacije;
- poluživot, DT_{50} i ukoliko je moguće, DT_{75} i DT_{90} vrijednosti za ispitivanu supstancu, i gde postoji mogućnost za glavne proizvode konverzije, uključiti i intervale povjerenja u vodi sedimentu i ukupnom sistemu;
- procjena kinetike transformacije ispitivane supstance, i kada je moguće glavnih proizvoda konverzije;
- predložene puteve transformacije, kada je to moguće; - prodiskutovati rezultate.

SMJERNICE ZA AEROBNE I ANAEROBNE SISTEME ZA ISPITIVANJE
DIO II

Aerobni sistem za ispitivanje

Aerobni sistem za ispitivanje opisan u ovoj metodi ispitivanja sastoji se od aerobnog vodenog sloja (tipična koncentracija kiseonika varira od 7 mg/l do 10 mg/l) i sedimentnog sloja, koji je aeroban na površini, a anaerobni ispod površine (tipični prosječni redoks potencijal (Ex) u anaerobnoj zoni sedimenta varira od -80 do -190 mV). Vlažni vazduh se pušta po površini vode u svakoj inkubacionoj jedinici da bi se održao odgovarajući nivo kiseonika u svakoj gornjem dijelu suda.

Anaerobni sistem za ispitivanje

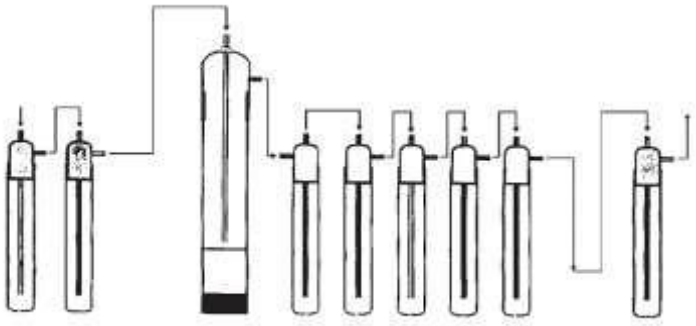
Za anaerobne ispitivane sisteme, postupak ispitivanja je u suštini isti kao i kod opisanog aerobnog sistema, sa izuzetkom da se vlažni azot pušta po površini vode u svakoj inkubacionoj jedinici da bi se održao novo azota u gornjem dijelu suda. Sediment i voda se smatraju anaerobnim ako je redoks potencijal (Ex) niži od -100 mV.

U anaerobnoj studiji, procjena mineralizacije uključuje mjerenje ugljen dioksida i metana.

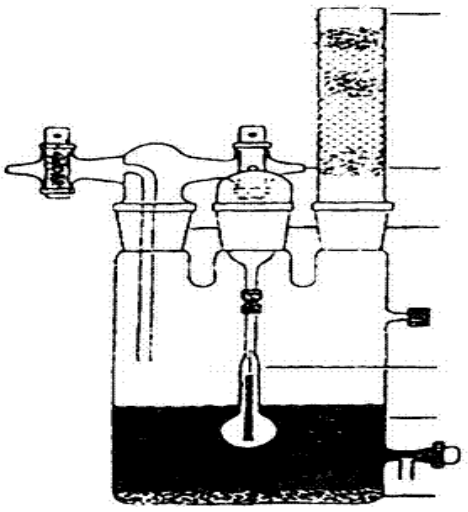
PRIMJER GAS - PROTOČNE APARATURE
DIO III

PRIMJER GAS – PROTOČNE APARATURE

Protočna aparatura se sastoji iz ulaznih trapava, indukcione jedinice, volatilnih trapova i izlaznog trapa. Ima dva ulazna trapa u jedan je dejonizovana voda, a drugi je sigurnosni trap. U njih se uvode vazduh ili azot.Undukcionu jedinica čine površinska voda i sediment. Volatilne trapove čine 4 trapa i jedan sigurnosni trap, koji su sa cjevovodom izlaznog ventila akvarijuma povezani sa izlaznim trapom u kome se nalazi dejonizovana voda. Izlazni trep je povezan sa vakuumom. Sigurnosni trapovi su prazni, a dva od 4 trapa su punjena; jedan sa etilenglikolom za hvatanje volatilnih supstanci, a drugi sa 0.01M sumpornom kiselinom za hvatanje alkalnih volatilnih supstanci.



PRIMJER BIOMETARSKOG APARATA
DIO IV



sistem za apsorpciju CO_2 i volatilnih organskih jedinjenja

ureĆaj za izdvajanje CO_2

otvor za odreĆivanje O_2 u vodi

otvor za odreĆivanje gasa (zatvoren ventil)

miješalica

voda

sediment

magnetna miješalica

PRIMJER RAČUNANJA ZA PRIMJENU DOZE NA POSUDE ZA ISPITIVANJE
DIO V

Unutrašnji prodnos cilindra je 8 cm. Dubina kolone sa vodom ne uključujući sediment iznosi 12 cm. Površina je 3,142 × 42 = 50,3 cm^2 Doza koja se preporučuje za primjenu: 500 g ispitivane substance/ha odgovara 5 µg/cm^2. Ukupno µg: 5 × 50,3 = 251,5 µg . Podesiti količinu u odnosu na dubinu od 100 cm: 12 × 251,5 ÷ 100 = 30,18 µg. Zapremina kolone sa vodom iznosi 50,3 × 12 = 603 ml. Koncentracija u vodi: 30,18 ÷ 603= 0,050 µg/ml ili 50 µg/l

1. Metoda

Ova metoda odgovara smjernici OECD TG 309 (2004).

1.1. Uvod

Svrha je ovog testa jeste mjerenje vremenskog toka biorazgradnje ispitivane supstance koja je prisutna u aerobnoj prirodnoj vodi u niskoj koncentraciji i kvantifikovati zapažanja u obliku izraza za kinetičku brzinu. Ovaj simulacijski test je laboratorijaski šaržni test protresanjem u bočici kojim se određuju brzine aerobne biorazgradnje organskih supstance u uzorcima prirodne površinske vode (slatka, bočata ili morska). Bazira se na ISO/DIS 14592-1, a sadrži i elemente ispitnih metoda C.23. i C.24. U slučaju dužih vremena ispitivanja, šaržni postupak može se fakultativno zamijeniti polukontinuiranim kako se ne bi narušio ispitni mikrokozmos. Glavni cilj simulacionog testa je određivanje mineralizacije ispitivane supstance u površinskoj vodi, koja čini osnovu za opisivanje kinetike razgradnje. Međutiim, ispitivanje ima i fakultativni sekundarni cilj – dobijanje informacija o primarnoj razgradnji i ssupstancaanju značajnih proizvoda razgradnje. UtvrĐivanje proizvoda presupstancaanja i, po mogućnosti, kvantifikovanje njihovih koncentracija posebno je važno kod supstance koje se vrlo sporo mineraliziraju (npr. kad vrijeme poluraspada ukupnog preostalog 14 C iznosi više od 60 dana). Zbog analitičkih ograničenja, za identifikaciju i kvantifikaciju značajnih proizvoda stavranja u pravilu treba koristiti više koncentracije ispitivane supstance (npr. > 100 µg/l).

U okviru ovog testa, niska koncentracija je koncentracija koja je dovoljno niska (npr. manje od 1 µg/l do 100 µg/l) da se prilikom ispitivanja postigne kinetika biorazgradnje kakva se može očekivati u životnoj sredini. Uzimajući u obzir ukupnu masu biorazgradivih ugljenikovih supstrata u prirodnoj vodi koja se koristi u ispitivanju, nisko koncentrisana ispitivana supstanca služi kao sekundarni supstrat. To znači da je očekivana kinetika biorazgradnje kinetika prvog reda (kinetika „bez rasta‖) i da se ispitivana supstanca može razgraditi „kometabolizmom‖ . Kinetika prvog reda podrazumijeva da je brzina razgradnje (mg/l/dan) odnosna koncentraciji supstrata, koja opada s vremenom. Kod prave kinetike prvog reda konstanta specifične brzine razgradnje (k) je nezavisna od vremena i koncentraciji. k se ne mijenja značajnije tokom jednog eksperimenta, ali ni s povećanjem koncentracije između eksperimenta. Prema definiciji, konstanta specifične brzine razgradnje jednaka je relativnoj promjeni koncentracije po jedinici vremena: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Iako se u propisanim uslovima u pravilu očekuje kinetika prvog reda, u određenim su okolnostima možda primjerenije druge vrste kinetike. Odstepena od kinetike prvog reda mogu se zapaziti kad brzinu biorazgradnje više ograničava pojava prenosa mase, npr. brzina difuzije, nego brzina biološke reakcije. Ipak, podaci se gotovo uvijek mogu opisati kinetikom pseudoprvog reda, ako se prihvati konstanta brzine ovisna o koncentraciji.

Prije ispitivanja trebale bi biti rapoložive informacije o biorazgradivosti ispitivane supstance pri višim koncentracijama (npr. iz standardnih testova pretraživanja) kao i podaci o abiotičkoj razgradivosti, proizvodima ssupstancaanja i relevantnim fizičko hemijskim svojstvima koji mogu pomoći kod planiranja eksperimenta i tumačenja rezultata. Sposobnost potpune biorazgradnje može se odrediti primjenom 14 C obilježene ispitivane supstance i određivanjem fazne diobe 14 C na kraju ispitivanja. Ako se koristi neobilježena ispitivana supstanca, konačna biorazgradnja se može procijeniti samo ako se ispituje viša koncentracija i ako su poznati svi značajni proizvodi razgradnje.

1.2. Definicije

Primarna biorazgradnja: Promjena strukture hemikalije (presupstancaanje) djelovanjem mikroorganizama koja rezultira gubitkom hemijskog identiteta.

Funkcionalna biorazgradnja: Promjena strukture hemikalije (presupstancaanje) djelovanjem mikroorganizama koja rezultira gubitkom određenog svojstva.

Potpuna aerobna biorazgradnja: Razgradnja hemikalije djelovanjem mikroorganizama u prisutnosti kiseonika na ugljen dioksid, vodu i mineralne soli drugih prisutnih elemenata (mineralizacija) i supstance nove biomase i organskih proizvoda mikrobne biosinteze.

Mineralizacija: Razgradnja hemikalije odnosno organske supstance djelovanjem mikroorganizama u prisutnosti kiseonika na ugljen dioksid, vodu i mineralne soli drugih prisutnih elemenata.

Faza prilagoĐavanja („lag‖ faza): Vrijeme koje je potrebno da se mikroorganizmi koji obavljaju razgradnju prilagode i stepen biorazgradnje hemikalije odnosno organske supstance dostigne nivo detekcije (npr. 10 % maksimalne teoretske biorazgradnje ili manje, zavisno od tačnosti mjerne tehnike), računajući od početka ispitivanja.

Maksimalna biorazgradnja: Stepen biorazgradnje hemikalije ili organske supstance u okviru ispitivanja, izražen u postotku, iznad kojega se hemikalija odnosno supstanca biološki ne razgrađuje tokom ispitivanja.

Primarni supstrat: Jedinjenje prirodnog ugljenika i izvora energije koji osiguravaju rast i održavanje mikrobne biomase.

Sekundarni supstrat: Komponenta supstrata koja je prisutna u tako niskoj koncentraciji da njenom razgradnjom relevantni mikroorganizmi primaju tek neznatne količine ugljenika i energije u odnosu na ugljenik i energiju koja se osigurava razgradnjom glavnih komponenti supstrata
(primarni supstrati).

Konstanta brzine razgradnje: Konstanta brzine kinetike prvog reda ili pseudoprvog reda k (d -1) kojom se označava brzina procesa razgradnje. U slučaju šaržnih eksperimenta k se procjenjuje iz početnog dijela krive razgradnje dobijene po završetku faze prilagoĐavanja.

Vrijeme poluraspada, t 1/2 (d): Izraz koji se koristi za opisivanje brzine reakcije prvog reda. To je vremenski interval koji odgovara smanjenju koncentracije za faktor 2. Odnos između vremena poluraspada i konstante brzine razgradnje opisan je jednačinom $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Vrijeme polurazgradnje, DT 50 (d): Izraz koji se koristi za kvantifikaciju rezultata ispitivanja biorazagradnje. To je vrijeme koje je potrebno da se dostigne 50 %-tna biorazgradnja, uključujući fazu prilagoĐavanja.

Granica detekcije (Limit of Detection, LOD) i granica kvantifikacije (Limit of Quantification, LOQ): Granica detekcije (LOD) je koncentracija supstance ispod koje se supstanca više ne može razlikovati od analitičkih artefakata. Granica kvantifikacije (LOQ) je

koncentracija supstance ispod koje se koncentracija ne može odrediti s prihvatljivom točnošću.

Rastvoreni organski ugljenik (DOC): Dio organskog ugljenika u uzorku vode koji se ne može ukloniti predviĐenim odlijevanjem faza, npr. 15-minutnim centrifugiranjem na 40 000 ms -2 ili membranskom filtracijom s membranama veličine pora 0,2 µm – 0,45 µm.

Ukupna aktivnost organskog 14 C (Total Organic 14 C Activity, TOA): Ukupna aktivnost 14 C povezana s organskim rastvorenog.

Aktivnost rastvorenog organskog 14 C (Dissolved Organic 14 C Activity, DOA): Ukupna aktivnost 14 C povezana s rastvorenim organskim ugljenikom.

Aktivnost čestičnog organskog 14 C (Particulate Organic 14 C Activity, POA): Ukupna aktivnost 14 C povezana s organskim ugljenikom u česticama.

1.3. Primjenjivost testa

Simulacioni test primjenjiv je u slučaju neisparljivih i blago isparivih organskih supstanci koje se ispituju pri niskim koncentracijama. Ako se korise bočice otvorene prema atmosferi (npr. začepljene vatom), supstance s konstantom Henryjevog zakona ispod cca 1 Pa·m 3 /mol (cca 10 – 5 atm·m 3 /mol) mogu se u praksi smatrati neisparivima. Ako se koriste zatvorene bočice sa vazdušnim prostorom, mogu se ispitivati i blago isparive supstance (s konstantama Henryjevog zakona < 100 Pa·m 3 /mol ili < 10 –3 atm·m 3 /mol) bez gubitaka iz ispitnog sistema. Kod ispiranja CO 2 može doći do gubitaka 14 C obilježenih supstanci ako se ne sprovedu odgovarajuće mjere predostrožnosti. U takvim je slučajevima ponekad potrebno odvajati CO 2 na unutrašnjem alkalijskom apsorberu ili koristiti poljašnji apsorberski sistem CO 2 (direktno određivanje 14 CO 2 ; vidi Dodatak 3.). Za određivanje kinetike biorazgradnje koncentracije ispitivane supstance moraju biti ispod rastvorljivosti u vodi. Ipak, vrijednosti rastvorljivosti u vodi koje se navode u literaturi su znatno više od rastvorljivosti ispitivane supstance u prirodnim vodama. Rastvorljivost izrazito slabo rastvorivih ispitivanih supstanci može se utvrditi pomoću prirodnih voda koje će se koristiti u ispitivanju.

Metoda se može koristiti za simulaciju biorazgradnje u površinskoj vodi bez grubih čestica (pelagički test) ili u mutnoj površinskoj vodi kakva se npr. može pronaći u blizini jedinjenjea voda/sediment (test sa suspendovanim sedimentom).

1.4. Načelo ispitivanja

Ispitivanje se sprovodi u šaržnom postupku inkubiranjem ispitivane supstance s površinskom vodom (pelagički test) ili s površinskom vodom kojoj je dodata suspendovana čvrsta supstanca/sediment u koncentraciji od 0,01 do 1 g/l suve mase (test sa suspendovanim sedimentom) radi simulacije vodne cjeline sa suspendovanom čvrstom supstancom ili resuspendovanim sedimentom. Koncentracija suspendovane čvrste supstance/sedimenta u donjem segmentu ovog područja reprezentativna je za većinu površinskih voda. Ispitne se bočice inkubiraju u mraku na temperaturi životne sredine u aerobnim uslovima, uz mućkanje. Za određivanje kinetike razgradnje koriste se najmanje dvije koncentracije ispitivane supstance. Koncentracije se moraju razlikovati za faktor 5 do 10 i predstavljaju očekivani raspon koncentracija u životnoj sredini. Maksimalna

koncentracija ispitivane supstance ne smije biti viša od 100 µg/l, a poželjno je da maksimalne ispitne koncentracije budu i niže od 10 µg/l kako bi se dobila biorazgradnja u skladu s kinetikom prvog reda. Najniža koncentracija ne smije biti viša od 10 µg/l, a prednost treba dati ispitnim koncentracijama od 1 – 2 µg/l ili čak ispod 1 µg/l. U pravilu se i tako niske koncentracije mogu dovoljno dobro analizirati primjenom 14 C obilježenih supstanci koje su dostupne na tržištu. Ako se ispitivana supstanca primjenjuje u koncentraciji ≤ 100 µg/l, njenu koncentraciju često nije moguće izmjeriti s potrebnom tačnošću zbog analitičkih ograničenja. Više koncentracije ispitivane supstance (> 100 µg/l, a ponekad i 1 mg/l) mogu se koristiti za identifikaciju i kvantifikaciju značajnih proizvoda presupstancaanja i u slučajevima kad nije raspoloživa specifična analitička metoda s niskom granicom detekcije. Ako se ispituju visoke koncentracije ispitivane supstance, ponekad nije moguće procijeniti konstantu razgradnje prvog reda i vrijeme poluraspada na osnovu dobijenih rezultata budući da razgradnja vjerovatno neće slijediti kinetiku prvog reda.

Razgradnja se prati mjerenjem preostalog 14 C ili preostale koncentracije ispitivane supstance, ako se sprovodi specifična hemijska analiza, u odgovarajućim vremenskim razmacima. 14 C obilježavanjem najstabilnijeg dijela molekula može se odrediti ukupna mineralizacija, dok se 14 C obilježavanjem manje stabilnog dijela molekule i primjenom specifične analize može odrediti samo primarna biorazgradnja. Ipak, najstabilniji dio ne mora nužno uključivati relevantni funkcionalni dio molekule (koji je povezan sa specifičnim svojstvom, kao što je toksičnost, bioakumulacija itd.). U tom je slučaju kod ispitivanja koristiti supstancu s 14 C oznakom u funkcionalnom dijelu kako bi se pratilo nestajanje specifičnog svojstva.

1.5. Informacije o ispitivanoj supstanci

Koristiti radioaktivno obilježene i neobilježene supstance. 14 C obilježavanje je preporučeni postupak, a oznaka se nalazi na najstabilnijem dijelu ili dijelovima molekule. Kod supstance koje sadrže više od jednog aromatskog prstena treba po mogućnosti obilježiti jedan ili više ugljenika u svakom prstenu. Osim toga, poželjno je obilježiti jedan ili više ugljenika s obje strane lako razgradivih veza. Hemijska i/ili radioaktivna čistoća ispitivane supstance su > 95 %. Kod radioaktivno obilježenih supstance poželjna je specifična aktivnost od približno 50 µCi/mg (1,85 MBq) ili više da bi se olakšala mjerenja 14 C kod ispitivanja s niskim početnim koncentracijama. Sljedeće informacije o ispitivanoj supstanci su potrebne:
— rastvorljivost u vodi (metoda A.6.),
— rastvorljivost u organskom rastvoru ili rassupstancaačima (ako se supstanca primjenjuje pomoću rassupstancaača ili ima nisku rastvorljivost u vodi),
— konstanta disocijacije (pKa), ako je supstanca sklona protonaciji ili deprotonaciji (OECD TG
112) (5.),

— napon pare (metoda A.4.) i konstanta Henryjevog zakona,
— hemijska stabilnost u vodi i u mraku (hidroliza) (metoda C.7.).
Ako se supstance koje su slabo rastvorive u vodi ispituju u morskoj vodi, korisno je znati konstantu isoljivanja (ili „Setschenowu konstantu‖) K s , koja se definisše izrazom: log (S/S') = K s C m , gdje su S i S' rastvorljivost supstance u slatkoj i morskoj vodi i C m je molarna koncentracija soli.

Ako se ispitivanje sprovodi kao „test sa suspendovanim sedimentom‖ , moraju biti rapoložive i ove informacije:
— podjelni koeficijent n-oktanol/voda (metoda A.8.), — koeficijent adsorpcije (metoda C.18.).

Ostale korisne informacije su:
— koncentracija u životnoj sredini, ako je poznata ili procijenjena,
— toksičnost ispitivane supstance za mikroorganizme (metoda C.11.),
— laka i/ili svojstvena biorazgradivost (metoda C.4. A-F, C.12., C.9, OECD TG 302 (5.)),
— aerobna ili anaerobna biorazgradivost u zemljištu i presupstancaanja u sedimentu/vodi (metoda C.23., C.24.).

1.6. Referentne supstance

Kao referentnu supstancu treba koristiti supstanca koja se u pravilu lako razgrađuje u aerobnim uslovima (npr. anilin ili natrijum benzoat). Očekivano vrijeme razgradnje anilina i natrijumog benzoata je kraće od 2 nedelje. Svrha korištenja referentnih supstanci je uvjeriti se da se mikrobna aktivnost ispitne vode kreće unutar određenih granica, tj. da voda sadrži aktivnu mikrobnu populaciju.

1.7. Kriterijumu kvaliteta

1.7.1. Iskorištenje

Svaka početna ispitna koncentracija provjerava se odmah nakon dodavanja ispitivane supstance u najmanje dva uzorka mjerenjem aktivnosti 14 C ili, u slučaju neobilježenih supstanci, hemijskom analizom. Time se dobijaju informacije o primjenjivosti i ponovljivosti metode analize i homogenosti diobe ispitivane supstance. Kod kasnijih analiza podataka u pravilu se ne koristi nazivna koncentracija već izmjerena početna aktivnost 14 C odnosno izmjerena koncentracija ispitivane supstance, jer se time ispravljaju gubici zbog sorpcije i greške u doziranju. Kod 14 C obilježenih supstanci iskorištenje na kraju eksperimenta proizlazi iz bilansa mase. U idealnom slučaju bilanca mase radioaktivno obilježene supstance trebala bi se kretati u području od 90 % do 110 %, dok bi analitička tačnost kod neobilježenih supstanci trebala biti takva da se dobije početno iskorištenje u području od 70 % do 110 %. Ta područja treba shvatiti kao ciljne vrijednosti, a ne kao kriterijum za prihvatanje ispitivanja. Analitička tačnost može se fakultativno odrediti pri koncentraciji ispitivane supstance koja je niža od početne kao i za značajne proizvode presupstancaanja.

1.7.2. Ponovljivost i osjetljivost metode analize

Ponovljivost metode analize (uključujući efikasnost početne ekstrakcije) za kvantifikaciju ispitivane supstance i proizvoda presupstancaanja (prema potrebi) treba provjeriti peterostrukom analizom pojedinačnih ekstrakata površinske vode.

Granica detekcije (LOD) metode analize za ispitivanu supstanca i proizvode presupstancaanja treba po mogućnosti biti najmanje 1 % početne količine koja je primijenjena na ispitni sistem. Granica kvantifikacije (LOQ) treba biti jednaka ili manja od 10 % primijenjene koncentracije. Za hemijsku analiza brojnih organskih supstanci i njihovih proizvoda presupstancaanja često su potrebne relativno visoke koncentracije ispitivane supstance tj. > 100 µg/l.

1.8. Opis ispitne metode 1.8.1. Oprema

Ispitivanje se može ssprovesti u stožastim ili cilindričnim tbočicama odgovarajuće zapremine (npr. 0,5 ili 1,0 l) sa silikonskim ili gumenim čepovima ili u serumskim bocama s poklopcima

koji ne propuštaju CO 2 (npr. sa čepom od butilne gume). Druga je mogućnost da se upotrijebi veći broj bočica i u svakom vremenu uzorkovanja uzimaju čitave bočice, najmanje po dvije. Kod neisparljivih ispitivanih supstanci koje nisu radioaktivno obilježene nisu potrebni gasonepropusni čepovi i poklopci; dovoljno ih je začepiti vatom koja sprečava zagaĐivanje iz vazduha. Blago isparive supstance treba ispitati u sistemu biometarskog tipa uz nježno miješanje po površini vode. Da bi se izbjeglo zagaĐivanje bakterijama, posude se mogu prije upotrebe sterilisati zagrijavanjem ili obradom u autoklavu. Osim toga, koristi se sljedeća standardna laboratorijaska oprema:

—magnetski mješači za neprekidno mućkanje ispitnih posuda,
— centrifuga,
— mjerač pH vrijednosti,
— turbidimetar za nefelometrijska mjerenja mutnoće,
— peć ili mikrotalasna peć za određivanje suve mase,
— uređaj za membransku filtraciju,
— autoklav ili peć za toplotnu sterilizaciju staklene opreme,
— oprema za rukovanje 14 C obilježenim supstancema,
— oprema za kvantifikaciju aktivnosti 14 C u uzorcima iz rastvora za odvajanje CO 2 i, prema potrebi, iz uzoraka sedimenta,
— analitička oprema za određivanje ispitivane (i referentne) supstance, ako se koristi specifična hemijska analiza (npr. gasni hromatograf, tečni hromatograf pod visokim pritiskom).

1.8.2. **Radni rastvori ispitivane supstance**

Za pripremu radnih rastvora ispitivanih i referentnih supstanci treba koristiti dejonizovanu. U dejonizovanoj vodi ne smije biti supstance koje bi mogle biti toksične za mikroorganizme, a udio rastvorenog organskog ugljenika (DOC) ne smije biti viši od 1 mg/l (6.).

1.8.3. **Skupljanje i prijevoz površinske vode**

Mjesto za uzorkovanje površinske vode treba odabrati u skladu sa svrhom ispitivanja. Kod izbora mjesta treba uzeti u obzir moguću istorijuunosa materijala iz poljoprivrede, industrije i domačinstava. Voda za ispitivanje ne smije se skupljati na mjestima za koja se zna da su u prethodne četiri godine onečišćena ispitivanom supstance ili njenim strukturnim analozima, osim ako je svrha istraživanja ispitati brzinu razgradnje na onečišćenim lokacijama. Na mjestu uzorkovanja treba izmjeriti pH vrijednost i temperaturu vode. Osim toga, treba zabilježiti dubinu uzorkovanja i izgled vodenog uzorka (npr. boja i mutnoća) (vidi odjeljak 3.). Da bi se dokazali aerobni uslovi, treba izmjeriti koncentraciju kiseonika i/ili redoks potencijal u vodi i površinskom sloju sedimenta, osim ako je to nedvojbeno s obzirom na izgled i ranija iskustva s lokacijom. Površinsku vodu treba prenositi u bazira seto očišćenim rezervoarima. Za to vrijeme temperatura uzorka ne smije biti značajno viša od ispitne temperature. Ako prijevoz traje duže od 2 do 3 sata, preporučuje se hlaĐenje na 4 °C. Vodeni uzorak ne smije biti zamrznut.

1.8.4. **Skladištenje i priprema površinske vode**

Ispitivanje po mogućnosti treba započeti u roku od jednoga dana od uzimanja uzorka. Skladištenje vode, ako je ono potrebno, treba svesti na najmanju moguću mjeru, a u svakom slučaju ne smije trajati duže od 4 nedelje. Vodeni uzorak treba do upotrebe držati na temperaturi od 4 °C uz dozračivanje. Prije upotrebe treba ukloniti krupne čestice npr. filtriranjem kroz najlonski filtar veličine otvora 100 µm ili kroz grubi filtar-papir ili taloženjem.

1.8.5. **Priprema vode sa sedimentom (fakultativno)**

Kod testa sa suspendovanim sedimentom treba pripremiti suspenziju dodavanjem površinskog sedimenta u bočice koje sadrže prirodnu vodu (koja je prethodno filtrirana radi uklanjanja krupnih čestica, kako je opisano u odjeljku 1.8.4.); koncentracija suspendovane čvrste supstance treba biti između 0,01 i 1 g/l. Površinski sediment mora poticati s istog mjesta kao vodeni uzorak. U zavisnosti od vodene životne sredine, površinski sediment može imati visok sadržaj organskog ugljenika (2,5 – 7,5 %) i finu teksturu ili nizak sadržaj organskog ugljenika (0,5 – 2,5 %) i grubu teksturu. Površinski se sediment može pripremiti na sljedeći način: uz pomoć prozirne plastične cjevčice izvuče se nekoliko sedimentnih jezgra; odmah nakon uzorkovanja odrežu se gornji aerobni slojevi (od površine do dubine od najviše 5 mm) i združe. Dobijeni uzorak sedimenta prenosi se u posudi s velikim vazdušnim prostorom kako bi se osigurali aerobni uslovi (uz hlađenje na 4 °C ako prevoz traje više od 2 – 3 sata). Uzorak sedimenta se suspenduje u ispitnoj vodi u prodnosu 1: 10 i drži do upotrebe na temperaturi od 4 °C uz dozračivanje. Skladištenje sedimenta, ako je ono potrebno, treba svesti na najmanju moguću mjeru, a u svakom slučaju ne smije trajati duže od 4 nedelje.

1.8.6. **Polukontinuirani postupak (fakultativno)**

Inkubaciju je ponekad potrebno produžiti (na nekoliko mjeseci) ako se značajna razgradnja ispitivane supstance izmjeri tek nakon dugog vremena prilagođavanja. Ako je to poznato iz ranijeg ispitivanja supstance, ispitivanje se može započeti polukontinuiranim postupkom, koji omogućava periodično obnavljanje dijela ispitne vode odnosno suspenzije (Dodatak 2.). Druga je mogućnost da se uobičajeni šaržni test pretvori u polukontinuirani ako tokom približno 60 dana ispitivanja šaržnim postupkom nije došlo do razgradnje ispitivane supstance (odjeljak 1.8.8.3.).

1.8.7. **Dodavanje ispitivane (ili referentne) supstance**

U slučaju supstance visoke rastvorljivosti u vodi (> 1 mg/l) i niske isparivosti (konstanta Henryjevog zakona < 1 Pa·m 3 /mol ili < 10 –5 atm·m 3 /mol), može se pripremiti radni rastvor u dejonizovanoj vodi (odjeljak 1.8.2.); u ispitne se posude doda odgovarajući volumen radnog rastvora da bi se dobila željena koncentracija. Volumen radnog rastvora koji se dodaje u posudu treba svesti na najmanju moguću mjeru (po mogućnosti < 10 % konačnog volumena tečnosti). Druga mogućnost je da se ispitivana supstanca rastvori u većem volumenu ispitne vode, što se može smatrati zamjenom za korištenje organskih rastvrača.

Ako kod pripreme radnih rastvora neisparljivih supstanci koje su slabo rastvorljive u vodi nije moguće izbjeći primjenu rassupstancaača, treba koristiti isparive organske rassupstancaače, s time da količina rastvorala koja se unosi u ispitni sistem ne smije biti viša od 1 % v/v i ne smije imati štetni efekat na mikrobnu aktivnost. Rassupstancaač ne smije uticati na stabilnost ispitivane supstance u vodi. Rassupstancaač treba spirati na najmanju moguću količinu kako ne bi došlo do značajnog povećanja koncentracije DOC-a u ispitnoj vodi odnosno suspenziji. To treba provjeriti specifičnom analizom supstance odnosno, ukoliko je to moguće, analizom DOC-a. Treba paziti da se prenesena količina rastvora svede na nužnu mjeru i uvjeriti se da se prisutna količina ispitivane supstance može rastvoriti u konačnom volumenu ispitne vode. Mogu se koristiti i druge tehnike za uvođenje ispitivane supstance u ispitne posude. Ako se za primjenu ispitivane supstance koristi organski rastvrača, treba uvesti kontrole s rassupstancaačem koje sadrže ispitnu vodu (bez

dodataka) i ispitnu vodu s referentnom supstancome i s njima postupati na sličan način kao s aktivnim ispitnim posudama u koje je dodata ispitivana supstanca u rastvoru kao nosaču. Svrha kontrola s rassupstancaačem je ispitati moguće štetne efekte rastvora na mikrobnu populaciju na osbovu razgradnje referentne supstance.

1.8.8. **Ispitni uslovi**

1.8.8.1. *Ispitna temperatura*

Inkubacija se sprovodi u mraku (poželjno) ili pod difuznom rasvjetom na sastojcinoj temperaturi
(± 2 °C), koja može odgovarati temperaturi na terenu ili standardnoj temperaturi od 20 – 25 °C. Temperatura na terenu može biti ssupstancana temperatura uzorka u trenutku uzorkovanja ili prosječna temperatura na mjestu uzorkovanja.

1.8.8.2. *Mućkanje*

Čestice i mikroorganizme treba držati u suspenziji neprekidnim mućkanjem tj. tresenjem ili miješanjem. Mućkanjem se takođe olakšava prenos kiseonika iz vazdušnog u tečni proctor i tako osiguravaju potrebni aerobni uslovi. Bočice se stave na mješalicu (cca 100 o/min) ili se koristi magnetska mješalica. Mućkanje se ne smije prekidati. Tresenje odnosno miješanje mora biti što je moguće nježnije, ali istovremeno treba voditi računa da se održi homogenost suspenzije.

1.8.8.3. *Trajanje ispitivanja*

Ispitivanje uglavnom ne bi smjelo trajati duže od 60 dana, osim ako se primjenjuje polukontinuirani postupak s periodičnim obnavljanjem ispitne suspenzije (odjeljak 1.8.6. i Dodatak 2.). Ipak, vrijeme ispitivanja se i kod primjene šaržnog postupka može produžiti do najviše 90 dana ako je razgradnja ispitivane supstance započela unutar prvih 60 dana. Razgradnja se prati u odgovarajućim vremenskim razmacima određivanjem preostale aktivnosti 14 C odnosno nastalog 14 CO 2 (odjeljak 1.8.9.4.) i/ili hemijskom analizom (odjeljak 1.8.9.5.). Vrijeme inkubacije mora biti dovoljno dugo da se ocijeni proces razgradnje. Poželjno je da stepen razgradnje bude viši od 50 %; kod supstance koje se sporo razgrađuju stepen razgradnje mora biti dovoljan (u pravilu iznad 20 %) da se može procijeniti konstanta kinetičke brzine razgradnje.

Sprovode se periodična mjerenja pH vrijednosti i koncentracije kiseonika u ispitnom sistemu, osim ako zahvaljujući ranijim iskustvima s uzorcima vode i sedimenta s iste lokacije u sličnim ispitivanjima takva mjerenja nisu potrebna. U određenim uslovima zbog metabolizma primarnih supstrata, koji mogu biti prisutni u vodi ili sedimentu u znatno višim koncentracijama, može doći do stravranja povećanih količina CO 2 i povećane potrošnje kiseonika, što može izazvati značajne promjene eksperimentalnih uslova tokom ispitivanja.

1.8.9. **Postupak**

1.8.9.1. *Priprema bočica za pelagički test*

U ispitne se bočice stavi prikladna količina ispitivane supstance koja je otprilike dovoljna da se ispuni jedna trećina zapremine bočice, ali ne manje od cca 100 ml. I ako se koristi veći

broj bočica (kako bi se u svakom vremenu uzorkovanja mogle uzimati čitave bočice), potrebno je oko 100 ml ispitne vode, budući da male veličine uzorka mogu uticati na dužinu faze prilagoĐavanja. Ispitivana se supstanca dodaje putem radnog rastvora kako je opisano u odjeljku 1.8.2. i 1.8.7. Da bi se mogla odrediti kinetika razgradnje i izračunati konstanta kinetičke brzine razgradnje, potrebne su najmanje dvije koncentracije ispitivane supstance koje se razlikuju za faktor 5 do 10. Obje odabrane koncentracije moraju biti manje od 100 µg/l, a poželjno je da budu u rasponu od < 1 – 10 µg/l.

Bočice se zatvore čepovima ili poklopcima koji propuštaju vazduh i CO 2 . Ako se ispituju neisparive hemikalije koje nisu radioaktivno obilježene, posude se mogu začepiti vatom koja sprečava zagaĐivanje iz vazduha (odjeljak 1.8.1.), pod uslovom da se zna da su svi značajni proizvodi razgradnje neisparivi i primjenjuje se nedirektno određivanje CO 2 (Dodatak 3.).

Bočice se inkubiraju na odabranoj temperaturi (odjeljak 1.8.8.1.). Uzorci se uzimaju na hemijsku analizu ili mjerenje 14 C na početku ispitivanja (tj. prije nego što započne razgradnja; i u odgovarajućim vremenskim razmacima tokom ispitivanja. Uzorkovanje se može obaviti izvlačenjem poduzoraka (npr. alikvoti od 5 ml) iz svakog ponavljanja ili uzimanjem čitavih bočica u svakom vremenu uzorkovanja. Mineralizacija ispitivane supstance može se odrediti nedirektno ili direktno (Dodatak 3.). Obično je za pouzdanu procjenu konstante brzine potrebno najmanje pet tačaka uzorkovanja u fazi razgradnje (tj. nakon završetka faze prilagođavanja), osim u slučaju brzo razgradivih supstance, kada se uz odgovarajuće obrazloženje mogu dopustiti i tri tačke uzorkovanja. Kod supstance koje nisu brzo razgradive, u fazi razgradnje se bez problema može obaviti više mjerenja i stoga za procjenu k treba koristiti više tačaka podataka. Nije moguće navesti tačan vremenski raspored uzorkovanja budući da su brzine biorazgradnje različite; ipak, preporučuje se da se u slučaju spore razgradnje uzorkovanje sprovodi jedanput nedeljno. Ako se ispitivana supstanca brzo razgraĐuje, uzorkovanje treba obavljati jedanput dnevno u prva tri dana, a zatim svaki drugi ili treći dan. U određenim okolnostima, npr. kod supstance koje vrlo brzo hidroliziraju, ponekad je potrebno uzimati uzorke svaki sat. Preporučuje se da se prije ispitivanja sprovede preliminarno istraživanje kako bi se odredili prikladni intervali uzorkovanja. Ako se uzorci moraju sačuvati za dalju specifičnu analizu, preporučljivo je uzeti više uzoraka i zatim na kraju eksperimenta odabrati one koji će se analizirati obrnutim redoslijedom tj. prvo se analiziraju uzorci koji su uzeti zadnji.

1.8.9.2. *Broj bočica i uzoraka*

Pripremi se dovoljan broj ispitnih bočica tako da se dobije:

— ispitne bočice; najmanje dvije bočice za svaku koncentraciju ispitivane supstance (poželjno je najmanje 3) ili veći broj ispitnih bočica po koncentraciji, ako se u svakom vremenu uzorkovanja uzimaju čitave bočice (označene kao F T);

— ispitne bočice za iizračunavanje bilance mase; najmanje dvije bočice za svaku ispitnu koncentraciju (označene kao F M);

— slijepa proba, bez ispitivane supstance; najmanje jedna bočica za slijepu probu koja sadrži samo ispitnu vodu (označena kao F B);

— kontrola s referentnom supstance; dvije bočice s referentnom supstance (npr. anilin ili natrijum benzoat, 10 µg/l) (označene kao F C). Svrha kontrole s referentnom supstancom je potvrditi minimalnu mikrobnu aktivnost. Ako je to praktično, može se koristiti radioaktivno obilježena referentna supstanca, takoĐe i onda kad se razgradnja ispitivane supstance prati hemijskim analizama;

— sterilna kontrola; jedna ili dvije bočice koje sadrže steriliziranu ispitnu vodu radi provjere moguće abiotičke razgradnje ili drugog nebiološkog uklanjanja ispitivane supstance (označene kao F S). Biološka se aktivnost može prekinuti obradom ispitne vode u autoklavu (121 °C; 20 min), dodavanjem toksične supstance (npr. natrijum azid (NaN3) u koncentraciji 10 – 20 g/l, živin hlorid (HgCl 2) u koncentraciji 100 mg/l ili formalin u koncentraciji 100 mg/l) ili gama zračenjem. Ako se koristi HgCl 2 , tretira se kao opasan otpad. U vodi u koju je dodata velika količina sedimenta nije lako postići sterilne uslove; u tom se slučaju preporučuje višekratna obrada u autoklavu (npr. tri puta). Treba uzeti u obzir da se sorpcijska svojstva sedimenta mogu promijeniti obradom u autoklavu;

— kontrole sa rassupstancaačem koje sadrže ispitnu vodu i ispitnu vodu s referentnom supstance; po dvije bočice koje su obraĐene istom količinom rassupstancaača uz primjenu istog postupka kao u slučaju ispitivane supstance. Svrha ove kontrole je ispitati moguće štetne efekte rastvora određivanjem razgradnje referentne supstance.

Kod planiranja ispitivanja treba uzeti u obzir relativnu važnost povećanog broja ponavljanja u odnosu na povećani broj uzorkovanja. Tačan broj bočica zavisi od metode mjerenja razgradnje. U svakom vremenu uzorkovanja treba iz svake ispitne bočice uzeti po dva poduzorka (npr. alikvoti od

5 ml). Ako se koristi veći broj bočica radi uzorkovanja čitavih bočica, u svakom vremenu uzorkovanja treba uzeti najmanje dvije bočice (odjeljak 1.8.9.1. stav 1.).

1.8.9.3. *Priprema bočica za test sa suspendovanim sedimentom (fakultativno)*

U ispitne se posude dodaju potrebni volumeni ispitne vode i sedimenta (prema potrebi, odjeljak 1.8.5.). Priprema bočica za test sa suspendovanim sedimentom je ista kao kod pelagičkog testa (odjeljci 1.8.9.1. i 1.8.9.2.). Poželjno je koristiti serumske boce ili bočice sličnog oblika. Zatvorene bočice polažu se vodoravno na mješalicu. Naravno, otvorene bočice za neisparive supstance koje nisu radioaktivno obilježene treba staviti u uspravan položaj; u ovom se slučaju preporučuje korištenje magnetske mješalice s mješačima obloženim staklom. Boce prema potrebi treba dozračivati kako bi se održali porebni aerobni uslovi.

1.8.9.4. *Radiohemijska određivanja*

Nastali 14 CO 2 mjeri se nedirektno i direktno Dodatak 3.). Nedirektno određivanje 14 CO 2 bazira se na razlici između početne aktivnosti 14 C u ispitnoj vodi odnosno suspenziji i ukupne preostale aktivnosti u vremenu uzorkovanja, koja se mjeri nakon zakiseljavanja uzorka na pH 2 – 3 i spiranja CO 2. Time je nenorganski ugljenik uklonjen i preostala izmjerena aktivnost potiče od organskog materijala. Nedirektno određivanje 14 CO 2 ne treba koristiti ako presupstancaanjem ispitivane supstance nastaju značajni isparljivi proizvodi (Dodatak 3.). Nastajanje 14 CO 2 treba po mogućnosti direktno mjeriti (Dodatak 3.) u najmanje jednoj ispitnoj bočici u svakom vremenu uzorkovanja; taj postupak omogućava da se provjeri i bilanca mase i proces biorazgradnje, ali je ograničen na ispitivanja koja se sprovode sa zatvorenim bočicama.

Ako se nastali 14 CO 2 direktno mjeri tokom ispitivanja, na početku ispitivanja treba pripremiti veći broj bočica. Direktno određivanje 14 CO 2 preporučuje se ako presupstancaanjem ispitivane supstance nastaju značajni isparljivi proizvodi. Dodatne ispitne bočice se u svakoj tački mjerenja zakisele na pH 2 – 3 i 14 CO 2 skuplja na unutrašnjem ili poljašnjem apsorberu (Dodatak 3.).

Koncentracije 14 C obilježene ispitivane supstance i značajnih proizvoda presupstancaanja mogu se fakultativno odrediti primjenom radiohromatografije (npr. tankoslojna hromatografija, RAD-TLC) ili HPLC-a s radiohemijskom detekcijom.

Isto tako, može se odrediti fazna dioba preostale radioaktivnosti (Dodatak 1.) te preostala ispitivana supstanca i proizvodi presupstancaanja.

Na kraju ispitivanja treba odrediti bilancu mase direktnim mjerenjem 14 CO 2 na posebnim ispitnim bočicama iz kojih se ne uzimaju uzorci tokom ispitivanja (Dodatak 3.).

1.8.9.5. *Specifična hemijska analiza*

Ako je raspoloživa osjetljiva metoda za specifičnu hemijsku analizu, primarna biorazgradnja može se ocijeniti bez radioaktivnog obilježavanja mjerenjem ukupne preostale koncentracije ispitivane supstance. Ako se koristi radioaktivno obilježena ispitivana supstanca (za mjerenje ukupne mineralizacije), specifična hemijska analiza se može paralelno sprovoditi da bi se dobile dodatne informacije i provjerio postupak. Osim toga, specifičnom hemijskom analizom mogu se mjeriti proizvodi presupstancaanja nastali razgradnjom ispitivane supstance, a to se u svakom slučaju preporučuje u slučaju supstance koje se mineraliziraju s vremenom poluraspada iznad 60 dana. U svakom vremenu uzorkovanja treba izmjeriti i dokumentovati koncentraciju ispitivane supstance i proizvode presupstancaanja (kao koncentraciju i kao postotak primijenjene koncentracije). U pravilu je u svakom vremenu uzorkovanja potrebno identifikovati proizvode presupstancaanja koji su utvrĐeni na nivou ≥ 10 % primijenjene koncentracije, osim ako postoje opravdani razlozi da se to ne učini. TakoĐe treba razmisliti o identifikaciji proizvoda presupstancaanja čije se koncentracije stalno povećavaju tokom istraživanja, čak i ako njihove koncentracije ne prelaze gore spomenuti prag, jer to može ukazivati na postojanost. Ako se smatra da bi moglo doći do brzog abiotičkog presupstancaanja ispitivane supstance (npr. hidroliza), treba razmisliti o analiziranju proizvoda presupstancaanja u sterilnim kontrolama. O kvantifikaciji i identifikaciji proizvoda presupstancaanja treba odlučiti za svaki slučaj posebno i u izvještaju navesti odgovarajuće obrazloženje. Postupci ekstrakcije organskim rassupstancaačem primjenjuju se u skladu s uputstvima datim u odgovarajućoj analitičkoj metodi.

Sve uzorke treba skladištiti na temperaturi od 2 do 4 °C bez pristupa vazduha, ako će se analiza obaviti u roku od 24 sata (poželjno). Kod dužeg skladištenja uzorke treba zamrznuti ispod – 18 °C ili hemijski konzervirati. Konzerviranje uzoraka zakiseljavanjem se ne preporučuje jer zakiseljeni uzorci mogu biti nestabilni. Ako se uzorci neće analizirati u roku od 24 sata i moraju se duže skladištiti, treba ssprovesti istraživanje stabilnosti u uslovima skladištenja kako bi se dokazala stabilnost hemikalija u pitanju na temperaturama ispod – 18 °C odnosno u uslovima konzerviranja. Ako analitička metoda uključuje ekstrakciju rassupstancaačem ili ekstrakciju čvrste faze (SPE), ekstrakciju treba obaviti neposredno nakon uzorkovanja ili nakon hladnog skladištenja u trajanju od najviše 24 sata.

U zavisnosti od osjetljivosti metode analize, ponekad su potrebni veći volumeni uzoraka od onih koji su navedeni u odjeljku 1.8.1. Ispitivanje se bez problema može obaviti s ispitnim volumenima od jedne litre u bočicama od 2 – 3 litre, što omogućava uzimanje uzoraka od cca 100 ml.

2. Podaci i izvještavanje

2.1. Obrada rezultata

2.1.1. **Grafički prikaz podataka**

Vremena uzorkovanja treba zaokružiti na cijeli broj sati (osim ako se supstanca značajno razgrađuje u nekoliko minuta ili sati), ali ne i na cijeli broj dana. Napravi se linearni i polulogaritamski prikaz procijenjenih vrijednosti preostale aktivnosti ispitivane supstance (za 14 C obilježene supstance) odnosno preostale koncentracije (za neobilježene supstance) u zavisnosti od vremena (slika 1.a i 1.b). Ako je došlo do razgradnje, rezultati bočica F T se uporede s rezultatima bočica F S. Ako se srednje vrijednosti rezultata bočica s ispitivanom supstance (F T) i sterilnih bočica (F S) razlikuju za manje od 10 %, može se pretpostaviti da je zapažena razgradnja pretežito abiotička. Ako je razgradnja u bočicama F S manja, dobijene brojke se mogu upotrijebiti za ispravak rezultata bočica F T (oduzimanjem) i procjenu stepena biorazgradnje. Ako se sprovode fakultativne analize značajnih proizvoda presupstancaanja, osim grafičkog prikaza opadanja ispitivane supstance treba prikazati nastanak i opadanje proizvoda presupstancaanja.

Trajanje faze prilagođavanja t L procijeni se iz krive razgradnje (polulogaritamski prikaz) ekstrapolacijom linearnog dijela krive do nulte razgradnje ili, kao druga mogućnost, određivanjem vremena koje je potrebno da se postigne približno 10 %-tna razgradnja (slika 1.a i 1.b). Iz polulogaritamskoga grafikona procijeni se konstanta brzine prvog reda k i njena standardna greška linearnom regresijom ln (preostala aktivnost 14 C ili koncentracija ispitivane supstance) u zavisnosti od vremena. Kad su u pitanju mjerenja 14 C treba koristiti samo podatke iz početnog linearnog dijela krive po završetku faze prilagođavanja; pritom treba radije odabrati manje reprezentativnih podataka nego veći broj nesigurnijih podataka. U ovom smislu nesigurnost uključuje i greške vezane uz preporučeno direktno korištenje izmjerenih vrijednosti preostale aktivnosti 14 C. Ponekad je relevantno izračunati dvije različite konstante brzine ako se razgradnja odvija u dvije faze. Za to je potrebno definisati dvije različite faze krive razgradnje. Ako se uzimaju uzorci iz iste bočice, konstantu brzine k i vrijeme poluraspada t 1/2 = ln2/k treba izračunati za svaku pojedinačnu bočicu, dok se u slučaju uzorkovanja čitavih bočica za izračun koriste prosječne vrijednosti. Ako se koristi prvi postupak, konstantu brzine i vrijeme poluraspada treba navesti posebno za svaku pojedinačnu bočicu i kao prosječnu vrijednost sa standardnom greškom. Ako se koriste visoke koncentracije ispitivane supstance, kriva razgradnje može znatno odstupati od pravca (polulogaritamski grafikon) i možda neće vrijediti kinetika prvog reda. U tom slučaju nema smisla određivati vrijeme poluraspada. Međutiim, za ograničeni raspon podataka moguće je primijeniti kinetiku pseudoprvog reda i procijeniti vrijeme polurazgradnje DT 50 (vrijeme potrebno da se postigne 50 %-tna razgradnja). Pritom ipak treba imati na umu da na osnovu tog DT 50 nije moguće predvidjeti vremenski tok razgradnje van odabranog raspona podataka jer se radi o vrijednosti koja opisuje samo određeni skup podataka. Analitički alati koji olakšavaju statističke izračune i prilagođavanje krivih su lako dostupni te se stoga preporučuje korištenje takvog softvera. Ako se sprovode specifične hemijske analize, treba procijeniti konstante brzine i vremena poluraspada za primarnu razgradnju na način kako je je gore opisano za ukupnu mineralizaciju.

Ako je primarna razgradnja ograničavajući proces, ponekad se mogu koristiti tačke podataka iz čitavog toka razgradnje. To je stoga što se ovdje sprovode direktna mjerenja za razliku od mjerenja aktivnosti 14 C.

Ako se koriste 14 C obilježene supstance, bilancu mase treba izraziti u postotku primijenjene početne koncentracije barem na kraju ispitivanja.

2.1.2. **Preostala aktivnost**

Kad se 14 C obilježeni dio organske supstance biološki razgrađuje, najveći dio 14 C presupstancaa se u 14 CO 2 , dok se drugi dio troši na rast biomase i/ili sintezu vanćelijskih metabolita. Prema tome, „potpuna‖ biorazgradnja supstance ne rezultira 100 %-tnim presupstancaanjem njenog ugljenika u 14 CO 2 . 14 C ugrađen u proizvode biosinteze kasnije se polako oslobađa kao 14 CO 2 zbog „sekundarne mineralizacije‖ . Iz tog su razloga na grafičkim prikazima preostale aktivnosti organskog 14 C (izmjerene nakon spiranja CO 2) odnosno nastalog 14 CO 2 u zavisnosti od vremena vidljivi „repovi‖ po završetku razgradnje. To komplikuje kinetičko tumačenje podataka i stoga za procjenu konstante brzine razgradnje u pravilu treba koristiti samo početni dio krive (po završetku faze prilagođavanja a prije nego što se postigne približno 50 %-tna razgradnja). Ako se ispitivana supstanca razgrađuje, ukupna preostala aktivnost organskog 14 C je uvijek viša od aktivnosti 14 C povezane s preostalom nepromijenjenom ispitivanom supstancom. Ako se ispitivana supstanca razgrađuje reakcijom prvog reda i ako se stalni udio (α) mineralizuje u CO 2, početni nagib krive nestajanja 14 C (ukupni organski 14 C u vremenu) je α puta nagib odgovarajuće krive za koncentraciju ispitivane supstance (ili tačnije 14 C obilježenog dijela ispitivane supstance). Primjenom neispravljenih vrijednosti mjerenja ukupne aktivnosti organskog 14 C dobija se konzervativna procjena konstante brzine razgradnje.

2.2. Tumačenje rezultata

Ako se utvrdi da je k nezavisan o povećanju koncentracije (tj. ako je izračunani k približno jednak pri različitim koncentracijama ispitivane supstance), može se poći od pretpostavke da je konstanta brzine prvog reda reprezentativna za primijenjene ispitne uslove tj. za ispitivanu supstancu, vodeni uzorak i ispitnu temperaturu. U kojoj se mjeri rezultati mogu uopštiti odnosno ekstrapolisati na druge sisteme treba ocijeniti stručnom procjenom. Ako se koristi visoka koncentracija ispitivane supstance i razgradnja stoga ne slijedi kinetiku prvog reda, podaci se neće moći koristiti za direktnu procjenu konstante brzine prvog reda odnosno odgovarajućeg vremena poluraspada. Ipak, podaci dobijeni u ispitivanju s visokom koncentracijom ispitivane supstance mogu se iskoristiti za procjenu stepena ukupne mineralizacije i/ili utvrđivanje i kvantifikaciju proizvoda presupstancaanje. Ako su poznati gubici u procesima različitim od biorazgradnje (npr. hidroliza ili isparavanje), oni se mogu oduzeti od neto gubitaka utvrđenih tokom ispitivanja kako bi se dobila približna procjena biorazgradnje. Podaci o hidrolizi mogu se dobiti npr. pomoću sterilne kontrole ili iz paralelnog ispitivanja s višom koncentracijom ispitivane supstance.

Nedirektno i direktno određivanje 14 CO 2 (odjeljak 1.8.9.4. i Dodatak 3.) može se koristiti samo za mjerenje stupena mineralizacije ispitivane supstance u CO 2. Radiohromatografija (RAD-TLC) i

HPLC mogu se koristiti za analizu koncentracija 14 C obilježene ispitivane supstance i ssupstancaanja značajnih proizvoda presupstancaanja (odjeljak 1.8.9.4.) Drektna procjena vremena poluraspada moguća je samo ako nisu prisutni značajni proizvodi presupstancaanja

(definisani kao ≥ 10 % primijenjene količine ispitivane supstance). Ako su prisutni značajni proizvodi presupstancaanja u smislu ove definicije, potrebno je detaljno vrednovanje podataka. To može uključivati ponovljeno ispitivanje i/ili utvrĐivanje proizvoda presupstancaanja (odjeljak 1.8.9.5. prvi stav), osim ako se sudbina proizvoda presupstancaanja može prilično dobro odrediti na osnovu iskustva (npr. informacije o putu razgradnje). Budući da udio ugljenika ispitivane supstance koji prelazi u CO 2 nije uvijek jednak (što u velikoj mjeri zavisi od koncentraicije ispitivane supstance i drugih rapoloživih supstrata, ispitnim uslovima i mikrobnoj zajednici), ovaj test ne omogućava direktnu procjenu potpune biorazgradnje kao što je to slučaj kod testa opadanja DOCa, ali rezultat je sličan onome koji se dobije respirometrijskim testom. Stepen mineralizacije će, prema tome biti manji ili jednak minimalnom stepenu potpune biorazgradnje. Da bi se dobila cjelovitija slika potpune biorazgradnje (mineralizacija i ugradnja u biomasu), na kraju ispitivanja treba ssprovesti analizu fazne diobe 14 C (Dodatak 1.). Čestični 14 C sastojat će se od 14 C ugraĐenog u bakterijsku biomasu i 14 C sorbiranog na organske čestice.

2.3. Valjanost ispitivanja

Ako se referentna supstanca ne razgradi u očekivanom vremenskom periodu (za anilin i natrijum benzoat u pravilu manje od dvije nedelje), treba posumnjati u valjanost ispitivanja i ispitivanje podvrgnuti dodatnim provjerama, ili ga ponoviti s novim vodenim uzorkom. U ISO prstenastom testu ove metode prilagoĐene konstante brzine razgradnje za anilin kretale su se između 0,3 i 1,7 dan –1 , prosječno 0,8 dan –1 , pri temperaturi od 20 °C uz standardnu grešku od ± 0,4 d –1 (t 1/2 = 0,9 dana). Uobičajena vremena prilagoĐavanja bila su između 1 i 7 dana. Kod ispitanih voda zabilježena je bakterijska biomasa od 10 3 do 10 4 jedinica koje prave kolonije (Colony Forming Units, CFU) po ml. Brzine razgradnje u srednjoevropskim vodama koje su bogate nutrijentima bile su više nego u nordijskim oligotrofnim vodama, što može biti posljedica razlike u trofičkom stanju ili ranijeg izlaganja hemikalijama.

Kod radioaktivno obilježenih supstance ukupno iskorištenje (bilanca mase) na kraju eksperimenta iznosi između 90 % i 110 %, dok kod neobilježenih supstance početno iskorištenje na početku eksperimenta trebalo biti između 70 % i 110 %. Ipak, navedena područja treba shvatiti kao ciljne vrijednosti i ne treba ih koristiti kao kriterijum za prihvatanje ispitivanja.

3. Izvještaj o ispitivanju

U izvještaju o ispitivanju treba biti jasno navedena vrsta ispitivanja koje se sprovodi – pelagički test ili test sa suspendovanim sedimentom; osim toga, izvještaj o ispitivanju mora sadržavati barem sljedeće informacije:

Ispitivana supstanca i referentna(-e) supstanca(i):

— uobičajeni nazivi, hemijski nazivi (po mogućnosti naziv IUPAC i/ili CAS), CAS brojevi, strukturne formule (uz naznaku položaja 14 C, ako se koristi radioaktivno obilježena supstanca) i relevantna fizičko-hemijska svojstva ispitivane i referentne supstance, — hemijski nazivi, CAS brojevi, strukturne formule (uz naznaku položaja 14 C, ako se koristi radioaktivno obilježena supstanca) i relevantna fizičko-hemijska svojstva supstance

koje se koriste kao standardi za identifikaciju i kvantifikaciju proizvoda pretvorbe,

— čistoća (nečistoće) ispitivanih i referentnih supstanci,

— radiohemijska čistoća obilježene hemikalije i specifična aktivnost (prema potrebi).

Površinska voda:

Za vodeni uzorak treba navesti barem sljedeće podatke:

— lokacija i opis mjesta uzorkovanja uključujući, po mogućnosti, istoriju zagaĐenja,
— datum i vrijeme uzimanja uzorka,
— nutrijenti (ukupni N, amonijum, nitriti, nitrati, ukupni P, rasi ortofosfat),
— dubina uzorkovanja,
— izgled uzorka (npr. boja, mutnoća),
— DOC i TOC,
— BPK,
— temperatura i pH na mjestu uzorkovanja u vrijeme uzorkovanja,
— kisenični ili redoks potencijal (obavezno samo ako aerobni uslovi nisu očiti),
— salinitet ili provodljivost (u slučaju morske vode),
— suspendovana čvrsta supstanca (u slučaju mutnog uzorka),
— po mogućnosti i druge relevantne informacije o mjestu uzorkovanja u trenutku uzorkovanja (npr. aktualni ili istorijski podaci o brzini protoka rijeka ili morskih struja, značajnija ispuštanja otpadnih voda u blizini i vrsta otpadnih voda, vremenski uslovi prije uzorkovanja), i fakultativno:
— mikrobna biomasa (npr. direktno brojenje tehnikom bojenja akridinskom bojama ili jedinice koje prave kolonije),
— neorganski ugljenik,
— koncentracija hlorofila kao specifična procjena biomase algi.

Ako se sprovodi test sa suspendovanim sedimentom, treba navesti i sljedeće podatke o sedimentu:

— dubina uzorkovanja sedimenta,
— izgled sedimenta (npr. obojen, muljevit, praškast, pjeskovit),
— tekstura (npr. % krupnog pijeska, finog pijeska, praha i ilovače),
— suva masa u g/l suspendovane čvrste supstance, koncentracija TOC-a ili gubitak mase nakon zapaljenja kao mjera sadržaja organske supstance, — pH,

— kiseonik ili redoks potencijal (obavezno samo ako aerobni uslovi nisu očiti). Ispitni uslovi:
— vremenski razmak između uzorkovanja i upotrebe u laboratorijaskom ispitivanju, skladištenje uzorka i prethodna obrada uzorka, datumi ssprovođenja istraživanja,
— primijenjena količina ispitivane supstance, ispitna koncentracija i referentna supstanca,
— način primjene ispitivane supstance, uključujući upotrebu rassupstancaača (prema potrebi), — volumen upotrijebljene površinske vode i sedimenta (ako se koristi) i volumen uzorka koji se uzima na analizu u svakom vremenu uzorkovanja, — opis ispitnog sistema koji se koristi.

Ako se ispitivanje ne može ssprovesti u mraku, informacije o uslovima „difuzne rasvjete‖ :
— informacije o metodi(-ama) koje su upotrijebljene za pripremu sterilnih kontrola (npr. temperatura, vrijeme i broj obrada u autoklavu),
— temperatura inkubacije,
— informacije o analitičkim tehnikama i metodi(-ama) koje se koriste za radiohemijska mjerenja i provjeru bilance mase te mjerenja fazne diobe (ako se sprovode),
— broj ponavljanja. Rezultati:
— postotak iskorištenja (odjeljak 1.7.1.),
— ponovljivost i osjetljivost primijenjenih analitičkih metoda, uključujući granicu detekcije (LOD) i granicu kvantifikacije (LOQ) (odjeljak 1.7.2.),
— prikaz svih izmjerenih podataka (uključujući vremena uzorkovanja) i izračunanih vrijednosti u tabličnom obliku i krive razgradnje; za svaku ispitnu koncentraciju i svako ponavljanje treba navesti koeficijent linearne korelacije za nagib logaritamskog grafikona,

procijenjenu fazu prilagoĐavanja i konstantu brzine prvog reda ili pseudoprvog reda (po mogućnosti) te odgovarajuće vrijeme polurazgradnje (odnosno vrijeme poluraspada t 50),
— prosjeci rezultata pojedinačnih ponavljanja za odgovarajuće vrijednosti, npr. dužina faze prilagoĐavanja, konstanta brzine razgradnje i vrijeme polurazgradnje (ili t 50),
— kategorizovati sistem kao neprilagoĐeni sistem ili prilagoĐeni sistem s obzirom na izgled krive razgradnje i mogući utjicaj koncentracije koja se ispituje,
— rezultati završne provjere bilance mase i rezultati mjerenja fazne diobe (prema potrebi),
— udio mineraliziranog 14 C i, ako se koriste specifične analize, konačni nivo primarne razgradnje, — utvrĐivanje, molarna koncentracija i postotak primijenjene koncentracije i značajnih proizvoda presupstancaanja (prema potrebi) (odjeljak 1.8.9.5),
— predloženi put presupstancaanja, prema potrebi, — rasprava rezultata.

Dodatak 1.

Fazna dioba 14 C

U svrhu provjere postupka, rutinska mjerenja aktivnosti preostalog ukupnog organskog 14 C (TOA) treba nadopuniti mjerenjima bilance mase sa direktnim određivanjem nastalog 14 CO 2 koji se skuplja u apsorberu (Dodatak 3.). Presupstancaanje nastanka 14 CO 2 sama je po sebi direktan dokaz biorazgradnje, za razliku od abiotičke razgradnje i drugih mehanizama gubitaka, kao što je isparavanje ili sorpcija. Dodatne informacije koje mogu biti korisne za opisivanje procesa biorazgradnje mogu se dobiti mjerenjem diobe TOA između rastvorenog stanja (aktivnost rastvorenog organskog 14 C, DOA) i čestičnog stanja (aktivnost čestičnog organskog 14 C, POA) nakon odvajanja čestica membranskom filtracijom ili centrifugiranjem. POA se sastoji od ispitivane supstance sorbirane na mikrobnu biomasu i druge čestice i od ugljenika sadržanog u ispitivanoj supstanci koji se koristi za sintezu novog ćelijskog materijala i tako ugrađuje u čestičnu frakciju biomase. Nastanak rastvorenog organskog 14 C materijala može se procijeniti kao DOA na kraju biorazgradnje (plato krive razgradnje u zavisnosti od vremenu).

Faznu diobu preostalog 14 C u odabranim uzorcima treba procijeniti filtriranjem uzoraka na membranskom filtru 0,22 µm ili 0,45 µm izraĐenom od materijala koji ne adsorbuje značajne količine ispitivane supstance (npr. polikarbonatni filteri). Ako dolazi do znatne sorpcije ispitivane supstance na filter koja se ne može zanemariti (ovo treba provjeriti prije eksperimenta), umjesto filtriranja se može koristiti centrifugiranje pri velikoj brzini (2 000 g; 10 min).

S filtratom odnosno centrifugatom se postupa kao s nefiltriranim uzorcima iz Dodatka 3. Membranski se filteri rastvoraju u prikladnoj scintilacionoj tečnosti i broji na uobičajeni način, u pravilu uz ispravak gašenja („quenching‖) primjenom poljašnjeg standarda („external standard ratio method‖), ili se upotrijebi oksidacijsko sredstvo za uzorak. Ako se koristi centrifugiranje, nastalu peletu čestične frakcije treba resuspendovane u 1 – 2 ml destilovane vode i prenijeti u scintilacijsku bočicu. Zatim se posuda dvaput ispere s 1 ml destilovane vode i voda od pranja prenese u bočicu. Suspenzija se prije brojenja metodom tečne scintilacije može prema potrebi obložiti gelom.

Dodatak 2.

Polukontinuirani postupak

U slučaju postojanih supstanci ponekad je potrebno produžiti vrijeme inkubacije i do nekoliko mjeseci da bi se postigla dodatna razgradnja. Ispitivanje ne bi smjelo trajati duže od 60 dana, osim ako se ispitna suspenzija obnavlja kako bi se održala izvorna svojstva vodenog uzorka. Ipak, trajanje ispitivanja se može produžiti do najviše 90 dana i bez obnavljanja ispitne suspenzije ako je razgradnja ispitivane supstance započela unutar prvih 60 dana.

Kod dugotrajnije inkubacije raznolikost mikrobne zajednice može se smanjiti zbog različitih mehanizama gubitaka i mogućeg iscrpljenja zaliha esencijalnih nutrijenata i primarnih ugljenikovih supstrata u vodenom uzorku. Stoga se kod supstance koje se sporo razgrađuju preporučuje primjena polukontinuiranog postupka kako bi se mogla pravilno odrediti brzina razgradnje.

Ispitivanje treba započeti u polukontinuiranom postupku ako se na osnovu ranijih iskustava očekuje da će za 20 %-tnu razgradnju supstance biti potrebno period inkubacije od tri mjeseca.

Druga je mogućnost da se uobičajeni šaržni test pretvori u polukontinuirani ako tokom približno 60 dana ispitivanja šaržnim postupkom nije došlo do razgradnje ispitivane supstance. Polukontinuirani postupak se može prekinuti i ispitivanje nastaviti šaržnim postupkom kad se zabilježi značajna razgradnja (npr. > 20 %).

U polukontinuiranom postupku se svake dvije nedelje otprilike jedna trećina volumena ispitne suspenzije zamjenjuje svježe prikupljenom vodom u koju je dodata ispitivana supstanca u početnoj koncentraciji. Ako se koristi fakultativni test sa suspendovanim sedimentom, zamjenskoj vodi treba dodati i sediment u početnoj koncentraciji (između 0,01 i 1 g/l). Važno je naglasiti da se u slučaju ssprovođenja testa sa suspendovanim česticama sedimenta sistem mora održavati u potpunoj suspenziji i tokom obnavljanja vode te da vrijeme zadržavanja mora biti jednako za čvrste supstance i vodu, jer se u protivnom gubi predviđena sličnost s homogenim vodenim sistemom bez čvrstih faza. Stoga je kod primjene polukontinuiranog postupka poželjno da se početna koncentracija suspendovanog sedimenta odabere iz donjeg segmenta utvrđenog područja.

Ispitivana se supstanca mora dodavati tako da kod djelimičnog obnavljanja ispitne suspenzije ne dođe do prekoračenja početne koncentracije ispitivane supstance kako bi se izbjeglo prilagođavanje koja se često javlja pri visokim koncentracijama ispitivane supstance. Budući da postupak uključuje i ponovnu inokulaciju i nadoknađivanje potrošenih nutrijenata i primarnih supstrata, izvorna mikrobna raznolikost se ponovno uspostavlja i ispitivanje se teoretski može nastavljati beskonačno. Kod polukontinuiranog postupka važno je napomenuti da se preostala koncentracija ispitivane supstance mora ispraviti s obzirom na količine ispitivane supstance koje se dodaju i uklanjaju u svakom postupku obnavljanja. Ukupna koncentracija ispitivane supstance i koncentracija rastvorene ispitivane supstance mogu se naizmjenično koristiti u slučaju jedinjenja kod kojih se ne dolazi do znatnije sorpcije. Sorpcija je u utvrđenim uslovima (0,1 – 1 g čvrste supstance/l) beznačajna (< 5 %) kod supstance s log Kow < 3 (vrijedi za neutralne, lipofilna jedinjenja). To se može vidjeti i na računskom primjeru u nastavku. 0,1 g/l čvrste supstance otprilike odgovara 10 mg ugljenika po litri (udio ugljenika f C = 0,01). Pretpostavimo da je: Log K ow (ispitivane supstance) =3, K oc = 0,42 × K ow, podioni koeficijent K d = f C × K oc, tada je rastvorena frakcija ukupne koncentracije (C-voda (C w)/C-ukupni (C t)):

$$\frac{C_W}{C_t} = \frac{1}{1 + K_d \times SS} = \frac{1}{1 + K_{oc} \times fC \times SS} = \frac{1}{1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}} = 0{,}999$$

Dodatak 3.

Određivanje 14 CO 2

Nedirektno određivanje 14 CO 2

Nedirektna metoda kod rutinskih mjerenja u pravilu zahtijeva manje vremena, a usto je i najpreciznija u slučaju supstance koje nisu isparive i ne prelaze u isparive proizvode. Nefiltrirani uzorci od npr. 5 ml jednostavno se prenesu u scintilacijske bočice. Prikladna početna aktivnost u uzorcima je 5 000 dpm – 10 000 dpm (80 – 170 Bq), a minimalna početna aktivnost iznosi oko 1 000 dpm. CO 2 se spira nakon zakiseljavanja na pH 2 – 3 s 1 – 2 kapi koncentrirane H 3 PO 4 ili HCl. Spiranje CO 2 može se ssprovesti ubacivanjem mjehurića vazduha oko ½ do 1 sata. Kao druga mogućnost, bočice se snažno protresaju 1 – 2 sata (npr. na mješalici s mikropločama) ili se uz lakše protresanje ostave na mješalici preko noći. Efikasnost postupka odvajanja CO 2 treba provjeriti (produženjem vremena dozračivanja ili miješanja). Zatim se doda scintilaciona tečnost prikladna za brojenje vodenih uzoraka, uzorak se homogenizuje na vrtložnoj mješalici i odredi radioaktivnost brojenjem metodom tečne scintilacije te oduzme osnovna aktivnost utvrĐena u slijepim probama (F B). Ako ispitna voda nije jako obojena i ne sadrži visoku koncentraciju čestica, uzorci će u pravilu pokazivati ujednačeno gašenje („quenching‖) i bit će dovoljno ssprovesti ispravke za gašenje primjenom poljašnih standarda. Ako je ispitna voda jako obojena, ispravak za gašenje se ponekad mora ssprovesti dodavanjem unutarašnjeg standarda. U slučaju visoke koncentracije čestica nije uvijek moguće dobiti homogeni rastvor odnosno gel, ili se mogu javiti velike razlike u gašenju meĐu uzorcima. U tom se slučaju na ispitni mulj može primijeniti metoda brojenja opisana u nastavku. Ako se koristi test sa suspendovanim sedimentom, mjerenje 14 CO 2 može se ssprovesti nedirektno tako da se uzme homogeni uzorak ispitne vode/suspenzije od 10 ml i faze odvoje centrifugiranjem na prikladnoj brzini (npr. 15 minuta na 40 000 m/s 2). Zatim se s vodenom fazom postupa kako je gore opisano. Aktivnost 14 C u čestičnoj fazi (POA) određuje se tako da se sediment resuspenduje u malom volumenu destilovane vode, prenese u scintilacione bočice i zatim doda scintilaciona tečnost da bi se dobio gel (za ovo su predviĐene posebne scintilacione tečnosti). U zavisnosti od vrsta čestica (npr. sadržaj organskog materijala), uzorak se eventualno može ostaviti preko noći da se rastvori u sredstvu za rastvaranje tkiva, zatim homogenizovati na vrtložnoj mješalici i onda dodati scintilacionu tečnost. Druga je mogućnost da se POA odredi sagorijevanjem viška kiseonika pomoću oksidacionog sredstva. Kod brojenja treba uvijek uključiti unutrašnje standarde, a ispravke za gašenje ponekad je potrebno napraviti dodavanjem unutrašnjeg standarda u svaki pojedini uzorak.

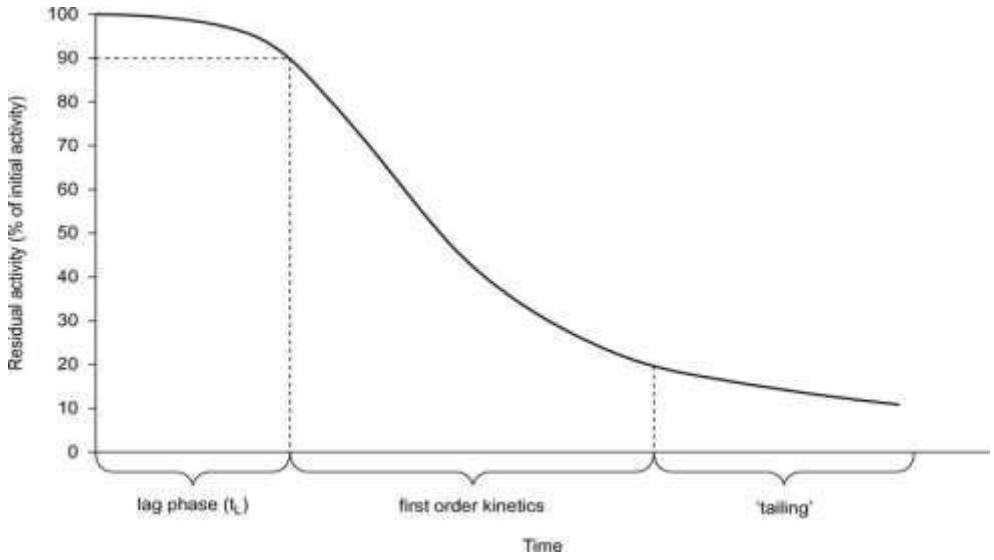
Direktno određivanje 14 CO 2

Ako se nastali 14 CO 2 mjeri direktno, na početku ispitivanja treba pripremiti više ispitnih bočica i u

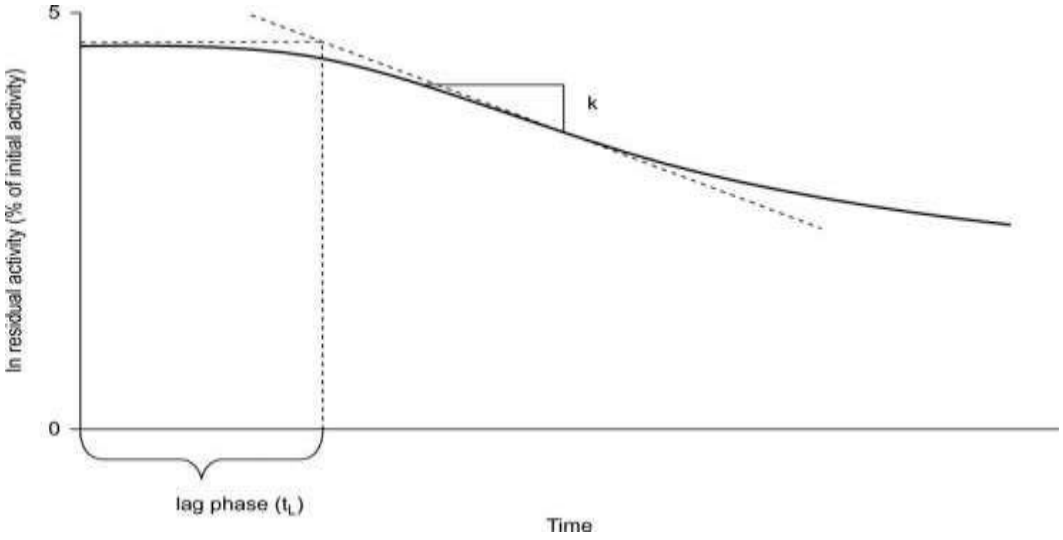
svakoj mjernoj tački uzimati čitave bočice, zakiseliti na pH 2 – 3 i skupljati 14 CO 2 u unutrašnjem apsorberu (koji se stavlja u svaku ispitnu bočicu na početku ispitivanja) ili poljašnjem apsorberu. Kao apsorpciono sredstvo može se koristiti alkalna supstanca (npr. rastvor 1 N NaOH ili peleta

NaOH), etanolamin ili apsorberi na bazi etanolamina koji su dostupni na tržištu. Kod direktnog mjerenja 14 CO 2 bočice moraju biti zatvorene npr. Zasupstancaačima od butilne gume.

Slika 1.a Primjer aritmetičkog prikaza podataka (preostala aktivnost u u zavisnostisti o vremenu)



Slika 1.b **Primjer polulogaritamskog prikaza podataka (ln preostale aktivnosti u u zavisnostisti o vremenu)**



1 Uvod

Ova metoda ispitivanja ekvivalentna je smjernici OECD-a za ispitivanje (OECD Test Guideline) (TG) 221. Namijenjena je za procjenjivanje toksičnosti hemikalija za slatkovodne morske biljke roda *Lemna* (sočivica). Zasniva se na postojećim metodama, ali uključuje izmjene tih metoda kako bi se uzela u obzir najnovija istraživanja i savjetovanja o nizu ključnih pitanja. Ova metoda ispitivanja potvrđena je u međulaboratorijskom uporednom ispitivanju.

Ova metoda ispitivanja opisuje ispitivanje toksičnosti sa vrstama *Lemna gibba* i *Lemna minor* koje su obje detaljno proučavane i predmet su gore pomenutih standarda. Taksonomija vrsta *Lemna* je složena, zbog postojanja širokog spektra fenotipova. Iako se kod vrsta *Lemna* može javiti genetska varijabilnost u odgovoru na toksikante, trenutno ne

postoji dovoljno podataka o tom izvoru varijabilosti da bi se preporučio neki poseban klon koji bi se koristio u ovoj metodi ispitivanja. Treba napomenuti da se ispitivanje ne sprovodi aksenično, ali se preduzimaju određeni koraci u nekim fazama postupka ispitivanja kako bi se kontaminacija drugim organizmima držala na najmanjem mogućem nivou.

Opisani su detalji o ispitivanju sa obnavljanjem (polustatičko i protočno) i bez obnavljanja (statičko) ispitnog rastvora. U zavisnosti od ciljeva ispitivanja i regulatornih zahtjeva, preporučuje se da se razmotri primjena polustatičkih i protočnih metoda, npr. za hemikalije koje se brzo gube iz rastvora zbog isparavanja, fotorazgradnje, taloženja ili biorazgradnje. Korišćene definicije date su u Dodatku 1.

1.1. Načelo ispitivanja

Biljne kulture sa eksponencijalnim rastom roda *Lemna* puste se da rastu kao monokulture u različitim koncentracijama hemikalije koja se ispituje u periodu od sedam dana. Cilj ispitivanja je da se izvrši kvantifikacija efekata hemikalije na vegetativni rast u tom periodu na osnovu procjena izabranih varijabli mjerenja. Broj listova je primarna varijabla mjerenja. TakoĐe se mjeri najmanje još jedna varijabla mjerenja (ukupna površina lista, suva masa ili svježa masa), pošto neke hemikalije mogu uticati na druge varijable mjerenja mnogo više nego na broj listova. Da bi se kvantifikovali efekti povezani sa hemikalijom, rast u ispitnim rastvorima upoređuje se sa rastom u kontrolisanim grupama, a koncentracija koja dovodi do nekog određenog procenta (x%) inhibicije rasta (npr. 50%) određuje se i iskazuje kao EC_x (npr. EC_{50}).

Parametar praćenja u ispitivanju je inhibicija rasta, izražena kao logaritamsko povećanje varijable mjerenja (prosječna specifična stopa rasta) u toku perioda izloženosti. Iz prosječnih specifičnih stopa rasta zabilježenih u nizu ispitnih rastvora određuje se koncetracija koja izaziva neku određenu (x%) inhibiciju stope rasta (npr. 50%) i iskazuje se kao E_rC_x (npr. E_rC_{50}).

Dodatna varijabla odgovora koja se koristi u ovoj metodi ispitivanja je prirast, koji je nekada potreban radi ispunjavanja određenih regulatornih zahtjeva nekih zemalja. Definiše se kao varijable mjerenja na kraju perioda izloženosti umanjene za varijable mjerenja na početku perioda izloženosti. Iz prirasta zabilježenog u nizu ispitnih rastvora računa se koncentracija koja izaziva neki određeni procenat (x%) inhibicije prirasta (npr. 50%) i iskazuje kao E_yC_x (npr. E_yC_{50}). Uz to se može statistički odrediti najniža koncentracija sa vidljivim efektom (LOEC) i najveća koncentracija bez vidljivog efekta (NOEC).

Informacije o hemikaliji koja se ispituje

Potrebno je imati na rapolaganju analitičku metodu dovoljne osjetljivosti za kvantifikaciju hemikalije u medijumumu za ispitivanje.

U informacije o hemikaliji koja se ispituje, a koje mogu biti korisne za utvrĐivanje uslova ispitivanja, spadaju strukturna formula, čistoća, rastvorljivost u vodi, postojanost u vodi i na svjetlosti, pK_a, K_{ow}, pritisak pare i biorazgradljivost. Rastvorljivost u vodi i pritisak pare mogu se upotrijebiti za iizračunavanje Henrijeve konstante, na osnovu koje se može zaključiti da li se u toku perioda ispitivanja mogu očekivati značajni gubici hemikalije koja se ispituje. Uz pomoć toga se utvrđuje da li treba preduzeti posebne mjere za kontrolisanje tih gubitaka.Ako su informacije o rastvorljivosti i postojanosti hemikalije koja se ispituje nepouzdane, preporučuje se da se rastvorljivost i postojanost hemikalije koja se ispituje ocijene u uslovima ispitivanja, tj. u medijumumu za rast, na temperaturi i u režimu osvjetljenja koji će se koristiti u ispitivanju.

Kada je kontrolisanje pH vrijednosti medijumuma za ispitvanje od naročite važnosti, npr. prilikom ispitivanja metala ili hemikalija koje su hidrolitički nestabilne, preporučuje se dodavanje pufera u medijumum za rast.

1.2. Validnost ispitivanja Da bi ispitivanje bilo validno, vrijeme potrebno za udvostručavanje broja listova u kontrolnoj grupi mora biti kraće od 2,5 dana (60 sati), što otprilike odgovara sedmostrukom povećanju u sedam dana i prosječnoj specifičnoj stopi rasta od 0,275 d^{-1}. Uz korišćenje medijumuma i pod uslovima ispitivanja opisanim u ovoj metodi ispitivanja, ovaj kriterijum se može postići upotrebom statičkog režima (5). TakoĐe je predviĐeno da će se ovaj kriterijum moći postići u uslovima polustatičkog i protočnog režima ispitivanja. Proračun vremena potrebnog za udvostručavanje prikazan niže.

1.3. Referentna hemikalija

Referentna hemikalija odnosno hemikalije, kao što je 3,5-dihlorofenol korišćen u meĐulaboratorijaskom uporednom ispitivanju, mogu se testirati kao sredstvo za provjeravanje postupka ispitivanja. Savjetuje se ispitivanje neke referentne hemikalije najmanje dvaput godišnje ili, ako se ispitivanje vrši rjeĐe, uporedo sa određivanjem toksičnosti hemikalije koja se ispituje.

2. Opis metode

2.1. Aparatura

Sva oprema koja dolazi u kontakt sa medijumumima za ispitivanje treba da bude napravljena od stakla ili drugog hemijski inertnog materijala. Staklenu opremu koja se korisiti u svrhe uzgoja i ispitivanja treba očistiti od hemijskih kontaminanata koji bi mogli dospjeti u medijumum za ispitivanje i treba da bude sterilna. Ispitne posude treba da budu dovoljno široke da listovi različitih kolonija u kontrolisanim posudama mogu rasti tako da na kraju ispitivanja ne bude meĐusobnog preklapanja. Nije važno ako korjenje dodiruje dno ispitne posude, ali se savjetuje da svaka posuda bude dubine od najmanje 20 mm i zapremine od najmanje 100 ml. Izbor ispitnih posuda nije od presudne važnosti sve dok su ovi zahtjevi zadovoljeni. Staklene laboratorijaske čaše, zdjele za kristalizaciju ili staklene petrijeve šolje odgovarajućih dimenzija pokazali su se prikladnim. Ispitne posude moraju se pokriti kako bi se isparavanje i slučajna kontaminacija sveli na najmanju moguću mjeru, ali tako da se omogući neophodni protok vazduha. Odgovarajućim ispitnim posudama, a naročito poklopcima, mora se izbjeći zasjenjivanje ili mijenjanje spektralnih karakteristika svjetlosti.

Kulture i ispitne posude ne treba držati zajedno. To se najbolje postiže korišćenjem odvojenih komora za rast, inkubatora ili prostorija. Osvjetljenje i temperatura moraju biti podesivi i moraju se održavati na konstantnom nivou.

2.2. Ispitni organizam

Organizam koji se koristi za ovo ispitivanje je *Lemna gibba* ili *Lemna minor*. Organizam koji se koristi za ovo ispitivanje je *Lemna gibba* ili *Lemna minor*. U Dodatku 2 dati su kratki opisi vrsta sočivice koje su korišćene za ispitivanje toksičnosti. Biljni materijal može se dobiti iz zbirke kultura, od druge laboratorijae ili sa terena. Ako su sakupljene na terenu, prije upotrebe biljke treba držati u kulturi u istom medijumumu kao što je onaj koji se koristi za ispitivanje i to najmanje osam sedmica. Na terenskim lokacijama na kojima su sakupljene početne kulture ne smije biti očiglednih izvora kontaminacije. Ako su dobijene od druge laboratorijae ili iz zbirke kultura, treba ih na sličan način držati najmanje tri sedmice. Izvor biljnog materijala, kao i vrste i klon (ako je poznat) koji su korišćeni za ispitivanje treba uvijek navesti.

Treba koristiti monokulture kod kojih nema vidljive kontaminacije drugim organizmima kao što su alge i protozoe. Zdrave biljke vrste *L. minor* sastoje se od kolonija koje sadrže dva do pet listova, dok zdrave kolonije vrste *L. gibba* mogu sadržati do sedam listova.

Kvalitet i jednoobraznost biljki korišćenih za ispitivanje imaće značajan uticaj na ishod ispitivanja, pa ih stoga treba pažljivo birati. Treba koristiti mlade, brzorastuće biljke bez vidljivih lezija ili promjena boje (hloroze). Kvalitetne kulture prepoznaju se po velikoj zastupljenosti kolonija koje sadrže najmanje dva lista. Veliki broj kolonija sa jednim listom ukazuje na stres usljed uslova životne sredine, npr. ograničenja u pogledu nutrijenata, pa biljni materijal iz takvih kultura ne treba koristiti za ispitivanje.

2.3. Uzgoj

Da bi se smanjila potreba za održavanjem kulture (npr. kada u određenom periodu nijesu planirana ispitivanja na vrstama *Lemna*), kulture se mogu držati u uslovima smanjenog osvjetljenja i temperature (4 — 10 °C). Podrobniji podaci o uzgoju dati su u Dodatku 3. Očigledni znaci kontaminacije algama ili drugim organizmima mogu iziskivati vršenje površinske sterilizacije poduzorka listova *Lemna*, nakon čega se poduzorak prebacuje u svjež medijumum (Dodatak 3). U takvom slučaju se ostatak kontaminirane kulture baca.

Dovoljan broj kolonija aseptički se prebacuje u svježi sterilni medijumum najmanje sedam dana prije ispitivanja, a potom se u uslovima ispitivanja uzgajaju 7-10 dana.

Medijumum za ispitivanje Za vrste *Lemna minor* i *Lemna gibba* preporučuju se različiti medijumumi, kako je opisano u tekstu koji slijedi. Potrebno je dobro razmisliti prije nego što se pH pufer doda u medijumum za ispitivanje (MOPS (4-morfolinpropan sulfonična kiselina, CAS broj: 1132-61-2) u medijumum za *L. minor* i $NaHCO_3$ u medijumum za *L. gibba*) ako se sumnja da bi pufer mogao reagovati sa hemikalijom koja se ispituje i uticati na iskazivanje njene toksičnosti. Štajnbergov (Steinberg) medijumum je takođe prihvatljiv sve dok su ispunjeni kriterijumi validnosti.

Za uzgoj *L. minor* i ispitivanja s tom vrstom preporučuje se modifikovani medijumum za rast *Lemna* prema švedskom standard (SIS). Sastav tog medijumuma naveden je u Dodatku 4.

Medijumum za rast, 20X — AAP, opisan u Dodatku 4, preporučuje se za uzgajanje *L. gibba* i ispitivanja s tom vrstom.

Štajnbergov (Steinberg) medijumum, opisan u Dodatku 4, takođe je pogodan za *L. minor*, ali se takođe može koristiti za *L. gibba* sve dok su ispunjeni kriterijumi validnosti.

2.4. Ispitni rastvori

Ispitni rastvori obično se pripremaju razblaživanjem osnovnog rastvora. Osnovni rastvori hemikalije koja se ispituje obično se pripremaju rastvaranjem hemikalije u medijumumu za rast.

Najveća ispitivana koncentracija hemikalije koja se ispituje ne bi trebalo da bude veća od rastvorljivosti te hemikalije u vodi u uslovima ispitivanja. Treba, međutiim, napomenuti da vrste *Lemna* plutaju na površini, pa mogu biti izložene hemikalijama koje se skupljaju na dodirnoj površini vode i vazduha (npr. hemikalijama koje su slabo rastvorljive u vodi, hidrofobičnim hemikalijama ili površinski aktivnim hemikalijama). U takvim okolnostima, izloženost potiče od materijala koji nije u rastvoru, pa ispitne koncentracije mogu biti veće od rastvorljivosti u vodi, u zavisnosti od karakteristika hemikalije koja se ispituje. Za hemikalije koje se ispituju a koje su slabo rastvorljive u vodi može biti neophodno da se pripremi koncentrisani osnovni rastvor ili disperziju hemikalije uz pomoć organskog rassupstancaača ili sredstva za dispergovanje, kako bi se olakšalo dodavanje preciznih količina hemikalije

koja se ispituje u ispitni medijumum i potpomogla njena disperzija i rastvaranje. Ipak, potrebno je učiniti sve da se izbjegne upotreba takvih materijala. Ne bi smjelo doći do fitotoksičnosti kao posljedice upotrebe pomoćnih rassupstancaača ili sredstava za dispergovanje. Na primjer, u najčešće upotrebljavane rassupstancaače koji nemaju fititoksično dejstvo u koncentracijama do 100 µl/l spadaju aceton i dimetilformamid. Ako se kositi rassupstancaač ili sredstvo za dispergovanje, potrebno je navesti njegovu njegovu konačnu koncentraciju i održavati je na najmanjem mogućem nivou (≤ 100 µl/l), a sve tretirane i kontrolne grupe treba da sadrže istu koncentraciju rastvora ili sredstva za dispergovanje.

Ispitne i kontrolne grupe Prethodno poznavanje toksičnosti hemikalije koja se ispituje za vrste *Lemna*, npr. na osnovu testa za određivanje raspona, pomaže pri izboru odgovarajućih ispitnih koncentracija. U glavnom ispitivanju toksičnosti treba po pravilu koristiti najmanje pet ispitnih koncentracija, poreĐanih u geometrijskom nizu. Poželjno je da koeficijent separacije između ispitnih koncentracija ne bude veći od 3,2, ali se mogu koristiti i veće vrijednosti ako je kriva koncentracija-odgovor ravna. Potrebno je dati obrazloženje ako se koristi manje od pet koncentracija. Za svaku ispitnu koncentraciju koriste se najmanje tri ponavljanja.

8 Prilikom utvrĐivanja raspona ispitnih koncentracija (za test za određivanje raspona i/ili za glavno ispitivanje toksičnosti) potrebno je uzeti u obzir sljedeće:

— Da bi se odredila EC_x, ispitne koncentracije treba da obuhvate vrijednost EC_x kako bi se obezbijedio odgovarajući nivo pouzdanosti. Na primjer, ako se procjenjuje EC_{50}, najveća ispitna koncentracija treba da bude veća od vrijednosti EC_{50}. Ako vrijednost EC_{50} leži izvan raspona ispitnih koncentracija, intervali pouzdanosti povezani s tom vrijednošću biće veliki, pa možda neće biti moguće na odgovarajući način ocijeniti statističku prikladnost modela.

— Ako je cilj da se procijeni LOEC/NOEC, najniža ispitna koncentracija treba da bude dovoljno niska da rast ne bude značajno manji nego u kontrolnoj grupi. Uz to, najviša ispitna koncentracija treba da bude dovoljno visoka da rast bude značajno manji nego u kontrolnoj grupi. Ako to nije slučaj, ispitivanje će se morati ponoviti uz korišćenje drugačijeg raspona koncentracija (izuzev ako je najviša koncentracija na granici rastvorljivosti ili je jednaka

maksimalnoj predviĐenoj graničnoj koncentraciji, npr. 100 mg/l).

Svako ispitivanje treba da sadrži kontrolne grupe koje se sastoje od istog hranljivog medijumuma, broja listova i kolonija, sa istim uslovima očvrstenja i na koje se primjenjuju isti postupci kao kod ispitnih posuda, ali bez hemikalije koja se ispituje. Ako se koristi pomoćni rassupstancaač ili sredstvo za dispergovanje, i kontrolnu grupu treba dodatno tretirati rassupstancaačem/sredstvom za dispergovanje u istoj koncentraciji kao u posudama sa hemikalijom koja se ispituje. Broj ponavljanja posuda kontrolne grupe (i posuda rassupstancaača, ako je primjenljivo) treba da bude najmanje jednak broju posuda korišćenih za svaku ispitnu koncenraciju, a u idealnom slučaju treba da bude dvostruko veći.

Ako određivanje NOEC nije potrebno, plan ispitivanja može se izmijeniti tako da se poveća broj koncentracija i smanji broj ponavljanja po koncentraciji. Međutiim, broj ponavljanja u kontrolnoj grupi mora iznositi najmanje tri.

2.7. Izlaganje Kolonije koje se sastoje od 2 do 4 vidljiva lista prebacuju se iz culture inokuluma i nasumično raspodijele u ispitne posude u aseptičnim uslovima. Svaka ispitna posuda treba da sadrži ukupno 9 do 12 listova. Broj listova i kolonija treba da bude isti u svakoj ispitnoj posudi. Na osnovu iskustva stečenog u primjeni ove metode i na osnovu podataka iz meĐulaboratorijaskih uporednih ispitivanja došlo se do zaključka da je dovoljno upotrijebiti tri ponavljanja po tretmanu, pri čemu svako ponavljanje na početku sadrži 9 do

12 listova, da bi se između različito tretiranih grupa uočile razlike u rastu na nivou od oko 4 do 7% inhibicije kada se računa na osnovu stope rasta (10 do 15% kada se računa na osnovu prinosa).

U inkubatoru se ispitne posude raspoređuju nasumično, kako bi se uticaj razlika u intenzitetu svjetlosti i temperaturi zbog položaja u prostoru sveo na najmanju moguću mjeru. TakoĐe je potrebno primijeniti blok sistem ili nasumično premještati posude prilikom vršenja posmatranja (ili ih premještati još češće).

Ako preliminarno ispitivanje postojanosti pokaže da se za vrijeme trajajnja ispitivanja (7 dana) koncentracija hemikalije koja se ispituje ne može održati (npr. izmjerena koncentracija pada ispod 80% izmjerene početne koncentracije), preporučuje se primjena polustatičkog režima. U tom slučaju kolonije treba izložiti djelovanju svježe pripremljenih ispitnih i kontrolnih rastvora i to najmanje dvaput u toku ispitivanja (npr. trećeg i petog dana). Učestalost izlaganja svježem medijumumu zavisiće od postojanosti hemikalije koja se ispituje; kod veoma nepostojanih ili isparljivih hemikalija može biti potrebno češće izlaganje svježem medijumumu kako bi se održale približno konstante koncentracije. U nekim okolnostima može biti potrebna primjena protočnog postupka. Ova metoda ispitivanja ne obuhvata scenario izlaganja putem folijarne primjene (raspršivač).

2.8. Uslovi inkubacije

Potrebno je koristiti neprekidno toplo ili hladno bijelo fluorescentno osvjetljenje da bi se obezbijedila svjetlost intenziteta izabranog iz opsega 85-135 $\mu E \cdot m^{-2}s^{-1}$ mjereno u zoni fotosintetički aktivnog zračenja (400-700 nm) na tačkama koje su na istoj udaljenosti od izvora svjetlosti kao i listovi *Lemna* (što je ekvivalentno 6 500-10 000 luksa). Eventualna odstepena u zoni ispitivanja u odnosu na izabrani intenzitet svjetlosti moraju biti u granicama od ± 15 %. Na izmjerenu vrijednost uticaće metoda detekcije i mjerenja svjetlosti, naročito vrsta senzora. Sferični snezori (koji reaguju na svjetlost koja dolazi iz svih uglova iznad i ispod ravni mjerenja) i „kosinusni senzori‖ (koji reaguju na svjetlost koja dolazi iz svih uglova iznad ravni mjerenja) bolji su izbor od jednosmjernih senzora i daju veća očitavanja za višestruki izvor svjetlosti ovdje opisanog tipa. Temperatura u ispitnim posudama treba da iznosi 24 ± 2 °C. U toku ispitivanja, pH vrijednost kontrolnog medijumuma ne bi trebalo da se poveća za više od 1,5 jedinica. Međutiim, odstepene veće od 1,5 jedinica ne bi obezvrijedilo ispitivanje ako se može pokazati da su kriterijumi validnosti zadovoljeni. U posebnim slučajevim, kao prilikom ispitivanja nepostojanih hemikalija ili metala, mora se posvetiti dodatna pažnja kretanju pH vrijednosti.

2.9. Trajanje

Ispitivanje se završava 7 dana nakon prebacivanja biljaka u ispitne posude.

2.10. Mjerenja i analitička određivanja

Na početku ispitivanja prebrojavaju se listovi u ispitnim posudama i broj se bilježi, pazeći da se uzmu u obzir svi istureni, jasno vidljivi listovi. Broj listova koji izgledaju normalno ili abnormalno određuje se na početku ispitivanja, najmanje jednom na svaka 3 dana u toku perioda izloženosti (tj. najmanje dvaput u toku sedmodnevnog perioda) i na kraju ispitivanja. Potrebno je zabilježiti promjene u razvoju biljaka, npr. promjene u veličini lista, izgledu, naznake nekroze, hloroze ili ispupčenja, raskidanje kolonija ili gubitak plovnosti, kao i promjene u dužini i izgledu korijena. TakoĐe treba zabilježiti značajna svojstva ispitnog medijumuma (npr. prisutnost nerastvorenog materijala, rast algi u ispitnoj posudi).

Osim određivanja broja listova u toku ispitivanja, ocjenjuju se i efekti hemikalije koja se ispituje na jednu (ili više) sljedećih varijabli mjerenja:

(i) ukupna lisna površina, (ii) suva masa, (iii) svježa masa.

Prednost ukupne lisne površine sastoji se u tome što se može odrediti za svaku ispitnu i kontrolnu posudu na početku, u toku i na kraju ispitivanja. Suvu ili svježu masu treba odrediti na početku ispitivanja iz uzorka kulture inokuluma koja je reprezentativna za materijal koji se koristi za otpočinjanje ispitivanja, kao i na kraju ispitivanja koristeći biljni material iz svake ispitne i kontrolne posude. Ako se lisna površina ne mjeri, suva masa ima prednost u odnosu na svježu masu. Ukupna lisna površina, suva masa i svježa masa mogu se odrediti na sljedeći način:

(i) *Ukupna lisna površina*: Ukupna lisna površina svih kolonija može se odrediti analizom slike. Silueta ispitne posude i biljaka može se snimiti video kamerom (tj. postavljanjem posude na svjetlosnu kutiju), nakon čega se dobijena slika digitalizuje. Kalibracijom uz pomoć pljosnatih oblika poznate površine može se potom odrediti ukupna lisna površina u ispitnoj posudi. Potrebno je pripaziti na to da se isključi uticaj oboda ispitne posude. Drugi, naporniji pristup je da se fotokopiraju ispitne posude i biljke, isiječe dobijena silueta kolonija i odredi njihova površina upotrebom analizatora lisne površine ili milimetarskog papira. Mogu biti podesne i druge tehnike (npr. odnos papirne mase između površine siluete kolonija i jedinične površine).

(ii) *Suva masa*: Izvade se sve kolonije iz svake ispitne posude i ispiraju destilovanom ili dejonizovanom vodom. Upijajućim materijalom odstrani se višak vode, pa se potom suše na 60 °C sve dok se ne dobije stalna masa. Treba obuhvatiti i sve ostatke korijenja. Suva masa izražava se na nivou preciznosti od najmanje 0,1 mg.

iii) *Svježa masa*: Sve kolonije prenose se u prethodno izmjerene epruvete od polistirena (ili drugog inertnog materijala) sa malim (1 mm) otvorima u zaobljenom dnu. Epruvete se zatim 10 minuta centrifugiraju na 3 000 obrtaja u minutu na sobnoj temperaturi. Epruvete, koje sada sadrže osušene kolonije, ponovo se mjere, a svježa masa računa se tako što se se od dobijenog
rezultata mjerenja oduzme masa prazne epruvete.

2.11. Učestalost mjerenja i analitičkih određivanja

Ako se primjenjuje plan statičkog ispitivanja, na početku i na kraju ispitivanja treba izmjeriti pH vrijednost svake tretirane grupe. Ako se primjenjuje plan polustatičkog ispitivanja, pH vrijednost se mjeri u svakoj šarži „svježeg|| ispitnog rastvora prije svakog obnavljanja, kao i u odgovarajućim „potrošenim|| rastvorima.

Potrebno je izmjeriti intenzitet svjetlosti u komori za rast, inkubatoru ili prostoriji u tačkama koje se nalaze na istoj udaljenosti od izvora svjetlosti kao i listovi sočivice. Mjerenja treba izvesti najmanje jedanput u toku ispitivanja. Temperatura medijumuma u zamjenskoj posudi koja se drži u komori za rast, inkubatoru ili prostoriji u istim uslovima bilježi se najmanje jedanput dnevno.

U toku ispitivanja, koncentracije hemikalije koja se ispituje određuju se u odgovarajućim vremenskim razmacima. U statičkim ispitivanjima, minimalni zahtjev je da se koncentracije odrede na početku i na kraju ispitivanja.

U polustatičkim ispitivanjima u kojima se ne očekuje da koncentracija hemikalije koja se ispituje ostane u granicama od ± 20 % u odnosu na nominalnu koncentraciju, neophodno je analizirati sve svježe pripremljene ispitne rastvore i zatim ponoviti analizu pri svakom obnavljanju. Međutiim, za ona ispitivanja u kojima izmjerena početna koncentracija hemikalije koja se ispituje nije u granicama od ± 20 % u odnosu na nominalnu koncentraciju ali se može pružiti dovoljno dokaza da su početne koncentracije ponovljive i stabilne (tj. da se nalaze u okviru raspona od 80 – 120% početne koncentracije), hemijska određivanja mogu se izvoditi samo na najvišoj i najnižoj ispitnoj koncentraciji. U svakom slučaju, određivanje koncentracija hemikalije koja se ispituje prije obnavljanja vrši se samo na jednoj

posudi ponavljanja za svaku ispitnu koncentraciju (ili na združenom sadržaju posuda ponavljanja).

Ako se koristi protočno ispitivanje, može se primijeniti sličan režim uzimanja uzoraka kao onaj koji je opisan za polustatička ispitivanja, uključujući analizu na početku, u sredini i na kraju ispitivanja, ali u ovom slučaju nije prikladno mjerenje „potrošenih‖ rastvora. U toj vrsti ispitivanja potrebno je svakodnevno provjeravati brzinu protoka sredstva za razblaživanje i hemikalije koja se ispituje ili osnovnog rastvora hemikalije koja se ispituje.

Ako postoje dokazi da je u toku ispitivanja koncentracija hemikalije koja se ispituje uspješno održavana u granicama od ± 20 % nominalne ili izmjerene početne koncentracije, analiza rezultata može se zasnivati na nominalnim ili izmjerenim početnim vrijednostima. Ako odstepene od nominalne ili izmjerene početne koncentracije nije u granicama od ± 20 %, analiza rezultata treba da se zasniva na geometrijskoj srednjoj vrijednosti koncentracije tokom izloženosti ili na modelima koji opisuju opadanje koncentracije hemikalije koja se ispituje.

2.12. Granično ispitivanje

U nekim okolnostima, npr. kada perliminarno ispitivanje ukazuje na to da hemikalija koja se ispituje nema toksično dejstvo pri koncentracijama do 100 mg/l ili do njene granice rastvorljivosti u ispitnom medijumumu (u zavisnosti od toga šta je niže), može se ssprovesti granično ispitivanje koje uključuje poređenje odgovora u kontrolnoj grupi i u jednoj tretiranoj grupi (100 mg/l ili koncentracija jednaka granici rastvorljivosti). Izričito se preporučuje da to istraživanje bude praćeno analizom koncentracije izloženosti. Svi prethodno opisani uslovi ispitivanja i kriterijumi validnosti odnose se i na granično ispitivanje, s tim što broj ponavljanja tretirane grupe treba da bude dvostruko veći. Rast u kontrolnoj i tretiranoj grupi može se analizirati uz pomoć statističkog testa za poređenje srednjih vrijednosti, npr. Studentovim (Student) t-testom. .

3. Podaci i izvještavanje

3.1. Vrijeme udvostručenja Da bi se odredilo vrijeme potrebno da se broj listova udvostruči (T_d) i da li ispitivanje ispunjava ovaj kriterijum validnosti, na podatke dobijene iz kontrolnih posuda primjenjuje se sljedeća formula:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

gdje je μ prosječna specifična stopa rasta određena na način opisan niže.

3.2. Varijable odgovora

Cilj testa je da se odrede efekti hemikalije koja se ispituje na vegetativni rast vrsta *Lemna*. U ovoj metodi ispitivanja opisane su dvije varijable odgovora , pošto različite jurisdikcije imaju različite preferencije i regulatorne potrebe. Da bi rezultati ispitivanja bili prihvatljivi u svim jurisdikcijama, efekte treba ocijeniti uz pomoć obje varijable odgovora, koje su u nastavku opisane pod (a) i (b).

(a)Prosječna specifična stopa rasta: ova varijabla odgovora računa se na osnovu promjena u logaritmima broja listova, a uz to i na osnovu promjena u logaritmima nekog drugog parametra mjerenja (ukupne lisne površine, suve mase ili svježe mase) tokom vremena (izraženo po danu) u kontrolisanim grupama i u svakoj tretiranoj grupi. Ponekad se ona naziva relativna stopa rasta (12).

(b)Prirast: ova varijabla odgovora računa se na osnovu promjena u broju listova, a uz to i na osnovu promjena u nekom drugom parametru mjerenja (ukupnoj lisnoj površini, suvoj masi ili
svježoj masi) u kontrolisanim grupama i u svakoj tretiranoj grupi do kraja ispitivanja.

Treba napomenuti da vrijednosti toksičnosti izračunate upotrebom ove dvije varijable odgovora nijesu uporedive razlika mora uzeti u oblik prilikom korišćenja rezultata ispitivanja. Vrijednosti EC_x zasnovane na prosječnoj specifičnoj stopi rasta (E_rC_x) po pravilu će biti veće od rezultata zasnovanih na prirastu (E_yC_x) ako su ispoštovani uslovi ispitivanja ove metode ispitivanja, zbog razlike u matematičkoj osnovi tih pristupa. To ne treba tumačiti kao razliku u osjetljivosti između dvije varijable odgovora, već jednostavno da se te vrijednosti matematički razlikuju. Pojam prosječne specifične stope rasta zasnovan je na opštem obrascu eksponencijalnog rasta sočivice u neograničenim kulturama, pri čemu se toksičnost procjenjuje na osnovu efekata na stopu rasta, nezavisno od apsolutnog nivoa specifične stope rasta kontrolne grupe, nagiba krive koncentracijaodgovor ili trajanja ispitivanja. Nasuprot tome, rezultati zasnovani na prirastu kao varijabli odgovora u zavisnom su odnosu sa svim tim drugim varijablama. E_yC_x zavisi od specifične stope rasta vrsta sočivice koje se upotrebljavaju u nekom konkretnom ispitivanju i od maksimalne specifične stope rasta koja može varirati od vrste do vrste, a čak i od jednog do drugog klona. Iako nauka daje prednost upotrebi prosječne specifične stope rasta za procjenu toksičnosti, ovom metodom ispitivanja obuhvaćene su i procjene toksičnosti zasnovane na prirastu kako bi se zadovoljili važeći regulatorni zahtjevi u nekim jurisdikcijama.

Procjene toksičnosti treba zasnivati na broju listova i na jednoj dodatnoj varijabli mjerenja (ukupna lisna površina, suva masa ili svježa masa), zato što neke hemikalije mogu uticati na druge varijable mjerenja mnogo više nego na broj listova. Taj efekat ne bi bio uočen ako bi se računao samo broj listova.

Prilikom svakog mjerenja, broj listova kao i bilo koja druga zabilježena varijabla mjerenja, tj. ukupna lisna površina, suva masa ili svježa masa, tabelarno se prikazuju zajedno sa koncentracijama hemikalije koja se ispituje. Kasnija analiza podataka koja za cilj ima npr. procjenu vrijednosti LOEC, NOEC ili EC_x treba da se zasniva na vrijednostima svakog pojedinačnog ponavljanja, a ne na izračunatim srednjim vrijednostima po tretiranim grupama.

3.3. Prosječna specifična stopa rasta

Prosječna specifična stopa rasta za neki određeni period iizračunava se kao logaritamsko povećanje varijabli rasta – broja listova i još jedne varijable mjerenja (ukupne lisne površine, suve mase ili svježe mase) – uz pomoć sljedeće formule, za svako ponavljanje kontrolne grupe i
tretiranih grupa:

$$\mu_{i-j} = \frac{ln\ N_j - ln\ N_i}{t}$$

gdje je:

— : μ_{i-j} : prosječna specifična stopa rasta od vremena i do vremena j
— : N_i : varijabla mjerenja u ispitnoj ili kontrolnoj posudi u vremenu i
— : N_j : varijabla mjerenja u ispitnoj ili kontrolnoj posudi u vremenu j — : t : vremenski period od i do j

Za svaku tertiranu grupi i za kontrolnu grupu potrebno je izračunati srednju vrijednost stope rasta sa procjenom varijanse.

Prosječna specifična stopa rasta računa se za cijeli period ispitivanja (vrijeme „i‖ u gore navedenoj formuli je početak ispitivanja, a vrijeme „j‖ je kraj ispitivanja). Za svaku ispitnu koncentraciju i kontrolu potrebno je izračunati srednju vrijednost prosječne specifične stope rasta sa procjenom varijanse. Uz to je potrebno procijeniti etapnu stopu rasta da bi se ocijenili efekti hemikalije koja se ispituje koji se javljaju u toku perioda izloženosti (npr. uvidom u logaritamski transformisane krive rasta). Znatne razlike između etapne stope rasta i prosječne stope rasta ukazuju na to da postoji odstepene od konstantnog eksponencijalnog rasta i da je neophodno detaljno proučiti krive rasta. U tom slučaju, ako se koristi konzervativni pristup, specifične stope rasta tretiranih kultura iz vremenskog perioda maksimalne inhibicije upoređuju se sa specifičnim stopama rasta kontrolnih kultura iz istog vremenskog perioda.

Procentualno izražena inhibicija stope rasta (I_r) može se potom izračunati za svaku ispitnu koncentraciju (tretiranu grupu) prema sljedećoj formuli:

$$\%I_r = \frac{\mu C - \mu T}{\mu C} \times 100$$

gdje je:

— : % I_r : procenat inhibicije prosječne specifične stope rasta
— : μ_C : srednja vrijednost za μ u kontrolnoj grupi
— : μ_T : srednja vrijednost za μ u tretiranoj grupi

3.4. Prirast

Efekti na prirast određuju se na osnovu dvije varijable mjerenja, i to broja listova i još jedne varijable mjerenja (ukupna lisna površina, suva masa ili svježa masa) u svakoj ispitnoj posudi na početku in a kraju ispitivanja. Za suvu masu ili za svježu masu, početna biomasa određuje se na osnovu uzoka listova uzetih iz iste šarže koja je korišćena za inokulaciju ispitnih posuda (v. stav
20). Za svaku ispitnu koncentraciju i kontrolu potrebno je izračunati srednju vrijednost prirastasa procjenama varijanse. Srednja procentualna vrijednost inhibicije prirasta (% I_y) može se izračunati za svaku tretiranu grupu na sljedeći način:

$$\%I_y = \frac{b_c - b_T}{b_c} \times 100$$

gdje je:

— : % I_y : procenat smanjenje prirasta
— : b_C : konačna biomasa kontrolne grupe umanjena za početnu biomasu

— : b_T : konačna biomasa tretirane grupe umanjena za početnu biomasu

3.5. Grafički prikaz krivih koncentracija-odgovor

Potrebno je grafički prikazati krive koncentracija-odgovor koje pokazuju odnos između srednje procentualne vrijednosti inhibicije varijable odgovora (I_r ili I_y koja se računa na način naveden) i logaritma koncentracije ispitivane hemikalije.

3.6. Procjena vrijednosti EC_x

Procjene vrijednosti EC_x (npr. EC_{50}) treba da budu zasnovane i na prosječnoj specifičnoj stopi rasta (E_rC_x) i na prirastu (E_yC_x), koji se pritom zasnivaju na broju listova i na jednoj dodatnoj varijabli mjerenja (ukupna lisna površina, suva masa ili svježa masa). To je stoga što postoje ispitne hemikalije koje ne utiču isto na broj listova i na druge varijable mjerenja. Traženi parametri toksičnosti su, dakle, četiri vrijednosti EC_x za svaki izračunati nivo inhibicije x: E_rC_x (broj listova); E_rC_x (ukupna lisna površina, suva masa ili svježa masa); E_yC_x (broj listova); i E_yC_x (ukupna lisna površina, suva masa ili svježa masa).

Statistički postupci

Cilj je da se dobije kvantitativni odnos koncentracije i odgovora putem regresione analize. Moguće je upotrijebiti ponderisanu linearnu regresiju nakon što je izvršena transformacija podataka odgovora u linearni oblik, na primjer u probit ili logit ili Vejbul (Weibull) jedinice (13), ali su postupci nelinearne regresije preporučljivije tehnike koje se bolje nose sa neizvježnim nepravilnostima podataka i odstepenima od pravilnih distribucija. Sa približavanjem nultoj ili potpunoj inhibiciji, te nepravilnosti mogu biti uvećane transformacijom i ometati analizu (13). Treba napomenuti da su standardne metode analize u kojima se koriste vrijednosti dobijene transformacijom u probit, logit ili Vejbul (Weibull) jedinice namijenjene da se primjenjuju na kvantalne podatke (npr. mortalitet ili preživljavanje) i da se moraju modifikovati da bi se mogle primijeniti na podatke o stopi rasta ili prirastu.

Za svaku varijablu odgovora koja se analizira koristi se odnos koncentracija-odgovor kako bi se izračunale procjene jednim brojem za vrijednosti EC_x. Kada je to moguće, za svaku procjenu treba odrediti granice pouzdanosti od 95%. Stepen poklapanja podataka odgovora sa regresionim modelom procjenjuje se grafički ili statistički. Regresionu analizu treba vršiti na osnovu odgovora pojedinačnih ponavljanja, a ne na osnovu srednjih vrijednosti tretirane grupe.

Procjene vrijednosti EC_{50} i granice pouzdanosti mogu se dobiti i upotrebom linearne interpolacije sa samonadopunjavanjem („bootstrapping‖), ako su dostupni regresioni modeli/metode nepodesni za podatke.

Za procjenu vrijednosti LOEC, a time i NOEC, neophodno je uporediti srednje vrijednosti tretiranih grupa kroz upotrebu tehnika analize varijanse (ANOVA). Srednja vrijednost za svaku koncentraciju mora se zatim uporediti sa srednjom vrijednošću kontrolne grupe, i to primjenom odgovarajuće metode višestrukog poređenja ili metode testa trenda. Danitov (Dunnett) ili Vilijamsov (Williams) test može biti koristan (18)(19)(20)(21). Neophodno je procijeniti da li je ANOVA-ina pretpostavka homogenosti varijanse valjana. Ta procjena može se izvesti grafički ili formalnim testom (17). Pogodni testovi su Levinov (Levene) ili Bartletov (Bartlett). Ako pretpostavka homogenosti varijanse nije valjana, to se može ponekad korigovati logaritamskom transformacijom podataka. Ako je heterogenost varijanse ekstremna i ne može se korigovati transformacijom, treba razmotriti analizu upotrebom metoda kao što su Jonkirovi (Jonkheere) testovi trenda sa postupnim snižavanjem.

Zbog nedavnih naučnih saznanja preporučuje se da se pojam NOEC-a napusti i da se zamijeni procjenama jednim brojem vrijednosti EC_x koje se dobijaju regresijom. Za ovo ispitivanje na vrstama *Lemna* nije utvrđena odgovarajuća vrijednost za x. Međutiim, vijednosti iz raspona 10 do 20% čine se prikladnim (u zavisnosti od izabrane varijable odgovora), a po mogućstvu treba navesti i EC_{10} i EC_{20}.

3.7 Izvještavanje

Izvještaj o ispitivanju mora sadržati sljedeće:

Hemikalija koja se ispituje:

— fizička priroda i fizičko-hemijska svojstva, uključujući granicu rastvorljivosti u vodi; — podaci za identifikaciju hemikalije (npr. CAS broj), uključujući čistoću (nečistoće).

Vrsta koja se ispituje:

— naučni naziv, klon (ako je poznat) i izvor.

Uslovi ispitivanja:

— korišćeni postupak ispitivanja (statički, polustatički ili protočni);
— datum početka ispitivanja i njegovo trajanje;
— ispitni medijumum;
— opis plana ogleda: ispitne posude i poklopci, zapremine rastvora, broj kolonija i listova po ispitnoj posudi na početku ispitivanja;
— ispitne koncentracije (nominalne i izmjerene, prema potrebi) i broj ponavljanja po koncentraciji;
— načini pripremanja osnovnih i ispitnih rastvora, uključujući eventualnu upotrebu rassupstancaača ili sredstava za dispergovanje;
— temperatura u toku ispitivanja;
— izvor svjetlosti, intenzitet svjetlosti i homogenost;
— pH vrijednosti medijumuma za ispitivanje i kontrolnih medijumuma;
— koncentracije hemikalije koja se ispituje i metoda analize sa odgovarajućim podacima za ocjenu kvaliteta (validacione studije, standardna odstepena ili granice pouzdanosti analiza);
— metode za određivanje broja listova i drugih varijabli mjerenja, npr. suve mase, svježe mase ili lisne površine;
— sva odstepena o dove metode ispitivanja.

Rezultati:

— sirovi podaci: broj listova i druge varijable mjerenja u svakoj ispitnoj i kontrolnoj posudi pri svakom posmatranju i prilikom analize;
— srednje vrijednosti i standardna odstepena za svaku varijablu mjerenja;
— krive rasta za svaku koncentraciju (preporučuje se da budu sa varijablom mjerenja koja je logaritamski transformisana, v. stav 55);
— vrijeme udvostručavanja/stopa rasta u kontrolnoj grupi na osnovu broja listova;
— izračunate varijable odgovora za svako ponavljanje tretiranih grupa sa srednjim vrijednostima i koeficijentom varijacije za ponavljanja;
— grafički prikaz odnosa koncentracija/efekat;
— procjene parametara praćenja toksičnosti za varijable odgovora, npr. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, i pripadajući intervali pouzdanosti. LOEC i/ili NOEC, ako su izračunati, i statističke metode korišćene za njihovo određivanje;
— ako je korišćena ANOVA, veličina efekta koji se može uočiti (npr. najmanja značajna razlika); — svaka eventualna stimulacija rasta otkrivena u nekoj ispitnoj grupi;
— svi eventualni vidljivi znaci fitotoksičnosti, kao i zapažanja u vezi sa ispitnim rastvorima;

— diskusija rezultata, uključujući svaki eventualni uticaj na ishod ispitivanja koji je posljedica odstepena od ove metode ispitivanja.

Dodatak 1

Definicije

Sljedeće definicije i skraćenice koriste se za potrebe ove metode ispitivanja:

Biomasa je suva masa žive materije prisutne u nekoj populaciji. U ovom ispitivanju se zamjenski parametri biomase, kao što su broj listova ili lisna površina obično mjere, pa se izraz „biomasa‖ tako odnosi i na te namjenske mjere. **Hloroza** je žućenje lisnog tkiva.

Klon je organizam ili ćelija nastala od jedne jedinke bepolnim razmnožavanjem. Jedinke nastale od istog klona su, stoga, genetički identične.

Kolonija je skup matičnih listova i izdanaka (obično ih je 2 do 4) koji su meĐusobno jedinjenjeeni. Ponekad se naziva biljkom.

EC_x je koncentracija ispitivane hemikalije rastvorene u medijumumu za ispitivanje koja dovodi do x-procentnog (npr. 50%) smanjenja rasta *Lemna* u okviru navedenog perioda izloženosti (koji se izričito navodi ako odstupa od punog ili normalnog trajanja ispitivanja). Da bi se nedvosmisleno označilo da li je vrijednost EC dobijena iz stope rasta ili prirasta, za stopu rasta koristi se simbol —E_rC—, a za prirast koristi se simbol „E_yC—, iza čega se navodi korišćena varijabla mjerenja, npr. E_rC (broj listova).

Protočno ispitivanje je ispitivanje u kom se ispitni rastvori neprekidno zamjenjuju svježim rastvorima.

List je pojedinačna/zasebna „listasta‖ struktura biljke sočivice. To je najmanja jedinica, tj. jedinka, sposobna za reprodukciju

Ispupčenost označava listove grbavog ili nabreklog izgleda.

Rast je povećanje varijable mjerenja, npr. broja listova, suve mase, svježe mase ili lisne površine, u toku perioda ispitivanja.

Stopa rasta (prosječna specifična stopa rasta) je logaritamsko povećanje biomase u toku perioda izloženosti.

Najniža koncentracija sa vidljivim efektom (LOEC) je najniža ispitana koncentracija pri kojoj je uočeno da hemikalija ima statistički značajan efekat smanjenja rasta (pri $p < 0,05$) u poreĐenju sa kontrolnom grupom, u okviru datog vremena izlaganja. Međutiim, sve ispitne koncentracije iznad LOEC moraju imati štetan efekat koji je jednak ili veći od efekta uočenog pri LOEC. Ako se ova dva usl va ne mogu zadovoljiti, mora se dati detaljno objašnjenje o tome na koji način je izabrana LOEC (a prema tome i NOEC).

Varijabla mjerenja je bilo koja vrsta varijabli koja se mjeri kako bi se izrazio parameter praćenja u ispitivanju uz pomoć jedne ili više različitih varijabli odgovora. U ovoj metodi, varijable mjerenja su broj listova, lisna površina, svježa masa i suva masa.

Monokultura je kultura koja sadrži jednu biljnu vrstu.

Nekroza je mrtvo (npr bijelo i vodom natopljeno) lisno tkivo.

Najveća koncentracija bez vidljivog efekta (NOEC) je ispitna koncentracija neposredno ispod LOEC.

Fenotip predstavljaju primjetne karakteristike nekog organizma koje su određene interakcijom njegovih gena i njegove životne sredine.

Varijabla odgovora je varijabla za procjenu toksičnosti izvedena iz bilo koje izmjerene varijable koja opisuje biomasu različitim metodama proračuna. Za ovu metodu

ispitivanja, stope rasta i prirast su varijable odgovora izvedene iz varijabli mjerenja kao što su broj listova, lisna površina, svježa masa ili suva masa.

Polustatičko ispitivanje (ispitivanje sa obnavljanjem) je ispitivanje u kom se ispitni rastvor u toku ispitivanja zamjenjuje periodično tj. u određenim razmacima.

Statičko ispitivanje je metoda ispitivanja bez obnavljanja ispitnog rastvora u toku ispitivanja.

Hemikalija koja se ispituje je bilo koja supstanca ili smješa koja se ispituje upotrebom ove metode ispitivanja.

Parametar praćenja u ispitivanju je opšti faktor koji će se mijenjati u zavisnosti od uticaja hemikalije koja se ispituje, što je i cilj ispitivanja. U ovoj metodi ispitivanja, parameter praćenja u ispitivanju je inhibicija rasta, koja se može izraziti različitim varijablama odgovora zasnovanim na jednoj ili više vari abli mjerenja.

Ispitni medijumum je kompletan sintetički medijumum za rast u kojem ispitne biljke rastu i izlažu se hemikaliji koja se ispituje. Hemikalija koja se ispituje po pravilu se rassupstancaa u ispitnom medijumum .

Prirast je vrijednost mjerne varijable kojom se izražava biomasa na kraju perioda izloženosti umanjena za varijablu mjerenja na početku perioda izloženosti.

Dodatak 2

Opis *Lemna* spp.

Vodena biljka *Lemna* spp., poznata kao sočivica, pripada porodici *Lemnaceae* koja obuhvata veliki broj širom svijeta rasprostranjenih vrsta podijeljenih u četiri roda. Njihov različit izgled i taksonomija detaljno su opisani u literaturi. *Lemna gibba* i *L. minor* su vrste tipične za umjerene pojase i često se koriste u ispitivanjima toksičnosti. Obje vrste imaju plutajuću ili umjerenu diskoidnu stabljiku (list), a iz sredine donje površine svakog lista polazi veoma tanak korijen. *Lemna* spp. rijetko cvjeta, a biljke se razmnožavaju vegetativno stvaranjem novih listova (3). U poreĐenju sa starijim biljkama, mlaĐe biljke su bljeđe, imaju kraće korijenje i sastoje se od dva do tri lista različite veličine. Mala veličina biljke *Lemna*, njena jednostavna građa, bespolno razmnožavanje i kratko vrijeme ssupstancaanja novog naraštaja čine biljke ovog roda veoma pogodnim za laboratorijaska ispitivanja (4)(5).

Zbog vjerovatnih razlika u osjetljivosti meĐu vrstama, važeća su samo poreĐenja osjetljivosti u okviru jedne vrste.

Primjeri vrsta Lemna koje su korišćene za ispitivanja: Spisak vrsta

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna* aequinoctialis in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935-941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp., —Public draft|| . EPA 712-C-96-156. 8pp.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality — Determination of growth inhibition
(7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (na švedskom).
Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742.

United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic
Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., —Public draft‖ . EPA 712-C-96-156. 8pp.
Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.
Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.
Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481- 483.
Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111

Dodatak 3

Održavanje početne kulture Početne kulture se na nižim temperaturama (4-10 °C) mogu održavati duže vremena bez presaĐivanja. Medijumum za rast *Lemna* može biti isti kao onaj koji se koristi za ispitivanje, ali se za početne kulture mogu koristiti i drugi medijumumi bogati nutrijentima.

Periodično se određeni broj mladih, svjetlozelenih biljaka aseptičnom metodom prebacuje u nove posude za uzgoj sa svježim medijumumom. U hladnijim uslovima, koji se ovdje preporučuju, presaĐivanje se može vršiti u razmacima do tri mjeseca.

Potrebno je koristiti hemijski čiste (kiselinom oprane) i sterilne staklene posude za uzgoj, uz primjenu tehnika aseptičkog rukovanja. U slučaju kontaminacije početne kulture, npr.algama ili gljivama, potrebno je preduzeti određene korake na uklanjanju kontaminirajućih organizama. U slučaju algi i većine drugih kontaminirajućih organizama, to se može postići površinskom sterilizacijom. Uzima se uzorak kontaminiranog biljnog materijala, a korijeni se odsijeku.
Materijal se zatim snažno mućka u čistoj vodi, nakon čega se prastvara u 0,5-procentni (v/v) rastvor natrijum hipohlorita i drži u njemu od 30 sekundi do 5 minuta. Potom se biljni materijal ispira sterilnom vodom i prebacuje, u više šarži, u posude za uzgoj sa svježim medijumumom za uzgoj. Mnogi listovi će uginuti zbog ovog tretmana, naročito ako izloženost traje duže, ali će neki od preživjelih listova biti bez kontaminacije. Oni se potom ponovo mogu koristiti za inokulaciju novih kultura.

Dodatak 4

Medijumumi

Za *L. minor* i *L. gibba* preporučuju se različiti mediujumi za uzgoj. Za *L. minor* se preporučuje modifikovani medijumum pripremljen po švedskom standardu (SIS), dok se za *L. gibba* preporučuje medijumum 20X AAP. Sastav oba ta medijumuma dat je u

nastavku. Prilikom pripremanja ovih medijumuma treba koristiti reagens ili hemikalije analitičke čistoće kao i dejonizovanu vodu.

Medijumum za uzgoj *Lemna* prema švedskom standardu (SIS)

— Osnovni rastvori I - V sterilišu se obradom u autoklavu (120 °C, 15 minuta) ili membranskom filtracijom (veličina pora oko 0,2 μm).
— Osnovni rastvor VI (i opciono VII) steriliše se samo membranskom filtracijom; ne smije se obraĐivati u autoklavu.
— Sterilni osnovni rastvori čuvaju se na hladnom i tamnom mjestu. Osnovni rastvori I - V bacaju se nakon šest mjeseci, dok rok trajanja rastvora VI (i opciono VII) traje jedan mjesec.

Osnovni rastvor br..	Supstanca	Koncentracija u osnovnom rastvoru (g/l)	Koncentracija u pripremljenom medijumumu (mg/□l)	Pripremljeni medijumum	
				Element	Koncentracija
					(mg/□l)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO_4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,00 0
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA $2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (pufer)	490	490	—	—

Za pripremanje jednog litra medijumuma SIS, u 900 ml dejonizovane vode dodaje se:

— 10 ml osnovnog rastvora I
— 5 ml osnovnog rastvora II
— 5 ml osnovnog ra tvora III
— 5 ml osnovnog rastvora IV
— 1 ml osnovnog rastvora V
— 5 ml osnovnog rastvora VI
— 1 ml osnovnog rastvora VII (opciono)

Napomena: Za ispitivanje određenih hemikalija može biti potreban i osnovni rastvor VII (pufer MOPS).

pH vrijednost koriguje se na 6,5 ± 0,2 upotrebom 0,1 ili 1 mol HCl ili NaOH, a zapremina od jednog litra postiže se dodavanjem dejonizovane vode.

Medijumum za uzgoj 20X AAP

Osnovni rastvori pripremaju se u sterilnoj destilovanoj ili dejonizovanoj vodi.

Sterilni osnovni rastvori čuvaju se na hladnom i mračnom mjestu. U tim uslovima vijek trajanja osnovnih rastvora iznosi najmanje 6-8 sedmica.

Pet osnovnih rastvora sa nutrijentima (A1, A2, A3, B i C) priprema se za medijumum 20X — AAP, korišćenjem hemikalija čiji je stepen čistoće na nivou reagensa. U približno 850 ml dejonizovane vode dodaje se po 20 ml svakog osnovnog rastvora sa nutrijentima, kako bi se dobio medijumum za uzgoj. Upotrebom 0,1 ili 1 mol HCl ili NaOH, pH vrijednost se koriguje na 7,5 ± 0,1, a zapremina od jednog litra postiže se dodavanjem dejonizovane vode. Medijumum se potom sipa u sterilnu posudu kroz membranski filter veličine pora od 0,2 μm (približno).

Medijumum za rast namijenjen za ispitivanje treba pripremiti 1-2 dana prije upotrebe, kako bi se omogućilo da se pH stabilizuje. Prije upotrebe potrebno je provjeriti pH vrijednost medijumuma za rast i po potrebi ga korigovati dodavanjem 0,1 ili 1 mol NaOH ili HCl, kako je prethodno opisano.

Osnovni rastvor br.	Supstanca	Koncentracija u osnovnom	Koncentracija u pripremljenom	Pripremljeni medijumum	
		rastvoru (g/□l)	medijumumu (mg/□l)		
				Element	Koncentracija (mg/□l)
A1	$NaNO_3$	26	510	a;N	190;84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1,4	30	K;P	9.4;3.7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66
	$Na_2EDTA.2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 mg/l	66 μg/l	Zn	31 μg/l
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 mg/l	29 μg/l	Co	7,1 μg/l
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 mg/	145 μg/l	Mo	58 μg/l
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 mg/l	0,24 μg/l	Cu	0,080 μg/l

C	$NaHCO_3$	15	300	Na;C	220; 43

Napomena: Teoretski primjerena konačna koncentracija bikarbonata (kojom se izbjegava značajno prilagoĐavanje pH) iznosi 15 mg/l, a ne 300 mg/l. Međutiim, ranija upotreba medijumuma 20X-AAP, uključujući meĐulaboratorijasko uporedno ispitivanje za ovu smjernicu, zasnivala se na koncentraciji od 300 mg/l. (I.Sims (*I.Sims*), P.Vajthaus (*P.Whitehouse*) i R. Lejsi (*R.Lacey*) (1999). The OECD Lemna Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.)

Medijumum ŠTAJNBERG (STEINBERG) (prema ISO 20079)

Koncentracije i osnovni rastvori

Modifikovani medijumum Štajnberg (Steinberg) koristi se u ISO 20079 samo za *Lemna minor* (obzirom da je samo *Lemna minor* tu dozvoljena), ali su ispitivanja pokazala da se i sa Lemna gibba mogu postići dobri rezultati.

Prilikom pripremanja medijumuma treba koristiti hemikalije sa stepenom čistoće na nivou reagensa ili hemikalije analitičkog stepena čistoće i dejonizovanu vodu.

Medijumum sa nutrijentima priprema se od osnovnih rastvora ili desetostruko koncentrovanog medijumuma koji omogućava dobijanje maksimalne koncentracije medijumuma bez taloženja.

Tabela 1

pH-stabilizovani medijumum ŠTAJNBERG (STEINBERG) (modifikovan prema Altenburgeru (Altenburger))

Sastojak		Medijumum sa nutrijentima	
Makroelementi	molarna masa	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41
Mikroelementi	molarna masa	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA dinatrijum-dihidrat	372,24	1 500,00	4,03

Tabela 2

Osnovni rastvori (makroelementi)

1. **Makroelementi (pedesetostruko koncentrisani)**	**g/l**
Osnovni rastvor 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Osnovni rastvor 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Osnovni rastvor 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Tabela 3

Osnovni rastvori (mikroelementi)

2. Mikroelementi (hiljadustostruko koncentrisani)	mg/l
Osnovni rastvor 4:	
H_3BO_3	120,0
Osnovni rastvor 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Osnovni rastvor 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Osnovni rastvor 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Osnovni rastvor 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA dinatrijum-dihidrat	1 500,00

Osnovni rastvori 2 i 3 mogu se združiti, kao i osnovni rastvori od 4 do 7 (vodeći pritom računa o traženim koncentracijama).

— U cilju postizanja dužeg vijeka trajanja, osnovni rastvori se mogu obraditi u autoklavu u trajanju od 20 minuta na temperaturi od 121 °C ili se, umjesto toga, može izvršiti sterilna filtracija (0,2 μm). Za osnovni rastvor 8 izričito se preporučuje sterilna filtracija (0,2 μm).

Pripremanje konačne koncentracije medijumuma Štajnberg (modifikovanog)

— 20 ml osnovnih rastvora 1, 2 i 3 (v. tabelu 2) dodaje se u oko 900 ml dejonizovane vode tako da se izbjegne taloženje.
— Zatim se doda 1,0 ml osnovnih rastvora 4, 5, 6, 7 i 8 (v. tabelu 3).
— pH vrijednost treba da iznosi 5,5 +/– 0,2 (koriguje se dodavanjem što manje količine rastvora NaOH ili HCl).
— Doda se vode tako da zapremina dostigne 1 000 ml.
— Ako su osnovni rastvori sterilizovani i ako je korišćena odgovarajuća voda, dodatna sterilizacija nije neophodna. Ako se sterilizacija vrši na konačnom medijumumu, osnovni rastvor 8 treba dodati nakon obrade u autoklavu (na 121 °C u trajanju od 20 minuta).

Pripremanje desetostrukog koncentrovanog medijumuma Štajnberg (modifikovanog) za privremeno skladištenje

— 20 ml osnovnih rastvora 1, 2 i 3 (v. tabelu 2) dodaje se u oko 30 ml vode tako da se izbjegne taloženje.
— Zatim se doda 1,0 ml osnovnih rastvora 4, 5, 6, 7 i 8 (v. tabelu 3). Doda se vode tako da zapremina dostigne 100 ml.
— Ako su osnovni rastvori sterilizovani i ako je korišćena odgovarajuća voda, dodatna sterilizacija nije neophodna. Ako se sterilizacija vrši na konačnom medijumumu, osnovni rastvor 8 treba dodati nakon obrade u autoklavu (na 121 °C u trajanju od 20 minuta). — pH vrijednost medijumuma (konačna koncentracija) treba da iznosi 5,5 ± 0,2.

C.27 TEST TOKSIČNOSTI KOMARACA (CHIRONOMIDAE) U VODI IZ SEDIMENTA SA SEDIMENTOM OBRAĐENIM SPIKINGOM

1.1 Uvod

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 218 (2004). Ova ispitna metoda namijenjena je procjeni efekata produženog izlaganja hemikalijama ličinkama iz sedimenta vrste slatkovodnih dvokrilaca (diptera) Chironomus sp. Bazira se se na pokolonama postojećih testova toksičnosti za Chironomus riparius i Chironomus tentans koji su razvijeni u Evropi i Sjevernoj Americi i ispitani u prstenastom testu. Mogu se koristiti i druge vrste komaraca o kojima postoji dobra dokumentacija, npr. Chironomus yoshimatsui.

Scenarijum izlaganja koji se koristi u ovoj ispitnoj metodi jeste obogaćivanje sedimenta ispitnom supstancom spikingom. Izbor prikladnog scenarijuma izlaganja zavisi o cilju sprovođenja testa. Cilj scenarijuma obogaćivanja sedimenta spikingom jeste simulirati akumulirani nivo hemikalija koje postoje u sedimentu. Ovaj sistem izlaganja obuhvata spiking sedimenta iz ispitnog sistema sediment/voda.

Supstance koje treba ispitati na organizme koji žive u sedimentu obično u njemu opstaju tokom dužih perioda. Organizmi iz sedimenta mogu se izlagati na razne načine. Relativna važnost svakog načina izlaganja i vrijeme potrebno da bi svaki od tih načina doprinio opštim efektima toksičnosti zavise od fizičko-hemijskim svojstvima predmetne hemikalije. Za jako adsorptivne supstance (npr. s log K ow > 5) ili za supstance koje se vežu sa sedimentom kovalentnim vezama, značajan način izlaganja može biti gutanje kontaminirane hrane. Kako

se ne bi podcijenila toksičnost jako lipofilnih supstance, može se u obzir uzeti upotreba hrane koja se dodaje sedimentu prije primjene ispitivane supstance. Da bi se u obzir uzeli svi potencijalni načini izlaganja, ova se ispitna metoda usrednjava na dugotrajno izlaganje. Test traje u rasponu od 20 - 28 dana za C. riparius i C. yoshimatsui, te 28 - 65 dana za C. tentans. Ako su za neku specifičnu svrhu potrebni kratkotrajni podaci, radi istraživanja efekata neke nestabilne hemikalije, višestruka određivanja mogu se ukinuti nakon deset dana.

Izmjereni konačni efekti jesu ukupni broj odraslih životinja transformisanih u vrijeme preobraženja. Preporučuje se da se preživljavanje i rast larvi mjere tek nakon deset dana ako su potrebni dodatni kratkotrajni podaci, i to pomoću dodatnih višestrukih određivanja, ako je to prikladno.

Preporučuje se upotreba formulisanog sedimenta. Formulisani sediment ima nekoliko prednosti nad prirodnim sedimentima:

— eksperimentalna varijabilnost je smanjena jer ssupstancaa mjerno obnovljivu „standardizovanu matricu‖ te se eliminiše potreba za pronalaženjem nekontaminiranih i čistih izvora sedimenta;

— testovi se mogu sprovoditi u bilo koje doba, a da se pritom ne suočava sa sezonskom varijabilnošću u ispitnom sedimentu, a nema ni potrebe za prethodnom obradom sedimenta radi uklanjanja uroĐene faune; upotreba formulisanog sedimenta takoĐe snižava troškove povezane s terenskim prikupljanjem dovoljnih količina sedimenta za rutinsko testiranje;

— upotreba formulisanog sedimenta omogućava uporeĐivanje toksičnosti i klasifikovanje supstance skladno tome.

Korištene definicije navedene su u Dodatku 1.

1.2. Načelo ispitivanja

Larve komaraca u prvom stadijumumu razvoja izlažu se rasponu koncentracija ispitne hemikalije u sistemima sediment/voda. Ispitna supstanca dodaje se u sediment, a nakon toga se larve u prvom stadijumumu razvoja uvode u ispitne laboratorijaske čaše, u kojima su već stabilizovane koncentracije sedimenta i vode. Na kraju testa mjeri se brzina transformacije i razvoja komaraca. TakoĐe se mogu mjeriti i preživljavanje i masa larvi nakon deset dana, ako je to potrebno (pomoću dodatnih višestrukih određivanja, ako je primjereno). Ti se podaci analiziraju bilo modelom regresijske analize s ciljem određivanja koncentracije koja bi izazvala × % smanjenje u transformaciji ili preživaljavanju i rastu larvi (npr. EC 15 , EC 50 itd.) bilo statističkim hipotetskim testiranjem s ciljem određivanja NOEC-a/LOEC-a. Na kraju je potrebno poređenje vrijednosti efekata s kontrolisanim vrijednostima pomoću statističkih testova.

1.3. informacije o ispitivanoj supstance

Trebali bi biti poznati rastvorljivost ispitivane supstance u vodi, njen napon pare, izmjerena ili izračunata dioba u sedimentu i stabilnost u vodi i sedimentu. Treba biti dostupna pouzdana analitička metoda kvantifikacije ispitivane supstance u vodi iznad sedimenta, smeĐuvodi i sedimentu, zajedno s poznatom i prijavljenom preciznošću i granicama detekcije. Korisne informacije obuhvataju strukturnu formulu i čistoću

ispitivane supstance. Korisna informacija je još i hemijska sudbina ispitivane supstance (npr. rasipanje, abiotička i biotička razgradnja itd.). Dalje smjernice za testiranje supstance čija su fizičko-hemijska svojstva takva da je zbog njih teško sprovoditi testove nalaze se niže.

1.4. Referentne hemikalije

Referentne hemikalije mogu se ispitivati periodično kako bi se obezbijedila pouzdanost protokola i uslova ispitivanja. Primjeri referentnih toksičnih supstanci koji se uspješno koriste u prstenastim testovima i validacionim studijama jesu: lindan, trifluralin, pentahlorofenol, kadmijum hlorid i kalijum hlorid.

1.5. Valjanost ispitivanja

Da bi test bio valjan, primjenjuju se sljedeći uslovi:

— postotak transformacije u kontrolisanim posudama mora na kraju testa iznositi najmanje 70 %.;

— transformacija vrsti C. riparius i C. yoshimatsui u odrasle životinje u kontrolisanim posudama treba se odviti između 12. i 23. dana nakon njihova unošenja u posude; za vrstu C. tentans potrebno je period od 20 do 65 dana.

— na kraju testa treba u svakoj posudi izmjeriti pH i koncentraciju rastvorenog kiseonika. Koncentracija kiseonika treba iznositi najmanje 60 posto vrijednosti zasićenosti kiseonikom
(ASV) na određenoj temperaturi, a pH vode iznad sedimenta treba biti u rasponu od 6-9 u svim ispitnim posudama;

— temperatura vode se ne razlikuje za više od ± 1,0 °C. Temperatura vode može se kontrolisati izotermičkom sobom i u tom slučaju temperatura u prostoriji treba se potvrĐivati u odgovarajućim vremenskim razmacima.

2. Opis metode

2.1. Ispitne posude

Studija se sprovodi u staklenim laboratorijaskim čašama od 600 ml prečnika 8 cm. Prikladne su i druge posude, ali se mora zagarantovati da je i u njima prikladna dubina sedimenta i vode iznad sedimenta. Površina sedimenta mora biti dovoljno velika da po svakoj larvi bude 2 do 3 cm 2 površine. Odnos dubine sloja sedimenta i dubine vode iznad sedimenta treba biti 1:4. Ispitne posude i druga aparatura koja dolazi u dodir sa sistemom ispitivanja treba biti napravljena u cijelosti od stakla ili nekog drugog hemisjki inertnog materijala (npr. teflona).

2.2. Izbor vrste

Vrsta koju treba koristiti u ovom testu po mogućnosti je Chironomus riparius. I vrsta Chironomus tentans takoĐe je prikladna, ali je njome teže rukovati te je za nju potrebno duže vrijeme ispitivanja. Može se koristiti i vrsta Chironomus yohimatsui. Pojedinosti o metodi uzgoja kulture nalaze se u Dodatku 2. za vrstu Chironomus riparius. Podaci o uslovima uzgoja kulture dostupni su takoĐe i za druge vrste, tj.

Chironomus tentans (4) i Chironomus yoshimatsui (11). Mora se potvrditi identifikacija vrste prije ispitivanja, ali to nije potrebno prije svakog ispitivanja ako organizmi potiču iz kulture uzgojene u laboratorijau.

2.3. Sediment

Po mogućnosti bi se trebao koristiti formulisani sediment (zvan još i obraĐeni, dodati ili sintetički sediment). Međutiim, ako se koristi prirodni sediment, on se karakteriše (barem pH, sadržaj rastvorenog ugljenika, a preporučuje se i određivanje drugih parametara kao što su odnos C/N i granulometrija) te ne smije biti kontaminiran i u njemu ne smije biti nikakvih organizama koji bi se mogli naticati sa ili jesti komarace. TakoĐe se preporučuje da se prirodni sediment, prije upotrebe u testu toksičnosti komaraca, prethodno priprema sedam dana u istim uslovima koji prevladavaju i u narednom ispitivanju. Za upotrebu u ovom ispitivanju preporučuje se sljedeći formulisani sediment, na osnovu zemljišta iz ispitne metode C.8:

(a) 4-5 % (suve mase) treseta: što je moguće bliže pH od 5,5 do 6,0; važno je da se koristi treset u obliku praha, fino usitnjen (veličine čestica ≤ 1 mm) i isključivo sušen na vazduhu.

(b) 20 % (suve mase) kaolinitske gline (sadržaj kaolinita po mogućnosti iznad 30 %).

(c) 75-76 % (suve mase) kremenog pijeska (fini bi pijesak trebao prevladavati s više od 50 posto čestica između 50 i 200 μm).

(d) Dodaje se dejonizovana voda kako bi se dobio sadržaj vlage konačne smješe u rasponu od 30 - 50 %.

(e) Dodaje se kalcijum karbonat hemisjki čiste kvaliteta (CaCO 3) kako bi se pH konačne smješe sedimenta podesila na 7,0 ± 0,5. Sadržaj organskog ugljenika konačne smješe trebao bi iznositi 2 % (± 0,5 %) i treba se prilagoditi dodavanjem odgovarajućih količina treseta i pijeska prema (a) i (c).

Treba biti poznat izvor treseta, kaolinitske gline i pijeska. Treba provjeriti nisu li komponente sedimenta hemisjki kontaminirane (npr. teški metali, organohlorna jedinjenja, organofosforni jedinjenja itd.). Primjer pripreme formulisanog sedimenta opisan je u Dodatku 3. I miješanje suvih sastojaka takoĐe je prihvatljivo ako se pokaže da nakon dodavanja vode iznad sedimenta ne dolazi do razdvajanja sastojaka sedimenta (npr. lebdenje čestica treseta) i da su treset ili sediment dovoljno prethodno pripremljeni.

Voda

Kao ispitna voda prikladna je svaka voda koja ima hemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeĐivanje koja su navedena u dodacima 2. i 4. Kao voda za uzgoj kultura i ispitna voda prikladna je svaka prikladna voda, prirodna voda (površinske ili podzemne vode), obraĐena voda (Dodatak 2.) ili dehlorirana voda iz slavine ako će komarci u njoj preživjeti tokom uzgoja kulture i ispitivanja, a da ne pokažu nikakve znake stresa. Na početku testa pH ispitne vode treba biti između 6 i 9, a ukupna tvrdoća ne viša od 400 mg/l kao CaCO3. Međutiim, ako se sumnja u postojanje interakcije između jona tvrdoće i ispitivane supstance, trebalo bi koristiti vodu manje tvrdoće (samim time, u toj se situaciji ne smije koristiti medij Elendt M4). Tokom cijele studije trebalo bi koristiti

istu vrstu vode. Najmanje dvaput godišnje ili kada se sumnja da su se svojstva kvaliteta vode navedena u Dodatku 4. značajno promijenila, treba izmjeriti ta svojstva.

Radni rastvori - sedimenti obraĐeni spikingom

Sedimenti obraĐeni spikingom odabrane koncentracije obično se pripremaju dodavanjem rastvora ispitivane supstance direktno u sediment. Radni rastvor ispitivane supstance rsdtvorene u dejonizovanoj vodi miješa se s formulisanim sedimentom valjkastim mlinom, miješalicom hrane ili ručnim miješanjem. Ako je ispitivana supstanca slabo rastvoriva u vodi, može se rastvoriti u što je moguće manjem volumenu prikladnog organskog rastvora (npr. heksan, aceton ili hlorofor). Rastvor se potom miješa s 10 g finog kremenog pijeska za jednu ispitnu posudu. Rastvarač se pusti da ispari i mora se u cijelosti ukloniti iz pijeska; potom se pijesak miješa s prikladnom količinom sedimenta po ispitnoj laboratorijaskoj čaši. Samo lako ispariva sredstva mogu se koristiti za rastvaranje, dispergiranje ili emulgiranje ispitivane supstance. Treba imati na umu da se pijesak koji nastane miješanjem ispitivane supstance i pijeska mora uzeti u obzir prilikom pripreme sedimenta (tj. sediment stoga treba pripremiti s manje pijeska). Treba se pobrinuti da se ispitivana supstanca koja se dodaje u sediment ravnodnosno rasprši u sedimentu. Ako je potrebno, mogu se analizirati i poduzorci kako bi se odredio stepen homogenosti.

2.4. Plan ispitivanja

Plan ispitivanja odnosi se na izbor broja i raspored ispitnih koncentracija, na broj posuda za svaku koncentraciju i na broj larvi po posudi. Opisani su planovi za procjenu tačke koncentracije s efektom (EC), za procjenu najviše koncentracije bez vidljivog efekata (NOEC) i za provoĐenje graničnog ispitivanja.

Plan za regresijsku analizu

Koncentracija s efektom (npr. EC 15, EC 50) i raspon koncentracije, iznad kojega je efekat ispitivane supstance od interesa, trebaju obuhvatati koncentracije uključene u ispitivanje. preciznost, a posebno valjanost, s kojom se mogu procijeniti koncentracije s efektom (EC x), poboljšavaju se kad se koncentracija s efektom nalazi unutar raspona ispitnih koncentracija. Treba izbjegavati ekstrapolaciju ispod najniže pozitivne koncentracije ili iznad najviše koncentracije. Preliminarno ispitivanje za određivanje raspona korisno je za izbor raspona koncentracija koji će se koristiti. Ako treba procijeniti ECx, treba ispitati najmanje pet koncentracija i tri višestruka određivanja. U svakom se slučaju savjetuje korištenje dovoljnog broja ispitnih koncentracija kako bi se dobila dobra procjena modela. Faktor između koncentracija ne bi smio biti veći od dva (izuzeće se može učiniti u slučajevima kada kriva odgovora na dozu ima plitak nagib). Broj višestrukih određivanja u svakom tretmanu može se sniziti ako se poveća broj ispitnih koncentracija različitog odgovora. Povećanjem broja višestrukih određivanja ili smanjivanje trajanja intervala ispitnih koncentracija obično dovodi do užih intervala pouzdanosti. Dodatna višestruka određivanja potrebna su ako treba procijeniti 10 - dnevno preživljavanje i rast larvi.

Plan za procjenu NOEC-a/LOEC-a

Ako treba procijeniti LOEC (najnižu koncentraciju s vidljivim efektom) i NOEC (najvišu koncentraciju bez vidljivog efekata), treba koristiti pet ispitnih koncentracija u najmanje četiri višestruka određivanja, a faktor između koncentracija ne bi smio biti veći od dva.

Broj višestrukih određivanja trebao bi biti dovoljan da osigura adekvatnu statističku snagu kojom će otkriti 20 % razlike od kontrolne posude pri nivou značajnosti od 5 % (p = 0,05). Kod brzine razvoja obično je prikladna analiza varijance (ANOVA), kao što su Dunnettov test i Williamsov test. Kod odnosa transformacije mogu se koristiti Cochran-Armitageov test, Fisherov test (s Bonferronijevom korekcijom) ili Mantel-Haenszelov test.

Granično ispitivanje

Može se ssprovesti granično ispitivanje (jedna ispitna koncentracija i kontrolna posuda) ako se u preliminarnom testu za određivanje raspona ne vide nikakvi efekti. Svrha graničnog ispitivanja jeste ssprovesti ispitivanje na koncentracijama dovoljno visokim da omogući donosiocima odluke da isključe moguće toksične efekte ispitivane supstance, a granica se postavlja na koncentraciju za koju se ne očekuje da će se pojaviti u bilo kojoj situaciji. Preporučuje se 1 000 mg/kg (suva masa). Obično je potrebno najmanje šest višestrukih određivanja i za ispitnu i za kontrolnu posudu. Treba pokazati adekvatnu statističku snagu kojom će se otkriti 20 % razlike od kontrolne posude pri nivou značajnosti od 5 % (p = 0,05). Kod metričkog odgovora (brzina razvoja i masa) t-test je prikladna statistička metoda ako podaci zadovoljavaju zahtjeve tog testa (normalnost, homogene varijance). Ako ti zahtjevi nisu ispunjeni, mogu se koristiti t-test nejednake varijance ili neparametarski test, kao što je Wilcoxon-Mann-Whitheyev test. Kod odnosa transformacije prikladan je Fisherov test.

2.5. Postupak

Uslovi izlaganja

Priprema sistema sediment/voda spikingom

Postupak spikinga opisan u ispitnoj metodi C.8: Toksičnost za gujavice preporučuje se za primjenu ispitivane supstance. Sedimenti obrađeni spikingom stavljaju se u posude pa se dodaje voda iznad sedimenta, i to u odnosu sedimenta i vode 1:4. Dubina sloja sedimenta trebala bi se kretati u rasponu od 1,5 - 3 cm. Da bi se izbjeglo razdvajanje sastojaka sedimenta i resuspendujenje finog materijala tokom dodavanja ispitne vode u vodeni stupac, sediment se može prekriti plastičnim diskom dok se na njega lijeva voda, a disk se miče odmah nakon toga. Mogu biti prikladni i drugi predmeti.

Ispitne posude bi trebale biti pokrivene (npr. staklenim pločama). Ako je potrebno, tokom studije se u izvorni volumen vode doliva još vode kako bi se nadomjestilo isparavanje vode. To bi se trebalo činiti pomoću destilovane ili dejonizirane vode kako bi se spriječilo stvaranje soli.

Stabilizacija

Kad se pripremi sediment postupkom spikinga s vodom iznad sedimenta, poželjno je dopustiti diobu ispitivane supstance iz tečnog stanja u sediment. To bi se po mogućnosti trebalo učiniti u uslovima temperature i dozračivanja koji se koriste u ispitivanju. Prikladno vrijeme uravnoteženja specifično je za svaki sediment i hemikaliju, a može se kretati od nekoliko sati pa sve do nekoliko dana, pa čak u rijetkim slučajevima i do nekoliko nedelja (4-5 nedelja). Budući da je time ostavljeno dovoljno vremena za razgradnju brojnih hemikalijama, ne čeka se uravnoteženje, ali se preporučuje vrijeme uravnoteženja od 48 sati. Na kraju tog dodatnog vremena

uravnoteženja treba izmjeriti koncentraciju ispitivane supstance u vodi iznad sedimenta, u sedimentu, barem u najvišoj koncentraciji i u jednoj nižoj. Ta analitička određivanja ispitivane supstance omogućuju izračun bilance mase i izražavanje rezultata na osnovu izmjerenih koncentracija.

Dodavanje ispitnih organizama

Četiri do pet dana prije dodavanja ispitnih organizama u ispitne posude, mase jajašaca bi se trebale izvaditi iz kultura i staviti u male posude u hranjivu podlogu za uzgoj kulture. Mogu se koristiti stara hranjiva podloga iz matične kulture ili svježe pripremljena hranjiva podloga za uzgoj kulture. Ako se koristi poslednja, hranjivoj podlozi za uzgoj kulture treba dodati manju količinu hrane, npr. zelenih algi i/ili nekoliko kapljica suspenzije fino usitnjenih pahuljica riblje hrane (Dodatak 2.). Treba koristiti samo svježe položene mase jajašaca. Valjenje larvi obično počinje nekoliko dana nakon polaganja jajašaca (2 do 3 dana za Chironomus riparius na 20 °C i 1 do 4 dana za Chironomus tentans na 23 °C i za Chironomus yoshimatui na 25 °C), a larve se razvijaju u četiri stadijumuma razvoja, od kojih svaki traje 4-8 dana. U ispitivanju treba koristiti larve iz prvog stadijumuma razvoja (2-3 ili 1-4 dana poslije valjenja). Stadijum mušica moguće je provjeriti pomoću širine kapsule glave.

26. Dvadeset larvi iz prvog stadijumuma razvoja stavljaju se nasumice u svaku ispitnu posudu koja sadržava vodu i sediment obrađen spikingom, i to pomoću tupe pipete. Treba zaustaviti dozračivanje vode tokom dodavanja larvi u ispitne posude i tako treba ostati još 24 sata nakon dodavanja larvi. Prema upotrijebljenom planu ispitivanja broj larvi po koncentraciji iznosi najmanje 60 za procjenu tačke EC-a i 80 za određivanje NOEC-a.

Ispitne koncentracije

Ispitivanje za određivanje raspona može biti korisno za određivanje raspona koncentracija za konačno ispitivanje. U tu se svrhu koristi niz široko razmaknutih koncentracija ispitivane supstance. Da bi se dobila ista gustina površine po komarcu, koja će se koristiti i u konačnom ispitivanju, komarci se izlažu svakoj koncentraciji ispitivane supstance tokom vremena koje omogućava procjenu odgovarajućih ispitnih koncentracija, a nisu potrebna višestruka određivanja.

O ispitnim koncentracijama za konačno ispitivanje odlučuje se na osnovu rezultata ispitivanja za određivanje raspona. Trebalo bi koristiti i odabrati najmanje pet koncentracija.

Kontrolne posude

U ispitivanje bi, s odgovarajućim brojem višestrukih određivanja, trebalo uključiti kontrolne posude bez ispitivane supstance, ali sa sedimentom. Ako se za primjenu ispitivane supstance koristilo Rastvarač, treba dodati i kontrolnu posudu s rastvaračem sedimenta.

Sistem ispitivanja

Koriste se statički sistemi. Polustatični ili protočni sistemi sa stalnim ili isprekidanim obnavljanjem vode iznad sedimenta mogu se koristiti u posebnim slučajevima, na primjer ako specifikacije kvaliteta vode postanu neprikladne za ispitni organizam ili ako

utiču na uravnoteženje hemikalije (npr. ako nivoa rastvorenog kiseonika previše padnu, ako se previše pzavisi koncentracija proizvoda izlučivanja ili ako iz sedimenta cure minerali koji utiču na pH i/ili tvrdoću vode). Međutiim, obično su dovoljno i daje se prednost drugim metodama poboljšanja kvaliteta vode iznad sedimenta, kao što je dozračivanje.

Hrana

Potrebno je hraniti larve, po mogućnosti svakodnevno ili najmanje triput nedeljno. Čini se da je riblja hrana (suspenzija u vodi fino usitnjene hrane, npr. Tetra-Min ili Tetra-Phyll) u količini od 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg za C. yoshimatui) dnevno po larvi prikladna za mlade larve prvih 10 dana. Za starije će larve biti potrebno malo više hrane: 0,5 - 1 mg dnevno po larvi trebalo bi biti dovoljno za ostatak ispitivanja. Porcije hrane treba smanjiti u svim tretmanima te kontrolisati rastu li gljivice i primijeti li se smrtnost u kontrolisanim posudama. Ako se ne može zaustaviti rast gljivica, ispitivanje treba ponoviti. Kada se ispituju jako adsorptive supstance (npr. čiji je log K ow > 5) ili supstance koje stvaraju kovalentne veze sa sedimentom, formulisanom se sedimentu prije faze stabilizacije može dodati količina hrane neophodna za osiguranje preživljavanja i prirodnog rasta organizama. U tu se svrhu, umjesto riblje hrane, mora se koristiti biljni materijal, npr. može se dodati 0,5 % (suva masa) fino usitnjenog lišća npr. velike koprive (Urtica dioica), duda (Morus alba), bijele djeteline (Trifolium repens), spanaća (Spinacia oleracea) ili nekog drugog biljnog materijala (Cerophyl ili alfa-celuloze).

Uslovi za inkubaciju

Blago dozračivanje vode iznad sedimenta u ispitnim posudama osigurava se 24 sata poslije dodavanja larvi i traje tako tokom cijelog ispitivanja (treba se pobrinuti da koncentracija rastvorenog kiseonika ne padne ispod 60 posto ASV-a). Dozračivanje se vrši putem staklene pasterove pipete pričvršćene 2-3 cm iznad sloja sedimenta (tj. jedan ili par mjehurića/s). Pri ispitivanju isparljivih hemikalijama može se pobrinuti da se ne dozračuje sistem sediment/voda.

Ispitivanje se sprovodi na konstantnoj temperaturi od 20 °C (± 2 °C). Za C. tentans i C. yoshimatui preporučene temperature su 23 °C odnosno 25 °C (± 2 °C). Koristi se fotoperiod od 16 sati, a jačina svjetlosti treba biti 500 do 1 000 luksa.

Trajanje izlaganja

Izlaganje počinje dodavanjem larvi u posude sa sedimentom obrađenim spikingom i kontrolne posude. Maksimalno trajanje izlaganja je 28 dana za C. riparius i C. yoshimatsui, a 65 dana za C. tentans. Ako se larve prije transformišu u mušice, ispitivanje se može prekinuti nakon minimalno pet dana nakon što se i zadnja ličinka u kontrolnoj posudi transformiše u odraslu životinju.

Posmatranja

Transformacija

Određuju se vrijeme razvoja i ukupni broj muških i ženskih mušica koje su se u cijelosti transformišele. Mužjaci se lako prepoznaju po svojim dlakavim ticalima.

Ispitne posude treba posmatrati najmanje triput nedeljno da bi se vizualno procijenilo svako nenormalno ponašanje (npr. napuštanje sedimenta, neuobičajeno plivanje) u poreĐenju s kontrolisanim posudama. Tokom perioda očekivane transformacije potrebno je svakodnevno brojati transformisane mušice. Svakodnevno se vodi evidencija i o polu i broju transformisanih mušica. Nakon identifikacije mušice se vade iz posuda. Treba zabilježiti sve mase jajašaca položene prije prekida ispitivanja te iste treba izvaditi kako bi se spriječilo ponovno uvođenje larvi u sediment. TakoĐe se bilježi i broj vidljivih kukuljica koje se nisu uspjele transformišeti. Smjernice o mjerenju transformacije navedene su u Dodatku 5.

Rast i preživljavanje

Ako treba dobiti podatke o 10-dnevnom preživljavanju i rastu larvi, na samom početku treba dodatne ispitne posude kako bi ih se moglo naknadno koristiti. Sediment iz tih dodatnih posuda prosijava se kroz sito od 250 µm kako bi se zadržale larve. Kriterijumi za smrt jesu nepomičnost ili izostanak reakcije na mehaničke podražaje. I neoporavljene larve treba prebrojati kao mrtve (možda su mikrobi već razgradili larve koje su uginule na početku ispitivanja). Određuje se suva masa (bez pepela) preživjelih larvi po svakoj ispitnoj posudi pa se iizračunava srednja pojedinačna suva masa po posudi. Korisno je odrediti kojem stadijumu razvoja pripadaju preživjele larve; za to se može upotrijebiti mjerenje širine kapsule glave svake larve.

Analitička mjerenja

Koncentracija ispitivane supstance

Prije početka ispitivanja (tj. dodavanja larvi) vade se uzorci cijelog sedimenta iz najmanje jedne posude po tretmanu radi analitičkog određivanja koncentracije ispitivane supstance u sedimentu. Preporučuje se da se na početku i na kraju ispitivanja analiziraju, kao minimum, uzorci vode iznad sedimenta i sedimenta, i to u najvišoj koncentraciji i u nekoj nižoj. Ta određivanja koncentracije ispitivane supstance daju informacije o ponašanju/diobi ispitivane supstance u sistemu voda/sediment.

Kada se sprovode posredna mjerenja (npr. 7. dana) te ako su za analizu potrebni veliki uzorci koji se ne mogu uzeti iz ispitnih posuda, a da to pritom ne utiče na sistem ispitivanja, analitička određivanja treba sprovoditi na uzorcima iz dodatnih ispitnih posuda koje se tretiraju na isti način (uključujući i prisustvo ispitnih organizama), ali koje se ne koriste za biološka posmatranja.

Preporučeni postupak za izoliranje međuprostorne vode je centrifugiranje na npr. 10 000 g i 4 °C tokom 30 min. Međutiim, ako se pokaže da se ispitivana supstanca ne adsorbuje na filtre, prihvatljiva bi mogla biti i filtracija. U nekim slučajevima možda neće biti moguće analizirati koncentracije jer je uzorak premalen.

Fizičko-hemisjki parametri

Na odgovarajući način treba izmjeriti pH i temperaturu u ispitnim posudama. Tvrdoću i amonijak treba mjeriti u kontrolisanim posudama i u jednoj ispitnoj posudi u najvišoj koncentraciji na početku i na kraju ispitivanja.

3.Podaci i izvještavanje

3.1. Obrada rezultata

Cilj ovog ispitivanja je odrediti efekat ispitivane supstance na brzinu razvoja i ukupni broj potpuno transformisanih muških i ženskih mušica ili, u slučaju 10- dnevnog ispitivanja, efekte na preživljavanje i masu larvi. Ako ne postoje naznake statistički različite osjetljivosti polova, rezultati mužjaka i ženki mogu se ujediniti radi statističke analize. Razlike u osjetljivosti polova mogu se statistički prosuditi, npr. tabličnim testom χ 2 -r × 2. Preživljavanje larvi i njihova srednja pojedinačna suva masa po posudi moraju se odrediti nakon deset dana kada je to potrebno.

Koncentracije s efektom izražene i ubazirajune na suvoj masi iizračunavaju se na osnovu koncentracija u sedimentu izmjerenih na početku ispitivanja.

Za iizračunavanje procjene tačke EC 50 ili bilo koje druge EC x kao dodatna ponovna određivanja mogu se koristiti statistički podaci dobijeni za svaku posudu. U izračunu intervala pouzdanosti za bilo koji EC x u obzir treba uzeti varijabilnost između posuda ili se treba pokazati da je ta varijabilnost toliko neznatna da se može ignorisati. Kad se model prilagoĐava metodi najmanjih kvadrata, na statističke podatke za svaku posudu treba primijeniti transformaciju kako bi se poboljšala homogenst varijance. Međutiim, vrijednosti EC x trebale bi se izračunati tek nakon što se odgovor transformiše natrag u izvornu vrijednost.

Kada je cilj statističke analize određivanje NOEC-a/LOEC-a testiranjem hipoteze, u obzir se mora uzeti varijabilnost meĐu posudama, npr. ugniježĐenom ANOVA-om. Kao druga mogućnost, u situacijama kada se pobiju pretpostavke uobičajene ANOVA-e, mogu biti prikladna i robusnija ispitivanja.

Odnos transformacije

Odonois transformacije su kvantalni podaci i mogu se analizirati Cochran-Armitageovim testom koji se primjenjuje snižavanjem korak po korak kada se očekuje odgovor na monotoničnu dozu i kad se ti podaci slažu s tim očekivanjem. Ako to nije slučaj, mogu se koristiti Fisherov test ili Mantel-Haenszelov test s Bonferroni-Holmovim prilagoĐenim pvrijednostima. Ako ima dokaza za još veću varijabilnost između višestrukih određivanja u istoj koncentraciji nego što bi to naznačila binomijalna raspodjela (često zvana i „ekstrabinomijalna‖ varijacija), treba primijeniti robusni Cochran-Armitageov ili Fisherov test.

Određuje se broj mušica transformisanih po posudi, n_e, koji se onda dijeli brojem uvedenih larvi, na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

gdje je:

ER = odnos transformacije n_e = broj transformisanih mušica po posudi n_a = broj

uvedenih larvi po posudi

Najprikladnija alternativa za velike uzorke, kada postoji ekstra-binomijalna varijanca, je tretirati odnos transformacije kao kontinuirani odgovor te primijeniti postupke poput

Williamovog testa kada se očekuje odgovor na monotoničnu dozu i kad je isti u skladu s tim ER podacima. Dunnettov bi test bio prikladan gdje nema monotoničnosti. Veliki uzorak se ovdje definiše kao broj transformisanih mušica i broj netransformisanih mušica veći od pet, i to na osnovi ponovljenog određivanja (posude).

Za primjenu vrijednosti ANOVA vrijednosti ER-a moraju se prvo transformisati arkus sinus drugi korijen transformacijom ili Freeman-Tukeyovom transformacijom kako bi se dobila približna normalna raspodjela i ujednačile varijance. Kad se koriste apsolutne frekvencije, mogu se primijeniti Cochran- Armitageov, Fisherov (Bonferronijev) ili Mantel-Haenszelov test. Arkus sinus drugi korijen transformacija primjenjuje se tako što se uzme inverzni sinus (sin – 1) drugog korijena ER-a.

Za odnose transformacije vrijednosti EC x računaju se regresijskom analizom (ili npr. probit, logit, Weibull, prikladan komercijalni softver itd.). Ako regresijka analiza ne uspije (npr. kad imamo manje od dva djelimična odgovora), koriste se druge neparametarske metode, kao što je jednostavna interpolacija.

Brzina razvoja

Srednje vrijeme razvoja predstavlja srednji raspon vremena između uvođenja larvi (0. dan ispitivanja) i njihove transformacije u eksperimentalnu grupu mušica. (Za iizračunavanje stvarnog vremena razvoja u obzir treba uzeti starost larvi u trenutku uvođenja). Brzina razvoja recipročna je vremenu razvoja (jedinica: 1/dan) i predstavlja dio razvoja larvi koji se odvija tokom jednog dana. Brzina razvoja preferira se za evaluaciju ovih studija o toksičnosti sedimenta jer je njena varijanca niža, a homogenija je i bliža normalnoj raspodjeli u poreĐenju s vremenom razvoja. Stoga se mogu koristiti moćni postupci parametarskih testova s brzinom razvoja radije nego s vremenom razvoja. Za brzinu razvoja kao kontinuirani odgovor mogu se procijeniti vrijednosti EC x regresijskom analizom.

Za sljedeće statističke testove pretpostavlja se da se broj mušica identifikovan na dan pregleda x transformisao u srednjem vremenskom intervalu između dana x i dana x - l (l = trajanje intervala pregleda, obično 1 dan). Srednja brzina razvoja po posudi (x) računa se prema:

$$x = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

gdje je:

x: srednja brzina razvoja po posudi, i: indeks intervala pregleda, m: maksimalni broj intervala pregleda, f i : broj mušica transformisanih u intervalu pregleda i $_{ne}$: ukupni broj mušica transformisanih na kraju eksperimenta (= P f i), x i : brzina razvoja mušica transformisanih u intervalu i

$$x_i = \frac{1}{day_i - \frac{1_i}{2}}$$

gdje je:

day i : dan pregleda (dani od primjene), l i : trajanje intervala pregleda i (dani, obično 1

dan)

Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju mora sadržavati barem sljedeće podatke:

Ispitivana supstanca:

— fizičko stanje i, gdje je relevantno, fizičko-hemijska svojstva (rastvorljivost u vodi, napon pare, podioni koeficijent u zemljištu (ili u sedimentu ako postoji), stabilnost u vodi itd.);

— podaci za identifikaciju hemikalije (hemisjki naziv, CAS broj itd.), uključujući i čistoću i analitičku metodu kvantifikacije ispitivane supstance.

Ispitne vrste:

— korištene ispitne životinje: vrsta, naučni naziv, izvor organizama i uslovi uzgoja;

— podaci o rukovanju masama jajašaca i ličinkama;

— starost ispitnih životinja u trenutku unošenja u ispitne posude.

Uslovi ispitivanja:

— korišteni sediment, tj. prirodni ili formulisani sediment;

— za prirodni sediment lokacija i opis mjesta uzorkovanja sedimenta, uključujući, po mogućnosti, istoriju zagaĐenja, svojstva: pH, sadržaj organskog ugljenika, odnos C/N i granulometrija (ako je prikladno);

— priprema formulisanog sedimenta: sastojci i svojstva (sadržaj organskog ugljenika, pH, vlaga itd. na početku ispitivanja);

— priprema ispitne vode (ako se koristi obraĐena voda) i svojstva (koncentracija kiseonika, pH, provodljivost, tvrdoća itd. na početku ispitivanja);

— dubina sedimenta i vode iznad sedimenta;

— volumen vode iznad sedimenta, masa mokrog sedimenta;

— ispitne posude (materijal i veličina);

— metoda obraĐivanja sedimenta spikingom: korištene ispitne koncentracije, broj višestrukih određivanja i upotreba rastvora, ako je isti korišten;

— faza stabilizacionog uravnoteženja sistema sediment/voda obraĐenog spikingom: trajanje i uslovi;

— uslovi inkubacije: temperatura, ciklus i jačina svjetlosti, dozračivanje (učestalost i intenzitet);

— detaljni podaci o hranjenju, uključujući i vrstu hrane, pripremu, količinu i režim hranjenja.

Rezultati:

— nazivne ispitne koncentracije, izmjerene ispitne koncentracije i rezultati svih analiza za određivanje koncentracije ispitivane supstance u ispitnoj posudi;

— kvalitet vode u ispitnim posudama, tj. pH, temperatura, rastvoreni kiseonik, tvrdoća i amonijak;

—dolijevanje isparene ispitne vode, ako je bilo;

— broj transformisanih muških i ženskih mušica po posudi i po danu;

— broj larvi koje se nisu transformisale u mušice po posudi;

— srednja pojedinačna suva masa larvi po posudi i po stadijumu razvoja, ako je to primjereno;

— postotak transformacije po odreĐivanju i ispitnoj koncentraciji (muške i ženske mušice zajedno);

— srednja brzina razvoja potpuno transformisanih mušica po odreĐivanju i brzina tretmana (muške i ženske mušice zajedno);

— procjena toksičnih konačnih efekata, npr. ECx (i s time povezani intervali pouzdanosti), NOEC i/ili LOEC, te statističke metode korištene za njihovo određivanje;

— rasprava o rezultatima, uključujući i svaki uticaj na rezultate ispitivanja nastao uslijed odstepena od ove ispitne metode.

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Za potrebe ove ispitne metode koriste se sljedeće definicije:

Formulisani sediment ili obraĐeni, dodati ili sintetički sediment je smješa supstance koja se koristi za imitiranje fizičkih sastojaka prirodnog sedimenta.

Voda iznad sedimenta je voda koja se ispitnoj posudi nalazi iznad sedimenta.

MeĐuprostorna voda je voda u prostoru između sedimenta i čestica zemljišta.

Sediment obraĐen spikingom je sediment u koji je dodata ispitivana supstanca.

Dodatak 2.

Preporuke za uzgoj kulture Chironomus riparius

Larve vrste Chironomus mogu se uzgajati u posudama za kristalizaciju ili velikim rezervoarima. Fini kremeni pijesak nanese se u tankom sloju dubine oko 5 do 10 mm po dnu rezervoara. TakoĐe se pokazalo da je dijatomejska zemlja (npr. Merck, Art 8117) prikladan supstrat (dovoljan je tanji sloj od svega par mm). Potom se dodaje prikladna voda u dubini od nekoliko cm. Trebalo bi dolijevati vodu po potrebi kako bi se zamijenila voda izgubljena isparavanjem i spriječilo isušivanje. Voda se po potrebi može dolijevati. Treba osigurati blago dozračivanje. Posude za uzgoj larvi trebale bi se držati u prikladnom kavezu koji će spriječiti bijeg transformisanih odraslih životinja. Kavez treba biti dovoljno velik da se transformisane odrasle životinje mogu rojiti, u protivnom možda neće doći do kopulacije (minimalno oko 30 × 30 × 30 cm).

Kaveze treba držati na sobnoj temperaturi ili u prostoriji s konstantnim uslovima okruženja na 20 ± 2 °C s fotoperiodom od 16 sati svjetlosti (jačine oko 1 000 luksa), 8 sati mraka. Iz raznih izvještaja ukazano je da vlažnost vazduha ispod 60 % RV može spriječiti razmnožavanje.

Voda za razrjeĐivanje

Može se koristiti bilo koja prikladna prirodna ili sintetička voda. Obično se koriste izvorska voda, dehlorirana voda iz slavine i ubačeni medijumumi (npr. medijumum Elendt „M4‖ ili „M7‖ , vidjeti u nastavu teksta). Voda se prije upotrebe mora dozračiti. Ako je to potrebno, voda za uzgoj kulture može se obnoviti pažljivim izlijevanjem korištene vode iz posuda za uzgoj kulture, direktno ili putem sifona, da se pritom ne unište cjevčice s ličinkama.

Hranjenje larvi

Larve vrste Chironomus treba hraniti pahuljicama riblje hrane (Tetra Min®, Tetra Phyll® ili neka druga slična robna marka riblje hrane), i to otprilike 250 mg dnevno po posudi. Hrana se može dati i kao suvi usitnjeni prah ili kao suspenzija u vodi: 1,0 g pahuljaste hrane doda se u 20 ml vode za razrjeĐivanje i izmiješa u homogenu smješu. Ta se smješa može dodavati brzinom od oko 5 ml dnevno po posudi (protresti prije upotrebe). Starije larve mogu dobiti više hrane.

Hranjenje se prilagoĐava kvalitetu vode. Ako hranjiva podloga za uzgoj kultura postane „mutna‖ , treba smanjiti hranjenje. Dodavanje hrane mora se pažljivo nadzirati. Premalo hrane dovest će do prebacivanja larvi prema vodenoj koloni, a previše hrane dovest će do povećane aktivnosti mikroba i sniženih koncentracija kiseonika. Oba ta uslova mogu dovesti do sniženih brzina rasta.

TakoĐe se mogu dodati i ćelije nekih zelenih algi (npr. Scenedesmus subspicatus, Chlorella vulgaris) kada se postavljaju nove posude za uzgoj kultura.

Hranjenje transformisanih odraslih životinja

Neki izvoĐači eksperimenta sugerirali su da bi vuneni podložak namočen u zasićenom šećernom rastvoru mogao poslužiti kao hrana za transformisane odrasle životinje.

Transformacija

Na 20 ± 2 °C larve se počinju transformisati u odrasle životinje iz posuda za uzgoj larvi nakon otprilike 13 - 15 dana. Mu

Mase jajašaca

Kad se u kavezu za uzgoj pojave odrasle životinje, u svim posudama za uzgoj larvi triput nedeljno treba provjeravati ima li položenih želatinoznih masa jajašaca. Ako ima masa jajašaca, njih treba pažljivo ukloniti. Treba ih prenijeti u malu posudu u kojoj se nalazi uzorak vode za uzgoj. Te se mase jajašaca koriste za postavljanje nove posude za uzgoj kulture (npr. 2 - 4 mase jajašaca/posudi) ili se koriste za testove toksičnosti.

Valjenje larvi u prvom stadijumumu razvoja trebalo bi se zbiti nakon 2 - 3 dana.

Postavljanje novih posuda za uzgoj kulture

Kad se kulture razviju, trebalo bi biti moguće postaviti novu posudu za uzgoj kulture jedanput nedeljno ili rjeĐe, u zavisnosti od potreba ispitivanja, i ukloniti starije posude nakon što se larve transformišu u odrasle mušice. Na taj će se način uz minimalno upravljanje stvoriti redovna zaliha odraslih životinja.

Priprema ispitnih rastvor „M4|| i „M7||

Elendt (1990.) je opisao medijumum „M4|| . Medijumum „M7|| priprema se kao medijumum „M4|| , osim za supstance iz tabele 1., za koje su koncentracije četiri puta niže u „M7|| od onih u „M4|| . Ispitni rastvor ne treba pripremati prema Elendtu i Biasu (1990.) jer koncentracije NaSiO3 5 H 2 O, NaNO3, KH2PO4 i K2HPO4 navedene za pripremu radnih rastvora nisu adekvatne.

Priprema medija „M7||

Svaki se radni rastvor (I) priprema posebno, a kombinovani radni rastvor (II) priprema se iz tih radnih rastvora (I) (vidjeti tabelu 1.). Za pripremu medijumuma „M7|| miješa se pedeset ml kombinog radnog rastvora (II) i količine svakog radnog rastvora makronutrijenata navedene u tabeli 2. do ukupno 1 litre dejonizirane vode. Vitaminski radni rastvor priprema se dodavanjem triju vitamina u dejoniziranu vodu, kao što je naznačeno u tabeli 3., a 0,1 ml kombinujene vitaminske radne rastvori dodaje se konačnom medijumu „M7|| tik prije upotrebe. (Vitaminska radna rastvor čuva se zamrznuta u malim alikvotima). Medijumum se dozrači i stabilizira.

Tabela 1: Radni rastvori elemenata u tragovima za medijumume M4 i M7

Radni rastvori	Količina (mg) od koje se umiješa do 1 litre dejonizirane vode	Za pripremu kombinovanog radnog rastvora: pomiješajte sljedeće količine (mg) radnih rastvora u do 1 litre dejonizirane vode	Konačne koncentracije u ispitnim rastvorima (mg/l)

		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6 H_2O$	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2 H_2O$	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6 H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2 H_2O$	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

Tabela 2. Radni rastvori makronutrijenata za medijumume M4 i M7

	Količina od koje se umiješa do 1 litre dejonizirane vode (mg)	Količina radnih rastvora makronutrijenata koja se dodaje za pripremu medijumuma M4 i M7 (ml/l)	Konačne koncentracije u ispitanim rastvorima M4 i M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	246 600	0,5	123,3
KC1	58 000	0,1	5,8

$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

Tabela 3: Vitaminski radni rastvor za medijumume M4 i M7. Sva tri vitaminska rastvora kombinuju se u jedna vitaminski radnu rastvor

	Količina od koje se umiješa do 1 litre dejonizirane vode (mg)	Količina vitaminskog radnog rastvora koja se dodaje za pripremu medijumuma M4 i M7 (ml/l)	Konačne koncentracije u ispitnim rastvorima M4 i M7 (mg/l)
Tiaminhidrohlorid	750	0,1	0,075
Cijanokobalamin	10	0,1	0,0010
(B12)			
Biotin	7,5	0,1	0,00075

Dodatak 3.

PRIPREMA FORMULISANOG SEDIMENTA Sastav sedimenta

Formulisani sediment trebao bi imati sljedeći sastav:

Sastojak	**Svojstva**	**% sedimenta suva masa**
Treset	Sphagnum moss treset, što bliže pH području od 5,5-6,0, bez vidljivih ostataka biljaka, fino usitnjen (veličina čestica ≤ 1 mm) i sušen na vazduhu	4 - 5

Kremeni pijesak	Veličina zrna: > 50 % čestica trebalo bi biti u rasponu od 50-200 µm	75 - 76
Kaolinitska glina	Sadržaj kaolinita ≥ 30 %	20
Organski ugljenik	PrilagoĐava se dodavanjem treseta i pijeska	2 (± 0,5)
Kalcijum karbonat	$CaCO_3$, u prahu, hemijski čist	0,05 (- 0,1)
Voda	Provodljivost ≤ 10 µS/cm	30 (- 50)

Priprema

Treset se suši na vazduhu i usitnjava u fini prah. Priprema se suspenzija potrebne količine treseta u prahu u dejonozovanoj vodi pomoću uređaja za homogenizaciju visoke djelotvornosti. pH te suspenzije podešava se u području od 5,5 ± 0,5 pomoću $CaCO_3$. Suspenzija se priprema najmanje dva dana blagim miješanjem na 20 ± 2 °C kako bi se stabilizovala pH i uspostavila stabilna mikrobna komponenta. pH se ponovno mjeri i trebala bi iznositi 6,0 ± 0,5. Potom se suspenzija treseta miješa s ostalim sastojcima (pijeskom i kaolinitskm glinom) i dejonizovanom vodom da bi se dobio homogeni sediment sa sadržajem vode u području od 30 - 50 posto suve mase sedimenta. Još jednom se mjeri pH konačne smješe i podešava na 6,5 do 7,5 pomoću $CaCO_3$ ako je potrebno. Uzimaju se uzorci sedimenta kako bi se odredili suva masa i sadržaj organskog ugljenika. Potom se preporučuje da se formulisani sediment, prije upotrebe u testu toksičnosti komaraca, priprema sedam dana u istim uslovima koji prevladavaju i u naknadnom ispitivanju.

Skladištenje

Suvi sastojci za pripremu unešenog sedimenta mogu se skladištiti na suvom i hladnom mjestu na sobnoj temperaturi. Formulisani (mokri) sediment ne bi trebalo skladištiti prije upotrebe u ispitivanju. Njega bi trebalo iskoristiti nakon perioda pripremanja od sedam dana koje završava pripremu.

Dodatak 4.

Hemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje

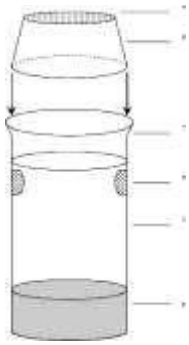
Supstanca	**Koncentracija**
Lebdeće čestice	< 20 mg/l
Ukupni organski ugljenik	< 2 mg/l
Neijonizovani amonijak	< 1 µg/l

Tvrdoća kao $CaCO_3$	< 400 mg/l[62]
Rezidualni hlor	< 10 µg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
Ukupni organofosforni pesticidi plus polihlorovani bifenili	< 50 ng/l
Ukupni organski hlor	< 25 ng/l

Dodatak 5.

Smjernice za praćenje transformaciju larvi komaraca

U ispitne laboratorijaske čaše postave se zamke za transformaciju životinje. Te su zamke potrebne od 20. dana do kraja ispitivanja. Slijedi crtež primjera korištenih zamki:



A: najlonski zaslon

B: obrnute plastične čaše

C: laboratorijaska čaša za izlaganje bez usnika

D: priključci na zaslonu za promjenu vode

E: voda

F: sediment

C.28. TEST TOKSIČNOSTI KOMARACA (CHIRONOMIDAE) U VODI IZ SEDIMENTA S VODOM OBRAĐENOM SPIKINGOM

1. Uvod

Ova ispitna metoda odgovara OECD TG 219 (2004.). Ova je ispitna metoda namijenjena procjeni efekata produženog izlaganja hemikalijama ličinkama slatkovodnih dvokrilaca trzalaza (Chironomus sp) koje borave u sedimentu. Uglavnom se bazira se na smjernici BBA u kojoj se koristi sistem ispitivanja sediment/voda sa dodatom zemljom i scenarijum izlaganja u vodenoj koloni. Ona takođe uzima u obzir i postojeće protokole testova toksičnosti za Chironomus riparius i Chironomus tentans.

[62] MeĆutim, treba imati na umu da, ako se sumnja u postojanje interakcije izmeĆu jona tvrdoće i ispitivane supstance, trebalo bi koristiti vodu manje tvrdoće (u toj se situaciji stoga ne smije koristiti medijum Elendt M4).

Mogu se koristiti i druge vrste komaraca o kojima postoji dobra dokumentacija, npr. Chironomus yoshimatsui.

Scenarijum izlaganja koji se koristi u ovoj ispitnoj metodi jeste obraĐivanje vode spikingom. Izbor prikladnog scenarijuma izlaganja zavisi od cilja sprovođenja testa. Cilj scenarijuma izlaganja u vodi, uključujući i obrade vodene kolone spikingom, jeste simulirati rasap pesticida, a obuhvata i početne vršne koncentracije u meĐuvodi. Koristan je i za druge vrste izlaganja (uključujući i izlijevanja hemikalijama), osim procesa akumulacije koji traju duže od perioda ispitivanja.

Supstance koje treba ispitati na organizme koji žive u sedimentu obično u njemu opstaju tokom dužih perioda. Organizmi iz sedimenta mogu se izlagati na razne načine. Relativna važnost svakog načina izlaganja i vrijeme potrebno da bi svaki od tih načina doprinio opštim efektima toksičnosti zavise od fizičko-hemijskih svojstava predmetne hemikalije. Za jako adsorptivne supstance (npr. s log K ow > 5) ili za supstance koje se vežu sa sedimentom kovalentnim vezama značajan način izlaganja može biti gutanje kontaminirane hrane. Kako se ne bi podcijenila toksičnost jako lipofilnih supstance, može se u obzir uzeti upotreba hrane koja se dodaje sedimentu prije primjene ispitivane supstance. Da bi se u obzir uzeli svi potencijalni načini izlaganja, ova se ispitna metoda usrednjava na dugotrajno izlaganje. Test traje u rasponu od 20 - 28 dana za C. riparius i C. yoshimatsui, a 28 - 65 dana za C. tentans. Ako su za neku specifičnu svrhu potrebni kratkotrajni podaci, na primjer radi istraživanja efekata nestabilnih hemikalijama, višestruka određivanja mogu se ukinuti nakon deset dana.

Izmjereni konačni efekti jesu ukupni broj odraslih životinja transformisanih u vrijeme transformacije. Preporučuje se da se preživljavanje i rast larvi mjere tek nakon deset dana ako su potrebni dodatni kratkotrajni podaci, i to pomoću dodatnih višestrukih određivanja, ako je to prikladno.

Preporučuje se upotreba formulisanog sedimenta. Formulisani sediment ima nekoliko prednosti nad prirodnim sedimentima:

— eksperimentalna varijabilnost je smanjena jer stvarna mjerno obnovljivu „standardizovanu matricu‖ te se eliminiše potreba za pronalaženjem nekontaminiranih i čistih izvora sedimenta;

— testovi se mogu sprovoditi u bilo koje doba, a da se pritom ne suočava sa sezonskom varijabilnošću u ispitnom sedimentu, a nema ni potrebe za prethodnom obradom sedimenta radi uklanjanja uroĐene faune; upotreba formulisanog sedimenta takoĐe snižava troškove povezane s terenskim prikupljanjem dovoljnih količina sedimenta za rutinsko testiranje;

— upotreba formulisanog sedimenta omogućava uporeĐivanje toksičnosti i klasifikovanje supstance u skladu s tim: podaci o toksičnosti iz testova s prirodnim i dodatim sedimentom mogli su se uporediti za nekoliko hemikalijama.

Korištene definicije navedene su u Dodatku 1.

2. Načelo ispitivanja

Larve komaraca u prvom stadijumu razvoja izlažu se rasponu koncentracija ispitivane supstance u sistemima sediment/voda. Ispitivanje počinje stavljanjem larvi u prvom stadijumu razvoja u ispitne laboratorijaske čaše u kojima se nalazi sistem sediment/voda i naknadnom obradom ispitivane supstance u vodi spikingom. Na kraju testa mjeri se brzina transformacije i razvoja komaraca. TakoĐe se mogu mjeriti i preživljavanje i masa larvi nakon deset dana, ako je to potrebno (pomoću dodatnih višestrukih određivanja, ako je to primjereno). Ti se podaci analiziraju bilo modelom regresijske analize s ciljem određivanja koncentracije koja bi izazvala × % smanjenje u transformaciji, preživljavanju ili rastu larvi (npr. EC 15, EC 50 itd.) bilo statističkim hipotetskim testiranjem s ciljem određivanja NOEC-a/LOEC-a. Za poslednje je potrebno poređenje vrijednosti efekata s kontrolisanim vrijednostima pomoću statističkih testova.

2.1. Informacije o ispitivanoj supstanci

Trebali bi biti poznati rastvorljivost ispitivane supstance u vodi, njen napon pare, izmjerena ili izračunata dioba u sedimentu i stabilnost u vodi i sedimentu. Treba biti dostupna pouzdana analitička metoda kvantifikacije ispitivane supstance u vodi iznad sedimenta, meĐuvodi i sedimentu, zajedno s poznatom i prijavljenom preciznošću i granicama detekcije. Korisne informacije obuhvataju strukturnu formulu i čistoću ispitivane supstance. Korisna informacija je još i hemijska sudbina ispitivane supstance (npr. rasipanje, abiotička i biotička razgradnja itd.). Dalje smjernice za testiranje supstance čija su fizičko- hemijska svojstva takva da je zbog njih teško sprovoditi testove nalaze se niže.

2.2. Referentne hemikalije

Referentne hemikalije mogu se ispitivati periodično kako bi se obezbijedila pouzdanost protokola i uslova ispitivanja. Primjeri referentnih toksičnih supstanci koji se uspješno koriste u prstenastim testovima i validacionim studijama jesu: lindan, trifluralin, pentahlorofenol, kadmijum hlorid i kalijum hlorid.

Valjanost ispitivanja

Da bi test bio valjan, primjenjuju se sljedeći uslovi:

— postotak transformacije u kontrolisanim posudama mora na kraju testa iznositi najmanje 70 %.;

— transformacija vrsti C. riparius i C. yoshimatsui u odrasle životinje u kontrolisanim posudama treba se odviti između 12. i 23. dana nakon njihova unošenja u posude; za vrstu C. tentans potrebno je period od 20 do 65 dana.

— na kraju testa treba u svakoj posudi izmjeriti pH i koncentraciju rastvorenog kiseonika. Koncentracija kiseonika treba iznositi najmanje 60 % vrijednosti zasićenosti kiseonikom
(ASV) na određenoj temperaturi, a pH vode iznad sedimenta treba biti u rasponu od 6-9 u svim ispitnim posudama;

— temperatura vode ne bi se smjela razlikovati za više od ± 1,0 °C. Temperatura vode može se kontrolisati izotermičkom sobom i u tom slučaju temperatura u prostoriji treba se potvrĐivati u odgovarajućim vremenskim razmacima.

2.3. Opis metode

Ispitne posude

Studija se sprovodi u staklenim laboratorijaskim čašama od 600 ml prečnika 8 cm. Prikladne su i druge posude, ali se mora zagarantovati da je i u njima prikladna dubina sedimenta i vode iznad sedimenta. Površina sedimenta mora biti dovoljno velika da po svakoj larvi bude 2 do 3 cm 2 površine. Odnos dubine sloja sedimenta i dubine vode iznad sedimenta treba biti 1:4. Ispitne posude i druga aparatura koja dolazi u doticaj sa sistemom ispitivanja treba biti napravljena u cijelosti od stakla ili nekog drugog hemisjki inertnog materijala (npr. teflona).

Izbor vrste

Vrsta koju treba koristiti u ovom testu po mogućnosti je Chironomus riparius. I vrsta Chironomus tentans takođe je prikladna, ali je njome teže rukovati te je za nju potrebno duže vrijeme ispitivanja. Može se koristiti i vrsta Chironomus yohimatsui. Pojedinosti o metodi uzgoja kulture nalaze se u Dodatku 2. za vrstu Chironomus riparius. Podaci o uslovima uzgoja kulture dostupni su takođe i za druge vrste, tj. Chironomus tentans i Chironomus yoshimatsui. Mora se potvrditi identifikacija vrste prije ispitivanja, ali to nije potrebno prije svakog ispitivanja ako organizmi potiču iz kulture uzgojene u laboratorijau.

Sediment

Po mogućnosti bi se trebao koristiti formulisani sediment (obrađeni, dodati ili sintetički sediment). Međutiim, ako se koristi prirodni sediment, isti se karakteriše (pH, sadržaj rastvorenog ugljenika, a preporučuje se i određivanje drugih parametara kao što su odnos C/N i granulometrija) te ne smije biti kontaminiran i u njemu ne smije biti nikakvih organizama koji bi se mogli takmičiti sa ili jesti komarace. Takođe se preporučuje da se prirodni sediment, prije upotrebe u testu toksičnosti komaraca, prethodno priprema sedam dana u istim uslovima koji prevladavaju i u narednom ispitivanju. Za upotrebu u ovom ispitivanju preporučuje se sljedeći formulisani sediment, na osnovu dodatog zemljišta iz ispitne metode C.8:

(a) 4-5 % (suve mase) treseta: što je moguće bliže pH od 5,5 do 6,0; važno je da se koristi treset u obliku praha, fino usitnjen (veličine čestica ≤ 1 mm) i isključivo sušen na vazduhu.

(b) 20 % (suve mase) kaolinitske gline (sadržaj kaolinita po mogućnosti iznad 30 %).

(c) 75-76 % (suve mase) kremenog pijeska (fini bi pijesak trebao prevladavati s više od 50 % čestica između 50 i 200 μm).

(d) Dodaje se dejonizovana voda kako bi se dobila vlaga konačne smješe u rasponu od 30 - 50 %.

(e) Dodaje se kalcijum karbonat hemisjki čistog kvaliteta (CaCO 3) kako bi se pH konačne smješe sedimenta podesila na 7,0 ± 0,5.

(f) Sadržaj organskog ugljenika konačne smješe trebao bi iznositi 2 % (± 0,5 %) i treba se prilagoditi dodavanjem odgovarajućih količina treseta i pijeska prema (a) i (c).

Izvor treseta se mora znati, kaolinitske gline i pijeska. Treba provjeriti nisu li komponente sedimenta hemisjki kontaminirane (npr. teški metali, organohlorna jedinjenja, organofosforna jedinjenja itd.). Primjer pripreme formulisanog sedimenta opisan je u Dodatku 3. i miješanje suvih sastojaka takođe je prihvatljivo ako se pokaže da nakon dodavanja vode iznad sedimenta ne dolazi do razdvajanja sastojaka sedimenta (npr. lebdenje čestica treseta) i da su treset ili sediment dovoljno prethodno pripremljeni.

Voda

Kao ispitna voda prikladna je svaka voda koja ima hemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje koja su navedena u dodacima 2. i 4. Kao voda za uzgoj kultura i ispitna voda prikladna je svaka prikladna voda, prirodna voda (površinske ili podzemne vode), obrađena voda (Dodatak 2.) ili dehlosana voda iz slavine ako će komarci u njoj preživjeti tokom uzgoja kulture i ispitivanja, a da ne pokažu nikakve znake stresa. Na početku testa pH ispitne vode treba biti između 6 i 9, a ukupna tvrdoća ne viša od 400 mg/l kao CaCO 3. Međutiim, ako se sumnja u postojanje interakcije između jona tvrdoće i ispitivane supstance, trebalo bi koristiti vodu manje tvrdoće (u toj se situaciji stoga ne smije koristiti medijumum Elendt M4). Tokom cijele studije trebalo bi koristiti istu vrstu vode. Najmanje dvaput godišnje ili kada se sumnja da su se svojstva kvaliteta vode navedena u Dodatku 4. značajno promijenila, treba izmjeriti ta svojstva.

Radni rastvori - voda obrađena spikingom

Ispitne koncentracije iizračunavaju se na osnovu koncentracija u vodenoj koloni, tj. u vodi iznad sedimenta. Ispitni rastvori u odabranoj koncentraciji pripremaju se razrjeđivanjem radnih rastvora. Radne rastvore trebalo bi pripremiti rastvaranjem ispitivane supstance u ispitnom medijumumu. Možda će u nekim slučajevima biti potrebno upotrijebiti rastvor ili dispergente kako bi se dobio koncentrisani radni rastvor. Primjeri rastvora jesu: aceton, etanol, metanol, etilen glikol monoetil eter, etilen glikol dimetil eter, dimetilformamid i trietilen glikol. Dispergenti koji se mogu koristiti jesu Cremophor RH40, Tween 80, metil-celuloza 0,01 % i HCO-40. Koncentracija rastvarajućeg sredstva u konačnom ispitnom medijumumu trebala bi biti minimalna (tj. ≤ 0,1 ml/l) i trebala bi biti ista u svim tretmanima. Kada se koristi rastvarajuće sredstvo, ono ne smije imati nikakve značajne efekte na preživljavanje ili nikakav vidljiv negativan efekat na larve komaraca, što se otkriva kontrolom samo sa rastvaračem.

2.4 Plan ispitivanja

Plan ispitivanja odnosi se na izbor broja i rasporeda ispitnih koncentracija, na broj posuda za svaku koncentraciju i na broj larvi po posudi. Opisani su planovi za procjenu tačke koncentracije s efektom (EC), za procjenu najviše koncentracije bez vidljivog efekata (NOEC) i za sprovođenje graničnog ispitivanja. Regresijskoj se analizi daje prednost nad pristupom testiranja hipoteze.

Plan za regresijsku analizu

Koncentracija s efektom (npr. EC 15, EC 50) i raspon koncentracije, iznad kojega je efekat ispitivane supstance od interesa, trebaju obuhvatati koncentracije uključene u

ispitivanje. preciznost, a posebno valjanost, s kojom se mogu procijeniti koncentracije s efektom (EC x), poboljšavaju se kad se koncentracija s efektom nalazi unutar raspona ispitnih koncentracija. Treba izbjegavati ekstrapolaciju ispod najniže pozitivne koncentracije ili iznad najviše koncentracije. Preliminarno ispitivanje za određivanje raspona korisno je za izbor raspona koncentracija koji će se koristiti (vidjeti stav 27.).

19. Ako treba procijeniti EC x, treba ispitati najmanje pet koncentracija i tri višestruka određivanja. U svakom se slučaju savjetuje korištenje dovoljnog broja ispitnih koncentracija kako bi se dobila dobra procjena modela. Faktor između koncentracija ne bi smio biti veći od dva (izuzeće se može učiniti u slučajevima kada kriva odgovora na dozu ima plitak nagib).
Broj višestrukih određivanja u svakom tretmanu može se sniziti ako se poveća broj ispitnih koncentracija različitog odgovora. Povećanjem broja višestrukih određivanja ili smanjivanje trajanja intervala ispitnih koncentracija obično dovodi do užih intervala pouzdanosti. Dodatna višestruka određivanja potrebna su ako treba procijeniti 10 - dnevno preživljavanje i rast larvi.

Plan za procjenu NOEC-a/LOEC-a

Ako treba procijeniti LOEC/NOEC (najnižu koncentraciju s vidljivim efektom/najvišu koncentraciju bez vidljivog efekata), treba koristiti pet ispitnih koncentracija u najmanje četiri višestruka određivanja, a faktor između koncentracija ne bi smio biti veći od dva. Broj višestrukih određivanja trebao bi biti dovoljan da osigura adekvatnu statističku snagu kojom će se otkriti 20 % razlike od kontrolne posude pri nivou značajnosti od 5 % (p = 0,05). Kod brzine razvoja obično je prikladna analiza varijance (ANOVA), kao što su Dunnettov test i Williamsov test. Kod odnosa transformacije mogu se koristiti Cochran-Armitageov test, Fisherov test (s Bonferronijevom korekcijom) ili Mantel-Haenszelov test.

Granično ispitivanje

Može se sprovesti granično ispitivanje (jedna ispitna koncentracija i kontrolna posuda) ako se u preliminarnom testu za određivanje raspona ne vide nikakvi efekti. Cilj graničnog ispitivanja jeste naznačiti da je vrijednost toksičnosti ispitivane supstance veća od ispitivane granične koncentracije. Obično je potrebno najmanje šest višestrukih određivanja i za ispitnu i za kontrolnu posudu. Treba pokazati adekvatnu statističku snagu kojom će se otkriti 20 % razlike od kontrolne posude pri nivou značajnosti od 5 % (p = 0,05). Kod metričkog odgovora (brzina razvoja i masa) t-test je prikladna statistička metoda ako podaci zadovoljavaju zahtjeve tog testa (normalnost, homogene varijance). Ako ti zahtjevi nisu ispunjeni, mogu se koristiti t-test nejednake varijance ili neparametarski test, kao što je Wilcoxon-Mann-Whitheyev test. Kod odnosa transformacije prikladan je Fisherov test.

2.5. Postupak

Uslovi izlaganja

Priprema sistema voda/sediment obrađenog spikingom

Odgovarajuće količine formulisanog sedimenta dodaju se u ispitne posude gdje prave sloj debljine najmanje 1,5 cm. Voda se doliva do 6 cm. Odnos debljine sloja sa sedimentom i dubine vode ne bi smio premašivati 1:4, a sloj sa sedimentom ne bi

trebao biti deblji od 3 cm. Sistem sediment/voda treba blago dozračivati sedam dana prije dodavanja ispitnih organizama. Da bi se izbjeglo razdvajanje sastojaka sedimenta i resuspendujenje finog materijala tokom dodavanja ispitne vode u vodenoj koloni, sediment se može prekriti plastičnim diskom dok se na njega naliva voda, a disk se miče odmah nakon toga.

Ispitne posude bi trebale biti pokrivene (npr. staklenim pločama). Ako je potrebno, tokom studije se u izvorni volumen vode doliva još vode kako bi se nadomjestilo isparavanje vode. To bi se trebalo činiti pomoću destilovane ili dejonizovane vode kako bi se spriječilo stvaranje soli.

Dodavanje ispitnih organizama

Četiri do pet dana prije dodavanja ispitnih organizama u ispitne posude, mase jajašaca bi se trebale izvaditi iz kultura i staviti u male posude u hranjivu podlogu za uzgoj kulture. Mogu se koristiti stara hranjiva podloga iz matične kulture ili svježe pripremljena hranjiva podloga za uzgoj kulture. Ako se koristi poslednja, hranjivoj podlozi za uzgoj kulture treba dodati manju količinu hrane, npr. zelenih algi i/ili nekoliko kapljica suspenzije fino mljevenih pahuljica riblje hrane (Dodatak 2.). Treba koristiti samo svježe položene mase jajašaca. Valjenje larvi obično počinje nekoliko dana nakon polaganja jajašaca (2 do 3 dana za Chironomus riparius na 20 °C i 1 do 4 dana za Chironomus tentans na 23 °C i za Chironomus yoshimatui na 25 °C), a larve se razvijaju u četiri stadijumuma razvoja, od kojih svaki traje 4-8 dana. U ispitivanju treba koristiti larve iz prvog stadijumuma razvoja (2-3 ili 1-4 dana poslije valjenja). Stadijum mušica moguće je provjeriti pomoću širine kapsule glave.

Dvadeset larvi iz prvog stadijuma razvoja stavljaju se nasumice u svaku ispitnu posudu koja sadržava vodu i sediment obrađen spikingom, i to pomoću tupe pipete. Treba zaustaviti dozračivanje vode tokom dodavanja larvi u ispitne posude i tako treba ostati još 24 sata nakon dodavanja larvi. Prema upotrijebljenom planu ispitivanja broj larvi po koncentraciji iznosi najmanje 60 za procjenu tačke EC-a i 80 za određivanje NOEC-a.

Dvadeset i četiri sata nakon dodavanja larvi ispitivana supstanca dodaje se spikingom u vodenu kolonu iznad sedimenta i ponovno se osigura blago dozračivanje. Male količine rastvora ispitivane supstance stavljaju se ispod površine vode pipetom. Voda iznad sedimenta trebala bi se potom pažljivo promiješati kako se sediment ne bi umiješao.

Ispitne koncentracije

Ispitivanje za određivanje raspona može biti korisno za određivanje raspona koncentracija za konačno ispitivanje. U tu se svrhu koristi niz široko razmaknutih koncentracija ispitivane supstance. Da bi se dobila ista gustina površine po komarcu, koja će se koristiti i u konačnom ispitivanju, komarci se izlažu svakoj koncentraciji ispitivane supstance tokom vremena koje omogućava procjenu odgovarajućih ispitnih koncentracija, a nisu potrebna višestruka određivanja.

O ispitnim koncentracijama za konačno ispitivanje odlučuje se na osnovu rezultata ispitivanja za određivanje raspona. Trebalo bi koristiti i odabrati najmanje pet koncentracija.

Kontrolne posude

U ispitivanje bi, s odgovarajućim brojem višestrukih određivanja, trebalo uključiti kontrolne posude bez ispitivane supstance, ali sa sedimentom. Ako se za primjenu ispitivane supstance koristilo Rastvarač, treba dodati i kontrolnu posudu s rastvaračem sedimenta.

Sistem ispitivanja

Koriste se statički sistemi. Polustatični ili protočni sistemi sa stalnim ili isprekidanim obnavljanjem vode iznad sedimenta mogu se koristiti u posebnim slučajevima, na primjer ako specifikacije kvaliteta vode postanu neprikladne za ispitni organizam ili ako utiču na uravnoteženje hemikalije (npr. ako nivoa rastvorenog kiseonika previše padnu, ako se previše zavisi koncentracija proizvoda izlučivanja ili ako iz sedimenta cure minerali koji utiču na pH i/ili tvrdoću vode). Međutiim, obično su dovoljno i daje se prednost drugim metodama poboljšanja kvaliteta vode iznad sedimenta, kao što je dozračivanje.

Hrana

Potrebno je hraniti larve, po mogućnosti svakodnevno ili najmanje triput nedeljno. Čini se da je riblja hrana (suspenzija u vodi fino mljevene hrane, npr. Tetra-Min ili Tetra-Phyll; pojedinosti vidjeti u Dodatku 2.) u količini od 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg za C. yoshimatui) dnevno po larvi prikladna za mlade larve prvih 10 dana. Za starije će larve biti potrebno malo više hrane: 0,5 - 1 mg dnevno po larvi trebalo bi biti dovoljno za ostatak ispitivanja. Porcije hrane treba smanjiti u svim tretmanima te kontrolisati rastu li gljivice i primijeti li se smrtnost u kontrolisanim posudama. Ako se ne može zaustaviti rast gljivica, ispitivanje treba ponoviti. Kada se ispituju jako adsorptive supstance (npr. čiji je log K ow > 5) ili supstance koje stvaraju kovalentne veze sa sedimentom, formulisanom se sedimentu prije faze stabilizacije može dodati količina hrane neophodna za osiguranje preživljavanja i prirodnog rasta organizama. U tu se svrhu, umjesto riblje hrane, mora koristiti biljni materijal, npr. može se dodati 0,5 % (suva masa) fino usitnjenog lišća npr. velike koprive (Urtica dioica), duda (Morus alba), bijele djeteline (Trifolium repens), spanaća (Spinacia oleracea) ili nekog drugog biljnog materijala (Cerophyl ili alfa-celuloze).

Uslovi za inkubaciju

Blago dozračivanje vode iznad sedimenta u ispitnim posudama osigurava se po mogućnosti 24 sata poslije dodavanja larvi i traje tako tokom cijelog ispitivanja (treba se pobrinuti da koncentracija rastvorenog kiseonika ne padne ispod 60 % ASV-a). Dozračivanje se vrši putem staklene pasterove pipete pričvršćene 2-3 cm iznad sloja sedimenta (tj. jedan ili par mjehurića/s). Pri ispitivanju isparljivih hemikalijama može se pobrinuti da se ne dozračuje sistem sediment/voda.

Ispitivanje se sprovodi na konstantnoj temperaturi od 20 °C (± 2 °C). Za C. tentans i C. yoshimatui preporučene temperature su 23 °C odnosno 25 °C (± 2 °C). Koristi se fotoperiod od 16 sati, a jačina svjetlosti treba biti 500 do 1 000 luksa.

Trajanje izlaganja

Izlaganje počinje dodavanjem larvi u posude sa sedimentom obrađenim spikingom i kontrolne posude. Maksimalno trajanje izlaganja je 28 dana za C. riparius i C. yoshimatsui, a 65 dana za C. tentans. Ako se larve prije transformišu u mušice,

ispitivanje se može prekinuti nakon minimalno pet dana nakon što se i zadnja ličinka u kontrolnoj posudi transformiše u odraslu životinju.

2.6. Posmatranja

Transformacija

Određuju se vrijeme razvoja i ukupni broj muških i ženskih mušica koje su se u cijelosti transformišele.

Ispitne posude treba posmatrati najmanje triput nedeljno da bi se vizualno procijenilo svako nenormalno ponašanje (npr. napuštanje sedimenta, neuobičajeno plivanje) u poređenju s kontrolisanim posudama. Tokom perioda očekivane transformacije potrebno je svakodnevno brojati transformisane mušice. Svakodnevno se vodi evidencija i o polu i broju transformisanih mušica. Nakon identifikacije mušice se vade iz posuda. Treba zabilježiti sve mase jajašaca položene prije prekida ispitivanja te ih treba izvaditi kako bi se spriječilo ponovno uvođenje larvi u sediment. Takođe se bilježi i broj vidljivih kukuljica koje se nisu uspjele transformisati. Smjernice o mjerenju transformacije navedene su u Dodatku 5.

Rast i preživljavanje

Ako treba dobiti podatke o 10-dnevnom preživljavanju i rastu larvi, na samom početku treba dodatne ispitne posude kako bi ih se moglo naknadno koristiti. Sediment iz tih dodatnih posuda prosijava se kroz sito od 250 µm kako bi se zadržale larve. Kriterijumi za smrt jesu nepomičnost ili izostanak reakcije na mehaničke podražaje. I neoporavljene larve treba prebrojati kao mrtve (možda su mikrobi već razgradili larve koje su uginule na početku ispitivanja). Određuje se suva masa (bez pepela) preživjelih larvi po svakoj ispitnoj posudi pa se iizračunava srednja pojedinačna suva masa po posudi. Korisno je odrediti kojem stadijumu razvoja pripadaju preživjele larve; za to se može upotrijebiti mjerenje širine kapsule glave svake larve.

Analitička mjerenja

Koncentracija ispitivane supstance

Kao minimum, na početku (po mogućnosti sat vremena poslije dodavanja ispitivane supstance) i na kraju ispitivanja moraju se analizirati uzorci vode iznad sedimenta, međuvode i sedimenta, i to u najvišoj koncentraciji i u nekoj nižoj. Ta određivanja koncentracije ispitivane supstance daju informacije o ponašanju/diobi ispitivane supstance u sistemu voda/sediment. Uzorkovanje sedimenta na početku ispitivanja može utjicati na sistem ispitivanja (npr. uklanjanje ispitnih larvi) pa bi stoga trebalo koristiti dodatne ispitne posude za sprovođenje analitičkih određivanja na početku i tokom ispitivanja, po potrebi. Možda neće biti potrebno sprovoditi mjerenja u sedimentu ako je dioba ispitivane supstance i između vode i sedimenta jasno određena u studiji vode/sedimenta (npr. odnos sedimenta i vode, vrsta primjene, sadržaj organskog ugljenika u sedimentu).

Kada se sprovode posredna mjerenja (npr. 7. dana) te ako su za analizu potrebni veliki uzorci koji se ne mogu uzeti iz ispitnih posuda, a da to pritom ne utiče na sistem ispitivanja, analitička određivanja treba sprovoditi na uzorcima iz dodatnih ispitnih

posuda koje se tretiraju na isti način (uključujući i prisustvo ispitnih organizama), ali koje se ne koriste za biološka posmatranja.

Preporučeni postupak za izolovanje međuprostorne vode jest centrifugiranje na npr. 10 000 g i 4 °C tokom 30 min. Međutiim, ako se pokaže da se ispitivana supstanca ne adsorbuje na filtre, prihvatljiva bi mogla biti i filtracija. U nekim slučajevima možda neće biti moguće analizirati koncentracije u međuvodi jer je uzorak premalen.

Fizičko-hemisjki parametri

Na odgovarajući način treba izmjeriti pH, rastvoreni kiseonik u ispitnoj vodi i temperaturu u ispitnim posudama. Tvrdoću i amonijak treba mjeriti u kontrolisanim posudama i u jednoj ispitnoj posudi u najvišoj koncentraciji na početku i na kraju ispitivanja.

3. Podaci i izvještavanje

3.1. Obrada rezultata

Cilj ovog ispitivanja jeste odrediti efekat ispitivane supstance na brzinu razvoja i ukupni broj potpuno transformisanih muških i ženskih mušica ili, u slučaju 10- dnevnog ispitivanja, efekte na preživljavanje i masu larvi. Ako ne postoje naznake statistički različite osjetljivosti polova, rezultati mužjaka i ženki mogu se ujediniti radi statističke analize. Razlike u osjetljivosti polova mogu se statistički prosuditi, npr. tabličnim testom χ 2 -r × 2. Preživljavanje larvi i njihova srednja pojedinačna suva masa po posudi moraju se odrediti nakon 10 dana kada je to potrebno.

Koncentracije s efektom izražene kao koncentracije u vodi iznad sedimenta iizračunavaju se po mogućnosti na osnovu koncentracija izmjerenih na početku ispitivanja.

Za iizračunavanje procjene tačke EC 50 ili bilo koje druge EC x kao dodatna ponovna određivanja mogu se koristiti statistički podaci dobijeni za svaku posudu. U iizračunavanju intervala pouzdanosti za bilo koji EC x u obzir treba uzeti varijabilnost između posuda ili se treba pokazati da je ta varijabilnost toliko neznatna da se može ignorisati. Kada se model prilagođava metodi najmanjih kvadrata, na statističke podatke za svaku posudu treba primijeniti transformaciju kako bi se poboljšala homogenst varijance. Međutiim, vrijednosti EC x trebale bi se izračunati tek nakon što se odgovor transformiše natrag u izvornu vrijednost.

Kada je cilj statističke analize određivanje NOEC-a/LOEC-a testiranjem hipoteze, u obzir se mora uzeti varijabilnost među posudama, npr. ugniježđenom ANOVA-om. Kao druga mogućnost, u situacijama kada se pobiju pretpostavke uobičajene ANOVA-e, mogu biti prikladna i robusnija ispitivanja (21).

Odnos transformacije

Odnosi transformacije su kvantalni podaci i mogu se analizirati Cochran-Armitageovim testom koji se primjenjuje snižavanjem korak po korak kada se očekuje odgovor na monotoničnu dozu i kad se ti podaci slažu s tim očekivanjem. Ako to nije slučaj, mogu

se koristiti Fisherov test ili Mantel-Haenszelov test s Bonferroni-Holmovim prilagoĐenim p-vrijednostima. Ako ima dokaza za još veću varijabilnost između višestrukih određivanja u istoj koncentraciji nego što bi to naznačila binomijalna raspodjela (često zvana i „ekstra-binomijalna|| varijacija), treba primijeniti robusni Cochran-Armitageov ili Fisherov test.

Određuje se broj mušica transformisanih po posudi, n_e, koji se onda dijeli brojem uvedenih larvi, na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

gdje je:

ER = odnos transformacije n_e = broj transformisanih mušica po posudi n_a = broj

uvedenih larvi po posudi

Najprikladnija alternativa za velike uzorke, kada postoji ekstra-binomijalna varijanca, jeste tretirati odnos transformacije kao kontinuirani odgovor te primijeniti postupke poput Williamovog testa kada se očekuje odgovor na monotoničnu dozu i kad je isti u skladu s tim ER podacima. Dunnettov bi test bio prikladan gdje nema monotoničnosti. Veliki uzorak se ovdje definiše kao broj transformisanih mušica i broj netransformisanih mušica veći od pet, i to na osnovi ponovljenog određivanja (posude).

Za primjenu vrijednosti metode ANOVA vrijednosti ER-a moraju se prvo transformisati arkus sinus drugi korijen transformacijom ili Freeman- Tukeyovom transformacijom kako bi se dobila približna normalna raspodjela i ujednačile varijance. Kad se koriste apsolutne frekvencije, mogu se primijeniti Cochran-Armitageov, Fisherov (Bonferronijev) ili MantelHaenszelov test. Arkus sinus drugi korijen transformacija primjenjuje se tako što se uzme inverzni sinus (sin –1) drugog korijena ER-a.

Za odnose transformacije vrijednosti EC x računaju se regresijskom analizom (ili npr. probit (22), logit, Weibull, prikladan komercijalni softver itd.). Ako regresijka analiza ne uspije (npr. kad imamo manje od dva djelimična odgovora), koriste se druge neparametarske metode, kao što su prosjek ili jednostavna interpolacija.

3.2. Brzina razvoja

Srednje vrijeme razvoja predstavlja srednji raspon vremena između uvođenja larvi (0. dan ispitivanja) i njihove transformacije u eksperimentalnu grupu mušica. (Za iizračunavanje stvarnog vremena razvoja u obzir treba uzeti starost larvi u trenutku uvođenja). Brzina razvoja recipročna je vremenu razvoja (jedinica: 1/dan) i predstavlja dio razvoja larvi koji se odvija tokom jednog dana. Brzina razvoja preferira se za evaluaciju ovih studija o toksičnosti sedimenta jer je njena varijanca niža, a homogenija je i bliža normalnoj raspodjeli u poreĐenju s vremenom razvoja. Stoga se mogu koristiti moćni postupci parametarskih testova s brzinom razvoja radije nego s vremenom razvoja. Za brzinu razvoja kao kontinuirani odgovor mogu se procijeniti vrijednosti EC x regresijskom analizom.

Za sljedeće statističke testove pretpostavlja se da se broj mušica zamijećen na dan pregleda x transformišeo u srednjem vremenskom intervalu između dana x i dana x - l (l = trajanje intervala pregleda, obično 1 dan). Srednja brzina razvoja po posudi x računa se prema:

$$x = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

gdje je:

x: srednja brzina razvoja po posudi, i: indeks intervala pregleda, m: maksimalni broj intervala pregleda, f i: broj mušica transformisanih u intervalu pregleda i n e : ukupni broj mušica transformisanih na kraju eksperimenta (= P f i) x i: brzina razvoja mušica transformisanih u intervalu i

$$x_i = \frac{1}{day_i - \frac{1_i}{2}}$$

gdje je:

day i : dan pregleda (dani od primjene), l i : trajanje intervala pregleda i (dani, obično 1 dan)

3.3. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju mora sadržavati barem sljedeće podatke:

Ispitivana supstanca:

— fizičko stanje i, gdje je relevantno, fizičko-hemijska svojstva (rastvorljivost u vodi, napon pare, koeficijent podjele u zemljištu (ili u sedimentu ako postoji), stabilnost u vodi itd.);

— podaci za identifikaciju hemikalije (opšti naziv, hemisjki naziv, CAS broj itd.), uključujući i čistoću i analitičku metodu kvantifikacije ispitivane supstance.

Ispitne vrste:

— korištene ispitne životinje: vrsta, naučni naziv, izvor organizama i uslovi uzgoja;

— podaci o rukovanju masama jajašaca i ličinkama;

— starost ispitnih životinja u trenutku unošenja u ispitne posude.

Uslovi ispitivanja:

— korišteni sediment, tj. prirodni ili formulisani sediment;

— za prirodni sediment lokacija i opis mjesta uzorkovanja sedimenta, uključujući, po mogućnosti, istoriju zagaĐenja, svojstva: pH, sadržaj organskog ugljenika, odnos C/N i granulometrija (ako je prikladno).

— priprema formulisanog sedimenta: sastojci i svojstva (sadržaj organskog ugljenika, pH, vlaga itd. na početku ispitivanja);

— priprema ispitne vode (ako se koristi obraĐena voda) i svojstva (koncentracija kiseonika, pH, provodljivost, tvrdoća itd. na početku ispitivanja);

— dubina sedimenta i vode iznad sedimenta;

— volumen vode iznad sedimenta i meĐuvode, masa mokrog sedimenta sa i bez meĐuvode;

— ispitne posude (materijal i veličina);

— metoda pripreme radnih rastvora i ispitnih koncentracija;

— upotreba ispitivane supstance: korištene ispitne koncentracije, broj višestrukih određivanja i upotreba rastvora, ako je isti korišten;

— uslovi inkubacije: temperatura, ciklus i jačina svjetlosti, dozračivanje (učestalost i intenzitet);

— detaljni podaci o hranjenju, uključujući i vrstu hrane, pripremu, količinu i režim hranjenja.

Rezultati:

— nazivne ispitne koncentracije, izmjerene ispitne koncentracije i rezultati svih analiza za određivanje koncentracije ispitivane supstance u ispitnoj posudi;

— kvalitet vode u ispitnim posudama, tj. pH, temperatura, rastvoreni kiseonik, tvrdoća i amonijak;

— dolivanje isparene ispitne vode, ako je bilo;

— broj transformisanih muških i ženskih mušica po posudi i po danu;

— broj larvi koje se nisu transformišele u mušice po posudi;

— srednja pojedinačna suva masa larvi po posudi i po stadijumumu razvoja, ako je to primjereno;

— postotak transformacije po odreĐivanju i ispitnoj koncentraciji (muške i ženske mušice zajedno);

— srednja brzina razvoja potpuno transformisanih mušica po odreĐivanju i brzina tretmana (muške i ženske mušice zajedno);

— procjena toksičnih konačnih efekata, npr. ECx (i s time povezani intervali pouzdanosti), NOEC i/ili LOEC, te statističke metode korištene za njihovo određivanje;

— rasprava o rezultatima, uključujući i svaki utjicaj na rezultate ispitivanja nastao uslijed odstepena od ove ispitne metode.

Dodatak 1. Definicije

Za potrebe ove metode koriste se sljedeće definicije:

Formulisani sediment ili obrađeni, dodati ili sintetički sediment je smješa supstance koja se koristi za imitiranje fizičkih sastojaka prirodnog sedimenta.

Voda iznad sedimenta je voda koja se u ispitnoj posudi nalazi iznad sedimenta.

Međuprostorna voda je voda u prostoru između sedimenta i čestica zemljišta.

Voda obrađena spikingom je voda u koju je dodata ispitivana supstanca.

Dodatak 2.

Preporuke za uzgoj kulture Chironomus riparius

Larve vrste Chironomus mogu se uzgajati u posudama za kristalizaciju ili velikim rezervoarima. Fini kremeni pijesak nanese se u tankom sloju dubine oko 5 do 10 mm po dnu rezervoara. Također se pokazalo da je dijatomejska zemlja (npr. Merck, Art 8117) prikladan supstrat (dovoljan je tanji sloj od svega par mm). Potom se dodaje prikladna voda u dubini od nekoliko cm. Trebalo bi dolivati vodu po potrebi kako bi se zamijenila voda izgubljena isparavanjem i spriječilo isušivanje. Voda se po potrebi može dolivati. Treba osigurati blago dozračivanje. Posude za uzgoj larvi trebale bi se držati u prikladnom kavezu koji će spriječiti bijeg transformisanih odraslih životinja. Kavez treba biti dovoljno velik da se transformisane odrasle životinje mogu rojiti, u protivnom možda neće doći do kopulacije (minimalno oko 30 x 30 x 30 cm).

Kaveze treba držati na sobnoj temperaturi ili u prostoriji s konstantnim očvrstenjem na 20 ± 2 °C s fotoperiodom od 16 sati svjetlosti (jačine oko 1 000 luksa), 8 sati mraka. Iz raznih izvještaja ukazano je da vlažnost vazduha ispod 60 % RV može spriječiti razmnožavanje.

Voda za razrjeđivanje

Može se koristiti bilo koja prikladna prirodna ili sintetička voda. Obično se koriste izvorska voda, dehlorovana voda iz slavine i dodati medijumumi (npr. mediji Elendt ‚M4' ili ‚M7'). Voda se prije upotrebe mora dozračiti. Ako je to potrebno, voda za uzgoj kulture može se obnoviti pažljivim izlivanjem korištene vode iz posuda za uzgoj kulture, direktno ili putem sifona, da se pritom ne unište cjevčice s ličinkama.

Hranjenje larvi

Larve vrste Chironomus treba hraniti pahuljicama riblje hrane (Tetra Min®, Tetra Phyll® ili neka druga slična robna marka riblje hrane), i to otprilike 250 mg dnevno po posudi. Hrana se može dati i kao suvi usitnjeni prah ili kao suspenzija u vodi: 1,0 g pahuljaste hrane doda se u 20 ml vode za razrjeĐivanje i izmiješa u homogenu smješu. Taj se pripravak može dodavati brzinom od oko 5 ml dnevno po posudi (protresti prije upotrebe). Starije larve mogu dobiti više hrane.

Hranjenje se prilagoĐava kvalitetu vode. Ako hranjiva podloga za uzgoj kultura postane ‚mutna', treba smanjiti hranjenje. Dodavanje hrane mora se pažljivo nadzirati. Premalo hrane dovest će do prebacivanja larvi prema vodenom stupcu, a previše hrane dovest će do povećane aktivnosti mikroba i sniženih koncentracija kiseonika. Oba ta uslova mogu dovesti do sniženih brzina rasta.

TakoĐe se mogu dodati i ćelije nekih zelenih algi (npr. Scenedesmus subspicatus, Chlorella vulgaris) kada se postavljaju nove posude za uzgoj kultura.

Hranjenje transformisanih odraslih životinja

Neki izvoĐači eksperimenta sugerirali su da bi vuneni podložak namočen u zasićenoj šećernom rastvoru mogao poslužiti kao hrana za transformisane odrasle životinje.

Transformacija

Na 20 ± 2 °C larve se počinju transformisati u odrasle životinje iz posuda za uzgoj larvi nakon otprilike 13 - 15 dana.

Mase jajašaca

Kad se u kavezu za uzgoj pojave odrasle životinje, u svim posudama za uzgoj larvi triput nedeljno treba provjeravati ima li položenih želatinoznih masa jajašaca. Ako ima masa jajašaca, njih treba pažljivo ukloniti. Treba ih prenijeti u malu posudu u kojoj se nalazi uzorak vode za uzgoj. Te se mase jajašaca koriste za postavljanje nove posude za uzgoj kulture (npr. 2 - 4 mase jajašaca/posudi) ili se koriste za testove toksičnosti.

Valjenje larvi u prvom stadijumu razvoja trebalo bi se zbiti nakon 2 - 3 dana.

Postavljanje novih posuda za uzgoj kulture

Kad se kulture razviju, trebalo bi biti moguće postaviti novu posudu za uzgoj kulture jedanput nedeljno ili rjeĐe, u zavisnosti od potreba ispitivanja, i ukloniti starije posude nakon što se larve transformišu u odrasle mušice. Na taj će se način uz minimalno upravljanje stvarati redovna zaliha odraslih životinja.

Priprema ispitnih rastvor ‚M4' i ‚M7'

Elendt (1990.) je opisao medij ‚M4'. Medij ‚M7' priprema se kao medij ‚M4', osim za supstance iz tabele 1., za koje su koncentracije četiri puta niže u ‚M7' od onih u ‚M4'. Ispitni rastvor ne treba pripremati prema Elendtu i Biasu (1990.) jer koncentracije NaSiO3 5 H 2 O, NaNO3, KH2PO4 i K2HPO4 navedene za pripremu radnih rastvor nisu adekvatne.

Priprema medijumuma ‚M7'

Svaki se radni rastvor (I) priprema posebno, a kombinujeni radni rastvor (II) priprema se iz tih radnih rastvor (I) (vidjeti tabelu 1.). Za pripremu medijumuma ‚M7' miješa se 50 ml kombinovanog radnog rastvora (II) i količine svakog radnog rastvora makronutrijenata navedene u tabeli 2. do ukupno 1 l dejonizovane vode. Vitaminski radni rastvor priprema se dodavanjem triju vitamina u dejonizovanu vodu, kao što je naznačeno u tabeli 3., a 0,1 ml kombinovanog vitaminskog radnog rastvora dodaje se konačnom medijumumu ‚M7' tik prije upotrebe. (Vitaminski radni rastvor čuva se zamrznut u malim alikvotima). Medijumum se dozrači i stabilizuje.

Tabela 1. Radni rastvori elemenata u tragovima za medijumum M4 i M7

Radni rastvori	Količina (mg) od koje se umiješa do 1 litre dejonizovane vode	Za pripremu kombinujenog radnog rastvora: pomiješajte sljedeće količine (mg) radnih rastvora (I) u do 1 litre dejonizovane vode		Konačne koncentracije u ispitnim rastvorima (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6 H_2O$	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2 H_2O$	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6 H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033

Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na2EDTA · 2 H_2O	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO4 · 7 H_2O	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

Tabela 2. Radni rastvori makronutrijenata za medijumum M4 i M7

	Količina od koje se umiješa do 1 litre dejonizovane vode (mg)	Količina radnih rastvora makronutrijenata koja se dodaje za pripremu medijumuma M4 i M7 (ml/l)	Konačne koncentracije u ispitnim rastvora M4 i M7 (mg/l)
$CaCl_2$ · 2 H_2O	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4$ · 7 H_2O	246 600	0,5	123,3
KC1	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3$ · 9 H_2O	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

Tabela 3. Vitaminski radni rastvor za medijumum M4 i M7

	Količina od koje se umiješa do 1 litre deionizirane vode (mg)	Količina vitaminske radne rastvora koja se dodaje za pripremu medija M4 i M7 (ml/l)	Konačne koncentracije u ispitnim rastvorama M4 i M7 (mg/l)
Tiamin-hidrohlorid	750	0,1	0,075

Cijanokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

Dodatak 3.

PRIPREMA FORMULIRANOG SEDIMENTA

Sastav sedimenta

Formulisani sediment ima sljedeći sastav:

Sastojak	**Svojstva**	**% sedimenta suha masa**
Treset	Sphagnum moss treset, što bliže pH području od 5,56,0, bez vidljivih ostataka biljaka, fino usitnjen (veličina čestica ≤ 1 mm) i sušen na vazduhu	4-5
Kremeni pijesak	Veličina zrna: > 50 % čestica trebalo bi biti u rasponu od 50-200 µm	75-76
Kaolinitska glina	Sadržaj kaolinita ≥ 30 %	20
Organski ugljenik	PrilagoĐava se dodavanjem treseta i pijeska	2 (± 0,5)
Kalcijum karbonat	$CaCO_3$, u prahu, hemijski čist	0,05 (- 0,1)
Voda	Provodljivost ≤ 10 µS/cm	30 (- 50)

Priprema

Treset se suši na vazduhu i usitnjava u fini prah. Priprema se suspenzija potrebne količine treseta u prahu u dejonizovanoj vodi pomoću uređaja za homogenizaciju visoke djelotvornosti. pH te suspenzije podešava se u području od 5,5 ± 0,5 pomoću $CaCO_3$. Suspenzija se priprema najmanje dva dana blagim miješanjem na 20 ± 2 °C kako bi se stabilizirala pH i uspostavila stabilna mikrobna komponenta. pH se ponovno mjeri i iznosi 6,0 ± 0,5. Potom se suspenzija treseta miješa s ostalim sastojcima (pijeskom i kaolinitskm glinom) i dejonizovanom vodom da bi se dobio homogeni sediment sa sadržajem vode u području od 30 - 50 posto suve mase sedimenta. Još jednom se mjeri pH konačne smješe i podešava na 6,5 do 7,5 pomoću $CaCO_3$ ako je potrebno. Uzimaju se uzorci sedimenta kako bi se odredili suva masa i sadržaj organskog ugljenika. Potom se preporučuje da se formulisani sediment, prije upotrebe

u testu toksičnosti komaraca, priprema sedam dana u istim uslovima koji prevladavaju i u naknadnom ispitivanju.

Skladištenje

Suvi sastojci za pripremu dodatog sedimenta mogu se skladištiti na suvom i hladnom mjestu na sobnoj temperaturi. Formulisani (mokri) sediment ne bi trebalo skladištiti prije upotrebe u ispitivanju. Njega bi trebalo iskoristiti nakon perioda pripremanja od sedam dana koje završava pripremu.

Dodatak 4.

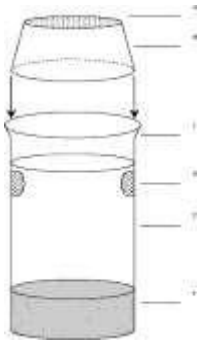
Hemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeĐivanje

Supstanca	**Koncentracije**
Lebdeće čestice	< 20 mg/l
Ukupni organski ugljenik	< 2 mg/l
Nejonizovani amonijak	< 1 µg/l
Tvrdoća kao $CaCO_3$	< 400 mg/l
Rezidualni hlor	< 10 µg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
Ukupni organofosforni pesticidi plus polihlorovani bifenili	< 50 ng/l
Ukupni organski hlor	< 25 ng/l

Dodatak 5.

Smjernice za praćenje preobrazbe ličinki komaraca

U ispitne laboratorijaske čaše postave se zamke za transformisane životinje. Te su zamke potrebne od 20. dana do kraja ispitivanja. Slijedi crtež primjera korištenih zamki:



C.29. LAKA BIORAZGRADIVOST - CO2 U ZAČEPLJENIM POSUDAMA (TEST GASNOG PROSTORA (HEADSPACE))

1. Uvod

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 310 (2006.). Ova ispitna metoda je metoda izbora za evaluaciju lake biorazgradivosti hemikalija, a informacije sadržane u njoj slične su informacijama o šest metoda opisanih u poglavlju C.4. Dakle, hemikalija koja pokazuje pozitivne rezultate u ovoj ispitnoj metodi može se smatrati lako biorazgradivom i brzo razgradivom u životnoj sredini.

Poznata metoda za određivanje ugljen dioksida (CO2), baziranaa na Sturmovom izvornom testu za procjenu biorazgradivosti organskih hemikalija, obično je, zbog mjerenja ugljen dioksida koji nastaje djelovanjem mikroba, prvi izbor za ispitivanje slabo rastvorljivih hemikalija i jako adsorptivnih hemikalija. TakoĐe se izbora i za rastvorljive (ali neisparljive) hemikalije jer je nastajanje ugljen dioksida jedini nedvosmisleni dokaz djelovanja mikroba. Na opadanje rastvorenog organskog ugljenika mogu uticati fizičko-hemijski procesi - adsorpcija, isparavanje, precipitacija (taloženje), hidroliza - kao i djelovanje mikroba, a i u mnogim nebiološkim reakcijama troši se kiseonik; rijetko kad CO2 nastaje od organskih hemikalija abiotički. U izvornom i izmijenjenom Sturmovom testu do rastvaranja CO2 dolazi u tečnom stanju u apsorpcijske posude produvavanjem (tj. tretiranjem mjehurića vazduha da uklanjaju CO2 iz tečnog medijumumuma), dok se u Larsonovoj verziji CO2 transferira iz reakcione posude do apsorbera propuštanjem vazduha bez CO2 kroz gasni prostor te naknadnim neprestanim protresanjem ispitne posude. Samo se u Larsonovoj izmijenjenoj verziji protresa reakciona posuda; miješanje se nalaže samo za nerastvorljive supstance u MEST ISO 9439, a u objema se nalaže prije produvavanje negoli zamjena količine u gasnom prostoru.

Međutiim, pokazalo se da se neorganski ugljenik (IC) akumulira u medijumumu tokom primjene standardnog, izmijenjenog Sturmova testa na čitav niz hemikalija. PronaĐena je koncentracija IC-a od čak 8 mg/l tokom razgradnje 20 mg C/l anilina. Dakle, skupljanje CO2 u alkalnim odvajačima nije dobro odrazilo pravu količinu CO2 koja nastaje djelovanjem mikroba u različitim trenucima tokom razgradnje. Kao rezultat toga, specifikacija da se > 60 % teoretskog maksimuma CO2 (ThCO2) mora skupiti u „roku od 10 dana‖ (10 dana neposredno nakon postizanja 10 % biorazgradnje) da bi se ispitivana hemikalija klasifikovala kao lako biorazgradiva neće biti ispunjena za neke hemikalije koje bi se tako klasifikovale opadanjem rastvorenog organskog ugljenika (DOC).

Kada je postotak razgradnje niža vrijednost od očekivane, moguće je da se IC akumulira u ispitnom rastvoru. Tada se razgradivost može procijeniti nekim drugim testovima biorazgradivosti.

Ostali nedostaci Sturmove metodologije (nespretna, vremenski zahtjevna, podložnija eksperimentalnoj greški i neprimjenjiva na isparljive hemikalije) ukazali su ne neophodnost portage za tehnikom začepljenih posuda drukčijom od Gledhillove, radije nego protoku gasa. Boatman i sur. revidirali su ranije metode i usvojili sistem zatvorenog gasnog prostora u kojem se CO2 ispušta u gasni prostor na kraju inkubacije acidifikacijom medijumuma. CO2 se mjerio analizom gasnom hromatografijom (GC)/IC u automatski uzimanim uzorcima gasnog prostora, ali se u obzir nije uzimao rastvoreni neorganski ugljenik (DIC) u tečnom stanju. Isto tako, i korištene su posude bile vrlo male (20 ml), a sadržavale su 10 ml medijumuma, što je izazvalo poteškoće, npr. pri dodavanju vrlo malih količina nerastvorljivih ispitivanih hemikalija, i/ili možda mikroorganizmi nisu u dovoljnoj mjeri prisutni u inokuliranom medijumumu da bi mogli razgraditi ispitivane hemikalije.

Te su poteškoće nadvladane u nezavisnim studijama autora Strujisa i Stoltenkampa, Bircha i Fletchera, od kojih su poslednji imali iskustvo s aparaturom korištenom u testu anaerobne biorazgradnje. U prethodnoj se metodi CO2 mjeri u gasnom prostoru nakon acidifikacije i uravnotežavanja, dok se u poslednjoj metodi mjeri DIC i u gasnom i u tečnom stanju, bez tretmana; u tečnom je stanju bilo prisutno više od 90 % nastalog IC-a. Prednost obiju metoda nad Sturmovim testom jeste u tome da je sistem ispitivanja kompaktniji i lakši za upravljanje, mogu se ispitivati i neisparljive hemikalije, a izbjegava se i vjerovatnoća prolongirannja u mjerenju nastalog CO2.

Oba ta pristupa kombinovana su u normi ISO Headspace CO2, koja je ispitana u prstenastom testu a upravo se na toj normi i bazira ova ispitna metoda. Preporučuju se dvije metode mjerenja CO2, naime, CO2 u gasnom prostoru nakon acidifikacije i IC u tečnom stanju nakon dodavanja viška baza. Posljednju je metodu uveo Peterson tokom CONCAWE prstenastog testa ove metode mjerenja u gasnom prostoru koja je izmijenjena kako bi se mjerila svojstvena biorazgradivost. Izmjene načinjene u reviziji ove metode iz 1992. godine iz poglavlja C.4 ovog Priloga za laku biorazgradivost obuhvaćene su ovom ispitnom metodom pa su uslovi (medijumum, trajanje itd.) i inače jednaki onima iz revidiranog Sturmova testa. Birch i Fletcher pokazali su da se ovim testom gasnog prostora dobijaju rezultati vrlo slični onima koji se dobiju prstenastim testom OECD-a istih hemikalija revidiranih ispitnih metoda.

2. Načelo ispitivanja

Ispitivana hemikalija, obično u koncentraciji od 20 mg C/l, kao jedini izvor ugljenika i energije, inkubira se u puferskom medijumumu s mineralnim solima koji je inokuliran miješanom populacijom mikroorganizama. Test se sprovodi u začepljenim bocama u kojima se u gasnom prostoru nalazi vazduh, koji predstavlja zalihu kiseonika za aerobnu biorazgradnju. Razvijanje
CO2 koje nastaje kao rezultat konačne aerobne biorazgradnje ispitivane hemikalije određuje se mjerenjem viška IC-a nastalog u ispitnim bocama u poređenju s onim nastalim u posudama sa slijepim probama koje sadrže samo inokulirani medij. Stepen biorazgradnje izražava se kao postotak teoretskog maksimuma proizvodnje IC-a (ThIC), i to na osnovu količine ispitivane hemikalije (kao organskog ugljenika) koja se dodala na početku.Također se mogu mjeriti i opadanje DOC-a i/ili stepen primarne biorazgradnje ispitivane hemikalije.

2.1. Informacije o ispitivanoj hemikaliji

Sadržaj organskog ugljenika (% w/w) ispitivane hemikalije mora biti poznat bilo iz njene hemijske strukture bilo mjerenjem kako bi se mogao izračunati postotak razgradnje. Za isparljive ispitivane hemikalije izmjerena ili izračunata konstanta Henryjevog zakona pomaže u određivanju odgovarajućeg odnosa volumena gasnog prostora i tečnosti. Podaci o toksičnosti ispitivane hemikalije na mikroorganizme pomažu u izboru odgovarajuće ispitne koncentracije i tumačenju rezultata koji pokazuju slabu biorazgradivost: preporučuje se da se ubaci i kontrola inhibicije, osim ako već nije poznato da ispitivana hemikalija nema inhibitorni efekat na djelovanje mikroba.

2.2. Primjenjivost metode

Ovaj se test može primijeniti na ispitivane hemikalije rastvorljive u vodi i nerastvorljive treba osigurati dobro dispergiranje ispitivane hemikalije. Pomoću preporučenog odnosa volumena gasnog prostora i tečnosti od 1:2 mogu se ispitivati isparljive hemikalije s

konstantom Henryjevog zakona do 50 Pa.m3.mol–1 pošto udio ispitivane hemikalije u gasnom prostoru neće biti veći od 1 % . Manji volumen gasnog prostora može se koristiti pri ispitivanju hemikalija koje su isparljive, ali je moguće da je ograničavajuća njihova biodostupnost, posebno ako su one slabo rastvorljive u vodi. Međutiim, korisnici moraju osigurati da odnos volumena gasnog prostora i tečnosti, kao i koncentracija ispitivane hemikalije, budu takvi da je dostupno dovoljno kiseonika za potpunu aerobnu biorazgradnju (npr. izbjegavati upotrebu visoke koncentracije supstrata i malog volumena gasnog prostora).

2.3. Referentne hemikalije

Kako bi se provjerio postupak ispitivanja, paralelno treba ispitivati referentnu hemikaliju čija je biorazgradivost već poznata. U tu se svrhu mogu koristiti anilin, natrijum benzoat ili etilenglikol za ispitivanje ispitivanih hemikalija rastvorljivih u vodi te 1-oktanol za slabo rastvorljive ispitivane hemikalije. Biorazgradnja tih hemikalija mora u roku od 14 dana dostići > 60 % ThIC-a.

2.4. Mjerna obnovljivost

U ISO prstenastom testu ove metode dobijeni su sljedeći rezultati u preporučenim uslovima, uključujući i 20 mg C ispitivane hemikalije/l. Varijabilnost unutar testa (mjerna obnovljivost) je, pomoću anilina, bila niska, a koeficijent varijabilnosti nije bio veći od 5 % u gotovo svim ispitnim nizovima. U dva slučaja u kojima je mjerna obnovljivost bila lošija, veća varijabilnost je bila rezultat velike proizvodnje IC-a u slijepim probama. Mjerna obnovljivost je bila gora s 1oktanolom, ali je još uvijek bila manja od 10 % za 79 % ispitnih nizova. Ta je veća varijabilnost unutar testa bila rezultat grešaka u doziranju jer se mala količina (3 do 4 µl) 1oktanola morala ubrizgati u začepljene ispitne boce. Veći bi koeficijenti varijacije rezultirali nižim koncentracijama ispitivane hemikalije od onih korištenih, posebno na koncentracijama ispod 10 mg C/l. To bi se moglo riješiti snižavanjem koncentracije ukupnog neorganskog ugljenika (TIC) u inokulumu.

Ispitivana hemikalija	**Srednja vrijednost postotka biorazgradnje (28d)**	**Koeficijent varijacije (%)**	**Broj laboratorijaa**
Anilin	90	16	17
1-oktanol	85	12	14

U prstenastom testu EU-a (24), u kojem je ispitivano pet surfaktanata dodanih u koncentraciji od 10 mg C/l, dobijeni su sljedeći rezultati:

Ispitivana hemikalija	**Srednja vrijednost postotka biorazgradnje (28d)**	**Koeficijent varijacije (%)**	**Broj laboratorijaa**
Tetrapropilen Benzen sulfonat	17	45	10

Di-izo-oktilsulfo-sukcinat (anjonski)	72	22	9
Heksadecil-trimetil Amonijak hlorid (katjonski)	75	13	10
Izo-nonilfenol-(etoksilat) (nejonski)	41	32	10
Koko-amid-propil Dimetilhidroksi Sulfobetain (amfoterni)	60	23	11

Rezultati pokazuju da je varijabilnost bila veća za slabije razgrađene površinski activne supstance. Varijabilnost unutar testa bila je manja od 15 % za više od 90 % slučajeva, a najviša je bila od 30-40 %.

NAPOMENA: Većina površinski aktivnih supstanci ne sadrže samo jednu molekulu, nego su mješavina izomera, homologa itd., koji se razgrađuju po isteku različitih karakterističnih perioda prolongirannja i različitim kinetičkim brzinama, što rezultira „zamućenim|| , izlomljenim krivim, tako da je moguće da se prolazna vrijednost od 60 % neće dostići u „roku od 10 dana|| iako bi svaka pojedinačna molekularna vrsta dosegla > 60 % u roku od 10 dana da je sama ispitivana. To se primjećuje i kod drugih kompleksnih smješa.

2.5. Opis metode

Aparatura

Uobičajena laboratorijaska aparatura:

Staklene serum boce, začepljene čepovima od butilnog kaučuka i aluminijskim brtvama na navrtanje. Preporučena veličina je „125 ml|| s ukupnim volumenom od oko 160 ml (u tom bi slučaju volumen svake boce trebao biti poznat i iznositi 160 ± 1 ml);

Analizator ugljenika ili neki drugi instrument (npr. gasni hromatograf) za mjerenje neorganskog ugljenika;

Špriceve velike preciznosti za uzorke gasa i tečnosti;

Orbitalna miješalica u okruženju s kontrolisanom temperaturom;

Dovod vazduha bez CO2 - to se može pripremiti propuštanjem vazduha kroz granule sodinog kreča ili korištenjem smješe gasa u odnosu 80 % N2/20 % 02 (opcijski);

Uređaj za membransku filtraciju propusnosti od 0,20 - 0,45 µm (fakultativno),

Analizator organskog ugljenika (fakultativno).

Reagensi

Tokom cijelog testa koristite reagense analitičke čistoće.

Voda

Treba koristiti destiliranu ili deionizovanu vodu koja sadrži ≤ 1 mg/l ukupnog organskog ugljenika. To predstavlja ≤ 5 % početnog sadržaja organskog ugljenika koji je uveden na preporučenu dozu ispitivane hemikalije.

Radni rastvori za medijumumom s mineralnim solima

Radni rastvori i medijumumi s mineralnim solima slični su testovima iz norme MEST ISO 14593 i poglavlja C.4. Upotreba više koncentracije amonijum hlorida (2,0 g/l umjesto 0,5 g/l) potrebna je samo u vrlo rijetkim slučajevima, npr. kad je koncentracija ispitivane hemikalije > 40 mg C/l. Radne rastvore treba čuvati u frižideru i baciti ih nakon šest mjeseci ili ranije ako ima dokaza precipitacije ili rasta mikroba. Pripremiti sljedeće radne rastvore:

(a) Kalijum dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) 8,50 g

Dikalijum hidrogen fosfat (K_2HPO_4) 21,75 g

Dinatrijum hidrogen fosfat dihidrat ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 33,40 g

Amonijum hlorid (NH_4Cl) 0,50 g

Rastvoriti u vodi i pripremiti 1 litru. pH tog rastvora treba iznositi 7,4 (± 0,2). Ako to nije slučaj, pripremiti novi rastvor.

(b) Kalcijum hlorid dihidrat ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40 g

Rastvoriti u vodi i pripremiti 1 litru.

(c) Magnezijumv sulfat heptahidrat ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50 g

Rastvoriti u vodi i pripremiti 1 litru.

(d) GvožĐe (III) hlorid heksahidrat ($FeCl_3.6H_20$) 0,25g

Rastvoriti u vodi i pripremiti 1 litru pa dodati kapljicu koncentrata.

Priprema mineralnog medijumumuma

Pomiješati 10 ml rastvora (a) s približno 800 ml vode dodati 1 ml rastvora (b), (c) i (d) te pripremiti 1 litru pomoću vode.

Ostali reagensi

Koncentrovana orto-fosforna kiselina (H_3PO_4) (> 85 % mase po volumenu).

Rastvora s natrijumim hidroksidom 7M

Rastvoriti 280 g natrijuma hidroksida (NaOH) u 1 litri vode. Odrediti koncentraciju DIC-a te rastvora i u obzir uzeti tu vrijednost pri iizračunavanju rezultata testa, posebno u svjetlu validacionog kriterijuma (b). Pripremiti svježi rastvor ako je previsoka koncentracija DIC-a.

Ispitivana hemikalija

Pripremiti u vodi radnui rastvor ispitivane hemikalije koja je dovoljno rastorljiva u vodi ili u ispitnom medijumumu na koncentraciji po mogućnosti 100-struko većoj od konačne koncentracije koja će se koristiti u testu; možda će biti neophodno podesiti pH radnog rastvora. Radni rastvor treba dodati mineralnom medijumumu da se postigne konačna koncentracija organskog ugljenika od 2 do 4 mg C/l, po mogućnosti 20 mg C/l. Ako se koriste niže koncentracije, možda će biti narušena dobijena preciznost. U posude se mogu dodavati i rastvorljive i nerastvorljive tečne hemikalije, i to direktno pomoću šprica velike preciznosti. Možda će slabo rastvorljive i nerastvorljive ispitivane hemikalije trebati posebno tretirati. Na izboru stoje:

1) direktno dodavanje poznatih vaganih količina;
2) ultrazvučno dispergiranje prije dodavanja;
3) dispergiranje pomoću emulgatora potrebnih da bi se utvrdilo imaju li ikakav inhibitorni ili stimulacijski efekat na djelovanje mikroba prije dodavanja;
4) adsorpcija tečnih ispitivanih hemikalija ili rastvora u prikladno isparivom rastvoru na neki inertni medijumum ili nosač (npr. filtar od staklenih vlakana), a potom i isparavanje rastvarača i direktno dodavanje poznatih količina;
5) dodavanje poznatog volumena rastvora ispitivane hemikalije u lako isparivom rastvoru u praznu ispitnu posudu, a potom i isparavanje rastvarača.

Sredstva ili rastvarača korišteni u točkama (c), (d) i (e) moraju biti ispitana na stimulacijski ili inhibitorni efekat na djelovanje mikroba (vidjeti stav 42. točku (b)).

Referentna hemikalija

Pripremiti radni rastvor (rastvorljive) referentne hemikalije u vodi u koncentraciji po mogućnosti 100 puta većoj od konačne koncentracije koja će se koristiti (20 mg C/l) u testu.

Provjera inhibicije

Ispitivane hemikalije obično ne pokazuju značajnije znake razgradnje u uslovima korištenima u procjeni lake biorazgradivosti. Jedan od mogućih uzroka jeste taj da ispitivana hemikalija ima inhibitorni efekat na inokulum na koncentraciji korištenoj u testu. U plan ispitivanja može se stoga uključiti i provjera inhibicije kako bi se olakšala identifikacija (retrospektivno) inhibicije kao mogućeg uzroka koji pridnosi tom efektu. Kao druga mogućnost, provjerom inhibicije mogu se isključiti takve interferencije i može se pokazati da se nulta ili slaba razgradnja mogu pripisati isključivo nepodložnosti na napad mikroba u uslovima testa. Da bi se dobili podaci o toksičnosti ispitivane hemikalije na (aerobne) mikroorganizme, pripremiti rastvor u ispitnom medijumumu koji sadrži ispitivanu hemikaliju i referentnu hemikaliju od kojih je svaka u istoj koncentraciji kao i pri dodavanju.

Inokulum

Inokulum se može izvesti iz niza izvora: aktivnog mulja, izlaznih otpadnih voda (bez hlora), površinskih voda ili iz kombinacije tih izvora. Biorazgradivo djelovanje izvora treba provjeriti pomoću referentne hemikalije. Bez obzira na to koji je izvor, ne bi trebalo koristiti mikroorganizme koji su prethodno izlagani ispitivanoj hemikaliji ako se postupkom želi ispitati laka biorazgradivost.

Aktivni mulj, otpadne vode i izlazna voda nakon pročišćavanja otpadnih voda sadrže patogene organizme i s njima se mora rukovati oprezno.

Iskustvo pokazuje da je optimalni volumen za inokulum onaj koji:

1) je dovoljan za stvaranje odgovarajućeg biorazgradivog djelovanja;
2) razgrađuje referentnu hemikaliju u propisanom postotku,
3) proizvodi 102 do 105 jedinica koje prave kolonije po mililitru u konačnoj smješi;
4) obično proizvodi koncentraciju od 4 mg/l suspendovanih čvrstih supstanci u konačnoj smješi kada se koristi aktivni mulj, mogu se koristiti koncentracije do 30 mg/l, ali one mogu značajno povećati proizvodnju CO2 u slijepim probama;
5) doprinosi s manje od 10 % početne koncentracije organskog ugljenika koji je uvela ispitivana hemikalija;
6) predstavlja 1-10 ml inokuluma na 1 litru ispitnog rastvora.

Aktivni mulj

Aktivni se mulj nanovo skuplja iz aeracijskog bazena postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda ili iz vazdušne posude laboratorijaske jedinice u kojima se pročišćavaju pretežno komunalne otpadne vode. Ako je to potrebno, treba ukloniti grube čestice prosijavanjem (npr. primjenom sita veličine mrežice od 1 mm2), a mulj treba održavati u aerobnom stanju do upotrebe.

Kao druga mogućnost, nakon uklanjanja svih grubih čestica treba pustiti da se mulj istaloži ili ga centrifugirati (npr. 1 100 × g na 10 minuta). Baciti tečni supernatant. Mulj se može prati u mineralnom rastvoru. Suspendovati koncentrovani mulj u mineralnom medijumumu kako bi se dobila koncentracija od 3-5 g suspendovane čvrste supstance/l. Potom dozračivati do upotrebe.

Mulj treba uzeti iz ispravnog konvencionalnog postrojenja za prečišćavanje. Ako se mulj treba uzeti iz postrojenja za prečišćavanje velikih brzina ili ako se smatra da mulj sadrži inhibitore, treba ga oprati. Pustiti da se resuspendujeni mulj istaloži ili ga centrifugirati nakon miješanja, baciti tečni supernatant pa ponovno suspendovati oprani mulj u još jednoj količini mineralnog medijumuma. Ponavljati taj postupak sve dok se ne bude smatralo da u mulju više nema viška supstrata ili inhibitora.

Nakon potpunog resuspendujenja ili kod neobrađenog mulja uzeti uzorak neposredno prije upotrebe za određivanje suve mase suspendovanih čvrstih supstance.

Još jedna mogućnost jeste homogenizovati aktivni mulj (3-5 g suspendovane čvrste supstance/l). Tretirati mulj u Waring miješalici dvije minute na srednjoj brzini. Pustiti 30 minuta da se izmiješani mulj istaloži, ili duže ako je potrebno, pa izliti tečnost za upotrebu u vidu inokuluma brzinom od oko 10 mg/l mineralnog medijumuma.

Dalje smanjenje proizvodnje CO2 u slijepim probama može se postići dozračivanjem mulja preko noći vazduhom bez CO2. Upotrijebiti 4 mg/l čvrste supstance aktivnog mulja kao koncentraciju inokuluma u ovom testu.

Sekundarne otpadne vode

Druga mogućnost je da se inokulum dobije iz sekundarnih otpadnih voda iz postrojenja za prečišćavanje ili laboratorijaske jedinice u koje se pretežno dodaju komunalne otpadne vode. Održavati uzorak u aerobnim uslovima i upotrijebiti ga na dan skupljanja ili ga, po potrebi, prethodno kondicionirati. Otpadne vode treba filtrirati kroz grubi filtar kako bi se uklonile grube lebdeće čestice, a potom se mjeri pH vrijednost.

Za smanjenje sadržaja IC-a filtrat se 1 h produvava vazduhom bez CO2 dok se pH održava na 6,5 pomoću ortofosforne kiseline. pH vrijednost vraća se na početnu vrijednost pomoću natrijum hidroksida nakon taloženja od oko 1 h za inokulaciju se uzima prikladna količina supernatanta. Tim se postupkom smanjuje sadržaj IC-a u inokulumu. Ako se kao inokulum koristila maksimalna preporučena količina filtriranih produvanih otpadnih voda (100 ml) po litri, količina IC-a prisutna u posudama s kontrolnom slijepom probom kretala se u rasponu od 0,4 do 1,3 mg/l, što predstavlja 2-6,5 % ispitivane hemikalije C na 20 mg C/l i 4-13 % na 10 mg C/l.

Površinske vode

Treba uzeti uzorak prikladnih površinskih voda. Njega treba čuvati u aerobnim uslovima i upotrijebiti ga na dan uzimanja. Uzorak treba biti koncentrovan, ako je to potrebno, filtriranjem ili centrifugiranjem.

Zemljište

Treba uzeti uzorak prikladnog zemljišta koji se uzima na dubini do 20 cm ispod površine. Iz uzorka zemljišta treba odstraniti kamenčiće, ostatke biljaka i beskičmenjake prije nego što se on prosije kroz mrežicu veličine 2 mm (ako je uzorak premokar da bi ga se smješta moglo prosijati, djelimično ga osušiti na vazduhu kako bi se olakšalo prosijavanje). Treba ga držati u aerobnim uslovima i upotrijebiti na dan uzimanja (ako se uzorak prenosi u labavo vezanoj kesi od crnog polietilena, može se držati na 2 do 4 °C u toj kesi do mjesec dana).

Prethodno kondicioniranje inokuluma

Inokulum se može prethodno kondicionirati na uslove eksperimenta, ali se ne smije prethodno prilagoditi ispitivanoj hemikaliji. Prethodno kondicioniranje može smanjiti stvaranje CO2 u slijepim probama. Prethodno se kondicioniranje sastoji od dozračivanja aktivnog mulja nakon razrjeĐivanja u ispitnom medijumumu do 30 mg/l vlažnim vazduhom bez CO2 od 5-7 dana na ispitnoj temperaturi.

2.7. Postupak ispitivanja

Broj boca
Broj boca potrebnih za ispitivanje zavisi će od učestalosti analiza i trajanju ispitivanja.

Preporučuje se da se analiziraju tri boce nakon dovoljnog broja vremenskih razmaka takvih da se može identifikovati rok od 10 dana. Isto tako, na kraju ispitivanja analizira se najmanje pet boca kako bi se omogućilo da se izračuna 95 % intervala pouzdanosti za srednju vrijednost postotka biorazgradnje.

Inokulirani medij

Inokulum se koristi na koncentraciji od 4 mg/l suve supstance aktivnog mulja. Neposredno prije upotrebe pripremiti dovoljnu količinu inokuliranog medijumuma dodavanjem, 2 ml prikladno tretiranog aktivnog mulja na 2 000 mg/l u 1 litru medijumuma s mineralnim solima. Ako se trebaju koristiti sekundarne otpadne vode, dodaje se do 100 ml otpadnih voda u 900 ml medijumuma s mineralnim solima i razrijedi se medijem u 1 litru.

Priprema boca

Alikvoti inokuliranog medijumumuma stavljaju se u boce za višestruka određivanja kako bi se dobio odnos gasnog prostora i tečnosti od 1:2 (npr. dodati 107 ml u boce zapremine od 160 ml). Kada se koristi neka druga vrsta inokuluma, mora se pobrinuti da se inokulirani medijumum propisno promiješa kako bi se osiguralo da je ravnodnosno raspoređen u ispitnim bocama.

Pripremaju se setovi boca koji sadrže:

1) Ispitne boce (obilježene s FT) koje sadrže ispitivanu hemikaliju;
2) Kontrole sa slijepim probama (obilježene s FB) koje sadrže samo ispitni medijumum plus inokulum; takođe se moraju dodati i sve hemikalije, rastvarai, sredstva ili filtri od staklenih vlakana koji su se koristili za uvođenje ispitivane hemikalije u ispitne posude; 3) Posude (obilježene s FC) za provjeru postupka koje sadrže referentnu hemikaliju;
4) Ako je to potrebno, posude (obilježene s FI) za provjeru mogućeg inhibitornog efekta ispitivane hemikalije koje sadrže i ispitivanu hemikaliju i referentnu hemikaliju u istim koncentracijama kao i u bocama FT i FC;
5) Posude (obilježene s FS) za provjeru moguće abiotičke razgradnje kao (a) plus 50 mg/l HgCl2 ili sterilisane na neki drugi način (npr. u autoklavu).

Ispitivane i referentne hemikalije rastvorljive u vodi dodaju se kao vodeni radni rastvori kako bi se dobila koncentracija od 10 do 20 mg C/l.

Nerastvorljive ispitivane hemikalije i nerastvorljive referentne hemikalije dodaju se u boce na niz načina u zavisnosti od ispitivane hemikalije, bilo prije bilo poslije dodavanja inokuliranog medijumuma, u zavisnosti od metode obrade ispitivane hemikalije.

Isparljive ispitivane hemikalije treba ubrizgati u začepljene bode pomoću mikrošpriceva. Doza se iizračunava iz ubrizgane količine i gustine ispitivane hemikalije.

U posude treba dodati vodu, ako je to potrebno, kako bi u svakoj posudi bio isti volumen tečnosti. Mora se osigurati da odnos gasnog prostora i tečnosti (obično 1:2) i koncentracija ispitivane hemikalije budu takvi da u gasnom prostoru ima dovoljno kiseonika za potpunu biorazgradnju.

Potom se sve boce začepljuju, čepovima od butilnog kaučuka i aluminija. U ovoj fazi treba dodati isparljive ispitivane hemikalije. Ako treba pratiti pad koncentracije DOC-a u ispitnom rastvoru kao i za analizu u nultom vremenu za početnu koncentraciju IC-a (sterilne kontrole ili druge determinante, iz ispitne posude uzima se odgovarajući uzorak. Potom se ispitna posuda i njen sadržaj bacaju.

Začepljene boce stavljaju se na kružnu mućkalicu, a brzina mućkanja mora biti dovoljna da sadržaj boce bude dobro promiješan i u suspenziji (npr. 150 do 200 opm), te se inkubiraju u mraku na 20 °C, a temperatura se mora održavati na ± 1 °C.

Uzorkovanje

Režim uzorkovanja zavisi će od faze prilagoĐavanja i kinetičkoj brzini biorazgradnje ispitivane hemikalije. Boce se žrtvuju za analizu na dan uzorkovanja, što bi se trebalo dogaĐati najmanje jedanput nedeljno ili češće (npr. dvaput nedeljno) ako je potrebna kriva potpune razgradnje. Potrebni broj boca za višestruko određivanje uzima se iz mućkalice i predstavljaju FT, FB i FC te, ako se koriste, i FI i FS. Test se obično sprovodi 28 dana. Ako kriva biorazgradnje ukazuje da je plato postignut prije 28 dana, test se može završiti i ranije. Za analizu uzeti uzorke iz pet boca rezerviranih za 28. dan testa te rezultate iskoristiti za izračun granica pouzdanosti ili koeficijenta varijacije postotka biorazgradnje. Boce koje predstavljaju provjere inhibicije i abiotičke razgradnje ne trebaju se uzorkovati toliko često kao druge boce; dovoljno ih je uzorkovati 1. i 28. dana.

Analiza neorganskog ugljenika (IC)

Proizvodnja CO2 u bocama određuje se mjerenjem porasta koncentracije neorganskog ugljenika (IC) tokom inkubacije. Na rapolaganju su dvije preporučene metode za mjerenje količine IC-a proizvedene u testu, a slijedi njihov opis. Budući da te metode mogu dati malo različite rezultate, u ispitnom nizu treba koristiti samo jednu.

Metoda (a) preporučuje se ako je vjerovatno da medijumum sadrži ostatke, papira filtra od staklenih vlakana i/ili nerastvorljive ispitivane hemikalije. Ta se analiza može sprovoditi gasnim hromatografom ako nije dostupan analizator ugljenika. Važno je da boce budu na ili blizu ispitne temperature kad se analizira gas u gasnom prostoru. Metoda (b) može biti lakša za laboratorijae koji se koriste analizatorom ugljenika za mjerenje IC-a. Važno je da se rastvor natrijuma hidroksida upotrijebljena za pretvaranje CO2 u karbonat ili svježe pripremi ili da bude poznat njen sadržaj IC-a kako bi se to moglo uzeti u obzir pri iizračunavanju rezultata testa.

Metoda (a): acidifikacija na pH < 3

Prije svake serije analiza kalibriše se analizator IC-a primjenom odgovarajućeg standarda ICa (npr. 1 % w/w CO2 u N2). Koncentrovana ortofosforna kiselina ubrizgava se kroz septum svake uzorkovane boce radi snižavanja pH-a medijumuma na < 3 (npr. dodati 1 ml u 107 ml ispitnog medijumuma). Boce se ponovno vraćaju na mućkalicu. Nakon mućkanja od sat vremena na ispitnoj temperaturi boce se skidaju s mućkalice, iz gasnog prostora svake boce uzimaju se alikvoti (npr. 1 ml) gasa i isti se ubrizgavaju u analizator IC-a. Izmjerene koncentracije IC-a bilježe se kao mg C/l.

Načelo ove metode jeste da, nakon acidifikacije na pH < 3 i uravnotežavanja na 20 °C, konstanta uravnotežavanja za raspodjelu CO2 između tečnog i gasnog stanja u

ispitnim bocama iznosi 1,0 kada se mjeri kao koncentracija. To bi se trebalo pokazati za sistem ispitivanja najmanje jedanput na sljedeći način:

Postaviti boce koje sadrže 5 i 10 mg/l kao IC upotrebom rastvora anhidridnog natrijuma karbonata (Na2 CO3) u vodi bez CO2 koja se priprema acidifikacijom vode na pH 6,5 koncentrovanom ortofosfornom kiselinom, produvavanjem preko noći vazduhom bez CO2 i podizanjem pH bazama do neutralnosti. Osigurati da odnos volumena gasnog prostora i volumena tečnosti bude isti kao i u testu (npr. 1:2). Acidifikovati i uravnotežiti na način opisan niže, potom izmjeriti koncentracije IC-a i gasnog (gasni prostor) i tečnog stanja. Provjeriti jesu li te dvije koncentracije jednake unutar eksperimentalne greške. Ako to nije slučaj, operater treba da reviduje postupke. Ta provjera raspodjele IC-a između tečnog i gasnog stanja ne treba se sprovoditi svaki put kad se sprovodi test; ista se vjerovatno može ssprovesti pri kalibraciji.

Ako treba izmjeriti opadanje DOC-a (samo ispitivane hemikalije rastvorljive u vodi), treba uzeti uzorke u tečnom stanju iz zasebnih (neacidifikovanih) boca, filtrirati ih kroz membranu i ubrizgati ih u analizator DOC-a. Te se boce mogu, po potrebi, koristiti i za druge analize kako bi se izmjerila primarna biorazgradnja.

Metoda (b): pretvaranje CO2 u karbonat

Prije svake serije analiza kalibriše se analizator IC-a primjenom odgovarajućeg standarda, rastvora natrijum bikarbonata (NaHCO3) u vodi bez CO2 u rasponu od 0 do 20 mg/l kao IC. Rastvor natrijuma hidroksida (7M, stav 21.) (npr. 1 ml u 107 ml medijumuma) ubrizgava se kroz septum svake uzorkovane boce, a boce se mućkaju 1 h na ispitnoj temperaturi. Koristiti isti rastvor NaOH na svim bocama žrtvovanima određenog dana, ali ne nužno u svim prilikama za uzorkovanje tokom testa. Ako su u svim prilikama za uzorkovanje potrebne apsolutne vrijednosti IC-a u slijepim probama, treba odrediti IC rastvora NaOH svaki put kad se ista koristi. Boce se skidaju s mućkalice i puštaju se da se istalože. Špricom se izvlače prikladne količine (npr. 50 do 1 000 µl) u tečnom stanju iz svake posude. Uzorci se ubrizgavaju u analizator IC-a i bilježe se koncentracije IC-a. Treba osigurati da je korišteni analizator propisno opremljen kako bi mogao analizirati bazne uzorke koji nastaju u ovoj metodi.

Načelo ove metode jeste da je, nakon dodavanja baza i mućkanja, zanemariva koncentracija IC-a u gasnom prostoru. To treba provjeriti za sistem ispitivanja najmanje jedanput korištenjem standarda IC-a, dodavanjem baza i uravnoteživanjem te mjerenjem koncentracije IC-a i u gasnom prostoru i u tečnom stanju. Koncentracija u gasnom prostoru treba biti blizu nule. Ta provjera virtualno potpune apsorpcije CO2 ne mora se sprovoditi svaki put kad se sprovodi test.

Ako treba izmjeriti opadanje DOC-a (samo ispitivane hemikalije rastvorljive u vodi), treba uzeti uzorke u tečnom stanju iz zasebnih boca (koje ne sadrže dodane baze), filtrirati ih kroz membranu i ubrizgati ih u analizator DOC-a. Te se boce mogu, po potrebi, koristiti i za druge analize kako bi se izmjerila primarna biorazgradivost.

3. Podaci i izvještavanje

Izračunavanje rezultata

Pod pretpostavkom 100 %-tne mineralizacije ispitivane hemikalije u CO2, višak ThIC-a proizvedenog u kontrolnim slijepim probama jednak je TOC-u koji se na početku testa dodaje u svaku ispitnu bocu, to jest:

$$ThIC=TOC$$

Ukupna masa (mg) neorganskog ugljenika (TIC) u svakoj boci je:

TIC=(mgC u tečnosti+mgC u gasnom prostoru)

gdje je:

VL=volumen tečnosti u boci (litra),

CL=koncentracija IC-a u tečnosti (mg/l kao ugljenika),

VH=volumen gasnog prostora (litra),

CH=koncentracija IC-a u gasnom prostoru (mg/l kao ugljenika).

Proračuni TIC-a za ove dvije analitičke metode koje se koriste za mjerenje IC-a u ovom testu opisane niže. Postotak biorazgradnje (% D) u svakom slučaju dobija se ovako:

$$\%D=((TIC\_t-TIC\_b\ ))/TOC\times100$$

gdje je:

TICt=mg TIC-a u ispitnoj boci u vrijeme t,

TICb=srednja vrijednost mg TIC-a u bocama sa slijepim probama u vrijeme t,

TOC=mg TOC-a dodanih na početnu u ispitnu posudu.

Iizračunava se postotak biorazgradnje % D za ispitnu bocu (FT), referentnu bocu (FC) i, ako je i to obuhvaćeno, za kontrolne boce za praćenje inhibicije (FI) iz odgovarajućih količina TIC-a proizvedenih do svakog trenutka uzorkovanja.

Ako je došlo do značajnog porasta sadržaja TIC-a u sterilnim kontrolama (FS) tokom trajanja testa, može se zaključiti da je došlo do abiotičke razgradnje ispitivane hemikalije i to se mora uzeti u obzir u iizračunavanju D.

Acidifikacija na pH < 3

Budući da acidifikacija na pH < 3 i uravnoteženje rezultiraju ujednačenjem koncentracije TICa u tečnom i gasnom stanju, treba mjeriti samo koncentraciju IC-a u gasnom stanju.

TIC=(V_L+V_H)×C_H=V_B×C_H, gdje je VB = volumen serum boce.

Pretvaranje CO2 u karbonat

U ovoj se metodi iizračunavanje sprovode, ali se ignoriše zanemariva količina IC-a u gasnom stanju, to jest

$V_H \times C_H = 0$ i

$TIC = V_L \times C_L$

Izražavanje rezultata

Kriva biorazgradnje dobija se grafičkim prikazom postotka biorazgradnje D u zavisnosti od vremena inkubacije i, ako je to moguće, naznačuju se faza prilagoĐavanja, faza biorazgradnje, rok od 10 dana i faza platoa, to jest faza u kojoj je postignuta maksimalna razgradnja i u kojoj se direktnala kriva biorazgradnje. Ako se za paralelne ispitne posude dobiju rezultati FT (< 20 % razlike), grafički se prikazuje srednja vrijednost krive (vidjeti Dodatak 2., slika 1.); a ako ne, krive se grafički prikazuju za svaku posudu. Određuje se srednja vrijednost postotka biorazgradnje u fazi platoa ili se procjenjuje najviša vrijednost (npr. kad kriva opada u fazi platoa), ali je vrlo važno ocijeniti da u poslednjem slučaju ta vrijednost ne bude netipična. Naznačiti maksimalnu nivo biorazgradnje kao „stepen biorazgradnje ispitivane hemikalije‖ u izvještaju o ispitivanju. Ako broj ispitnih posuda nije bio dovoljan za naznaku faze platoa, za izračun srednje vrijednosti koriste se podaci izmjereni posljednjeg dana testa. Ta posljednja vrijednost, srednja vrijednost pet višestrukih određivanja, služi kao naznaka preciznosti kojom je određen postotak biorazgradnje. Isto tako, treba izvijestiti i o vrijednosti dobijenoj po isteku roka od 10 dana.

Na isti se taj način grafički prikazuje kriva za referentnu hemikaliju, FC, te, ako je i to obuhvaćeno, i za provjeru abiotičke eliminacije, FS, i za kontrolu inhibicije, FI.

Bilježe se količine TIC-a u kontrolama sa slijepim probama (FB), kao i one u bočicama FS (abiotička provjera) ako su te posude bile obuhvaćene testom.

Izračunati D za posude FI, i to na osnovu prinosa teoretskog IC-a očekivanog samo iz referentne komponente te smješe. Ako je, 28. dana $[(DFC - DFI)/DFC] \times 100 > 25$ %, može se pretpostaviti da je ispitivana hemikalija inhibirala djelovanje inokuluma, a to može biti zaslužno za niske vrijednosti DFT dobijene u uslovima testa. U tom se slučaju test može ponoviti s nižom ispitnom koncentracijom te, po mogućnosti, smanjenjem DIC-a u inokulumu i TIC-a nastalog u kontrolama sa slijepim probama jer će niže koncentracije u protivnom smanjiti preciznost ove metode. Druga je mogućnost upotreba drugog inokuluma. Ako se u bočici FS (abiotička) primijeti značajan porast (> 10 %) količine TIC-a, možda je došlo do procesa abiotičke razgradnje.

Valjanost rezultata

Ispitivanje se smatra valjanim:

- ako je srednja izmjerena vrijednost postotka razgradnje u posudama FC koje sadrže referentnu hemikaliju > 60 % do 14. dana inkubacije i ako je srednja izmjerena vrijednost količine TIC-a prisutna u kontrolama sa slijepim probama FB na kraju ispitivanja < 3 mg C/l.
- ako nisu ispunjena ta ograničenja, ispitivanje bi trebalo ponoviti s inokulumom iz drugog izvora i/ili bi trebalo preispitati primijenjene postupke.

Ako ispitivana hemikalija ne dosegne 60 % ThIC-a te ako se pokaže da ona nema inhibitorni efekat, test se može ponoviti s povišenom koncentracijom inokuluma (do 30 mg/l aktivnog mulja i 100 ml otpadnih voda/l) ili s inokulumima iz drugih izvora, ako se razgradnja kretala u rasponu od 20 do 60 %.

Tumačenje rezultata

Biorazgradnja > 60 % ThIC-a u roku od 10 dana u ovom testu pokazuje da je ispitivana hemikalija lako biorazgradiva u aerobnim uslovima.

Ako se ne postigne prolazna vrijednost od 60 %, odrediti pH vrijednost medijumuma u bocama koji nije učinjen ni kiselim niti baznim; vrijednost niža od 6,5 mogla bi biti znak nitrifikacije. U takvom slučaju ponoviti test s puferskim rastvorom više koncentracije.

Izvještaj o ispitivanju

Sastaviti tabelu % D za svaku ispitnu bocu (FT), referentnu bocu (FC) i, ako je obuhvaćena, kontrolnu bocu za provjeru inhibicije (FI) za svaki dan uzorkovanja. Ako se za boce za višestruko određivanje dobiju poredbeni rezultati, grafički prikazati krivu srednje vrijednosti % D u zavisnosti od vremenu. Zabilježiti količinu TIC-a u kontrolama sa slijepim probama (FB) i u sterilnim kontrolama (FS), DOC-a i/ili drugih determinanti te postotak njihova rastvaranja.

Odrediti srednju vrijednost % D u fazi platoa ili koristiti najvišu vrijednost ako kriva biorazgradnje opadne u fazi platoa, a to prijaviti kao „stepen biorazgradnje ispitivane hemikalije‖ . Važno je osigurati da u poslednjem slučaju najviša vrijednost ne bude netipična.

Izvještaj o ispitivanju mora obuhvatati sljedeće podatke:

Ispitivana hemikalija:

— uobičajeni naziv, hemijski naziv, CAS broj, strukturna formula i relevantna fizičko-hemijska svojstva;

— čistoća (nečistoće) ispitivane hemikalije.

Uslovi ispitivanja:

— upućivanje na ovu ispitnu metodu;

— opis korištenog sistema ispitivanja (npr. zapremina posude, odnos gasnog prostora i tečnosti, metoda miješanja itd.);

— primjena ispitivane hemikalije i referentne hemikalije na sistem ispitivanja: korištena ispitna koncentracija i količina ugljenika dozirana u svaku ispitnu bocu, upotreba rastvarača;

— pojedinosti o korištenom inokulumu, sve prethodne obrade i prethodno kondicioniranje;

— temperatura inkubacije;

— validacija načela analize IC-a;

— osnovna svojstva korištenog analizatora IC-a (i sve ostale korištene analitičke metode);

— broj određivanja.

Rezultati:

— sirovi podaci i izračunate vrijednosti biorazgradivosti u obliku tabele;

— grafikon postotka razgradnje u zavisnosti od vremena za ispitivane i referentnim hemikalijama, fazi prilagođavanja, fazi razgradnje, roku od 10 dana i nagibu;

— postotak rastvaranja na platou na kraju testa i po isteku roka od 10 dana;

— obrazloženje odbijanja rezultata ispitivanja;

— sve ostale činjenice relevantne za postupak koji se slijedio;

— rasprava o rezultatima.

Dodatak 1.

SKRAĆENICE I DEFINICIJE

IC: Neorganski ugljenik

ThCO2: Teoretski ugljenikov dioksid (mg) je izračunata količina ugljen dioksida koja će nastati iz poznatog i izmjerenog sadržaja ugljenika ispitivane hemikalije nakon njene potpune mineralizacije; takođe se izražava i kao mg ugljen dioksida koji nastane po mg ispitivane hemikalije.

DOC: Rastvoreni organski ugljenik je organski ugljenik prisutan u rastvoru ili onaj koji prolazi kroz filtar veličine 0,45 mikrometara ili ostaci u supernatantu nakon centrifugiranja na približno 4 000 g (oko 40 000 m sec-2) tokom 15 min.

DIC: Rastvoreni neorganski ugljenik

ThIC: Teoretski neorganski ugljenik

TIC: Ukupni neorganski ugljenik

Lako biorazgradivo: Proizvoljno klasifikovanje hemikalija koje su prošle određene specificirane testove pretraživanja na konačnu biorazgradivost; ti su testovi toliko strogi da se pretpostavlja da će se takve hemikalije brzo i potpuno biorazgraditi u vodenom životnoj sredini u aerobnim uslovima.

Rok od 10 dana 10 dana neposredno poslije postizanja 10 % biorazgradnje.

Svojstvena biorazgradivost: Klasifikovanje hemikalija za koje postoje nedvosmisleni dokazi biorazgradnje (primarne ili konačne) u bilo kojem ispitivanju biorazgradivosti.

Konačna aerobna biorazgradnja: Nivo biorazgradnje koja se postigne kad mikroorganizmi u cijelosti prožmu ispitivanu hemikaliju, što rezultira proizvodnjom ugljen dioksida, vode, mineralnih soli i novim mikrobnim staničnim sastojcima (biomasom).

Mineralizacija: Mineralizacija je potpuna biorazgradnja neke organske hemikalije u CO2 i H2O u aerobnim uslovima te u CH4, CO2 i H2O u anaerobnim uslovima.

Faza prilagoĐavanja (‚lag' faza): Vrijeme od početka testa do postizanja aklimatizacije i/ili prilagoĐavanja razgraĐujućih mikroorganizama i do porasta stepena biorazgradnje ispitivane hemikalije ili organske supstance (npr. 10 % maksimalne teoretske biorazgradnje ili niže, zavisno od završetka faze prilagoĐavanja do trenutka kad se postigne 90 % maksimalnog nivoa razgradnje.

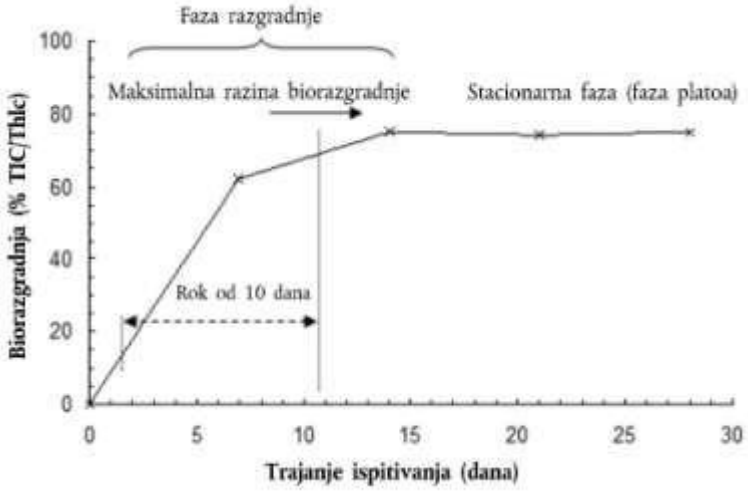
Stacionarna faza (faza platoa): Faza platoa je faza u kojoj je postignuta maksimalna razgradnja i u kojoj se direktnala kriva biorazgradnje.

Ispitivana hemikalija: Sve supstance ili smješe koje se ispituju ovom ispitnom metodom.

Dodatak 2.

Primjer krive biorazgradnje

Slika 1. Biorazgradnja 1-oktanola u ispitivanju CO2 u gasnom prostoru



1. Uvod

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 317 (2010). Od ispitnih metoda koje se odnose na sudbinu u životnoj sredini, Biokoncentracija: Test s ribama u protočnom postupku (poglavlje C.13 ovog Priloga (49)) objavljena je 1996., a Bioakumulacija u bentičkim oligohetima iz sedimenta. Ekstrapolacija podataka o vodenoj bioakumulaciji kod kopnenih organizama, poput kišnih glista, je teška. Modeli izračunavanja ubazirajunih na lipofilnosti ispitivane hemikalije, se koriste za procjenu bioakumulacije hemikalija u zemljištu. Već je obrađena potreba za ispitnom metodom specifičnom za ovo područje. Takva je metoda važna za procjenu sekundarnog trovanja u kopnenim prehrambenim lancima. Nekoliko se nacionalnih ispitinih metoda bavilo pitanjem bioakumulacije u drugim organizmima osim riba. Metodu mjerenja bioakumulacije iz zagađenih zemljišta u kišnim glistama (Eisenia fetida, Savigny) i crvima razvilo je Američko društvo za testiranje i materijale (American Society for Testing and Materials). Međunarodno prihvaćena metoda za određivanje bioakumulacije u zemljištu obrađenom spikingom poboljšat će procjenu rizika hemikalija u kopnenim ekosistemima.

Beskičmenjaci koji konzumiraju zemljište izloženi su hemikalijama vezanim za isto. Među tim životinjama kopneni oligoheti igraju važnu ulogu u strukturi i funkciji zemljišta. Kopneni oligoheti žive u zemljištu, a djelimično i na površini (poglavito u sloju legla); oni često predstavljaju vrstu koja najviše obiluje biomasom. Bioturbacijom zemljišta te služenjem kao plijen, ove životinje mogu snažno uticati na biorapoloživost hemikalija drugim organizmima, poput beskičmenjaka (npr. grinja i kornjaša; ili kičmenjaka grabežljivaca (npr. lisica i galebova). Neke vrste kopnenih oligoheta koje se trenutno koriste u ispitivanjima ekotoksičnosti opisane su u Dodatku 5.

Standardni vodič za provođenje laboratorijaskog ispitivanja toksičnosti ili bioakumulacije zemljišta Američkog društva za testiranje i materijale (ASTM Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests) s kišnom glistom Eisenia fetida i bijelim crvom Enchytraeus albidus donosi brojne ključne i korisne pojedinosti za sprovođenje ove ispitne metode bioakumulacije u zemljištu. Dalji dokumenti na koje se upućuje u ovoj ispitnoj metodi jesu poglavlje C.13 ovog Priloga, Biokoncentracija: Test s ribama u protočnom postupku i OECD TG 315: Bioakumulacija u bentičkim oligohetima iz sedimenta. Praktična iskustva sa studijama o bioakumulaciji u zemljištu su glavni izvori informacija za ovu ispitnu metodu.

Ova se ispitna metoda uglavnom može primijeniti na stabilne, neutralne organske hemikalije, koje naginju adsorpciji na zemljištu. Ovom ispitnom metodom moguće je testiranje na bioakumulaciju stabilnih metaloorganskih jedinjenja koji se vežu za zemljište. Također se može primijeniti i na metale i druge elemente u tragovima.

1.1. Preduslovi

Testovi za mjerenje bioakumulacije hemikalije u kopnenim oligohetima sprovođeni su s teškim metalima i s dugotrajnim, organskim hemikalijama niskih log Kow vrijednosti između 3,0 i 6,0, npr.. Takvi se testovi primjenjuju i na:

— Hemikalije s vrijednostima log Kow većima od 6,0 (superhidrofobne hemikalije);

— Hemikalije koje pripadaju klasau organskih hemikalija za koje je poznato da imaju bioakumulacijski potencijal u živim organizmima, npr. površinski aktivne ili jako adsorptivne

hemikalije; — Hemikalije koje naznačuju bioakumulacijski potencijal zbog strukturnih svojstava, npr.

analogoni hemikalija s poznatim bioakumulacijskim potencijalom; i

— Metale.

Podaci o ispitivanoj hemikaliji, kao što su uobičajeni naziv, hemijski naziv (po mogućnosti IUPAC naziv), strukturna formula, CAS registarski broj, čistoća, mjere opreza, ispravni uslovi skladištenja i analitičke metode trebaju se dobiti prije početka studije. Osim toga, trebaju biti poznati i sljedeći podaci:

- rastvorljivost u vodi;
- napon pare;
- razgradivost (npr. u zemljištu, vodi); - poznati metaboliti.

Mogu se koristiti radioaktivno obilježene i radioaktivno neobilježene ispitivane hemikalije. Međutiim, radi olakšavanja analize preporučuje se korištenje radioaktivno obilježenih ispitivanih hemikalija. Odluka o tomu donosi se na osnovu otkrivanja ograničenja ili traženja mjerenja polazne ispitivane hemikalije i metabolita. Ako se koristi radioaktivno obilježena ispitivana hemikalija i mjere ukupni radioaktivni ostaci, važno je karakterisati radioaktivno obilježene ostatke i u zemljištu i u ispitnim organizmima, i to po pitanju postotka polazne ispitivane hemikalije i radioaktivno obilježene hemikalije, npr. u uzorcima uzetima u stabilnom stanju ili na kraju faze apsorpcije kako bi se omogućio izračun faktora bioakumulacije (BAF) za polaznu ispitivanu hemikaliju i predmetne metabolite zemljišta. Možda će se ovdje opisana metoda morati izmijeniti kako bi se npr. omogućilo dovoljno biomase za mjerenje radioaktivno neobilježene organske ispitivane hemikalije ili metala.

Kada se mjere ukupni radioaktivni ostaci (tečnim scintilacijskim brojenjem nakon ekstrakcije, izgaranja ili rastvaranjem tkiva), faktor bioakumulacije bazira se na polaznoj ispitivanoj hemikaliji i metabolitima. Izračun BAF-a trebao bi se, po mogućnosti, bazirati na koncentraciji polazne ispitivane hemikalije u organizmima i ukupnim radioaktivnim ostacima. Nakon toga iz BAF-a treba izračunati faktor akumulacije u biota tlu (BSAF), normaliziran na sadržaj lipida u crvu i sadržaj organskog ugljenika (OC), radi poređenja rezultata različitih ispitivanja bioakumulacije.

Trebala bi biti poznata toksičnost ispitivane hemikalije na vrste korištene u testu, npr. koncentracija sa efektom (ECx) ili smrtonosna koncentracija (LCx) za vrijeme trajanja faze apsorpcije (npr. (19)). Odabrana koncentracija ispitivane hemikalije trebala bi, po mogućnosti, iznositi oko 1 % njena akutnog asimptotskog LC50 te biti najmanje desetostruko veća od svojih granica detekcije u zemljištu korištenom analitičkom metodom. Ako su dostupne, prednost treba dati vrijednostima toksičnosti dobijenima iz dugotrajnih studija o subletalnim konačnim efektima. Ako takvi podaci nisu dostupni, test akutne toksičnosti dat će korisne informacije.

Treba biti dostupna prikladna analitička metoda poznate tačnosti, preciznosti i osjetljivosti na kvantifikaciju hemikalije u ispitnim rastvorama, u zemljištu i u biološkom materijalu, zajedno s pojedinostima o pripremi i skladištenju uzoraka, kao bezbjednosnim listovima za materijale.

Takođe trebaju biti poznate i analitičke granice detekcije ispitivane supstance u zemljištu i u tkivu crva. Ako se koristi 14C obilježena ispitivana hemikalija, trebaju biti poznati specifična radioakitvnost (tj. Bq mol-1) i postotak radioaktivnosti povezan s nečistoćama. Specifična

radioaktivnost ispitivane hemikalije treba biti dovoljno velika da olakša analizu, a upotrijebljene ispitne koncentracije ne smiju izazivati toksične efekte.

Ispitivanje se može sprovoditi s dodatnim zemljištem ili s prirodnim zemljištimaa. Prije početka ispitivanja trebaju biti poznati podaci o svojstvima korištenog prirodnog zemljišta npr. porijeklo tzemljišta ili njegovih sastojaka, pH, sadržaj organskog ugljenika, raspodjela veličine čestica (postotak pijeska, praha i gline) te vodni kapacitet (WHC) (3) (48).

1.2. Načelo ispitivanja

Parametri koji karakterišu bioakumulaciju ispitivane hemikalije obuhvataju i faktor bioakumulacije (BAF), konstantu brzine apsorpcije (ks) i konstantu brzine eliminacije (ke). Definicije su navedene u Dodatku 1.

Ispitivanje se sastoji od dviju faza: faze apsorpcije (faze izlaganja) i faze eliminacije (faze nakon izlaganja). Tokom faze apsorpcije grupe crva u višestrukim određivanjima izlažu se zemljištu, koje je spikingom obrađeno ispitivanom hemikalijom. Osim ispitnih životinja, kontrolne grupe crva drže se u istim uslovima, samo bez ispitivane hemikalije. Mjere se suva masa i sadržaj lipida ispitnih organizama. To se može učiniti i s crvima iz kontrolne grupe. Analitičke pozadinske vrijednosti (slijepe probe) mogu se dobiti analizom uzoraka kontrolnih crva i zemljišta. Za fazu eliminacije crvi se prenose u zemljište u kojem nema ispitivane hemikalije. Faza eliminacije uvijek je potrebna, osim ako je apsorpcija ispitivane hemikalije bila neznatna tokom faze izlaganja. Faza eliminacije donosi podatke o brzini kojom ispitni organizmi izlučuju ispitivanu hemikaliju. Ako se tokom faze apsorpcije ne postigne stabilno stanje, određivanje kinetičkih parametara - faktora kinetičke bioakumulacije BAFk, konstante brzine apsorpcije i eliminacije - u pravilu bi se trebalo bazirati na istovremenom usklađivanju rezultata faze apsorpcije i faze eliminacije. Koncentracija ispitivane hemikalije u/na crvima prati se tokom obje faze ispitivanja.

Tokom faze apsorpcije mjerenja se vrše u vremenima uzorkovanja od 14 dana (enhitreji) ili od 21 dana (kišne gliste) sve dok se ne postigne stabilno stanje. Stabilno je stanje postignuto kad je grafički prikaz koncentracije u crvima u zavisnosti od vremena paralelan s vremenskom osi te kada tri uzastopne analize koncentracije u uzorcima uzetima u vremenskim razmacima od najmanje dva dana ne variraju više od ± 20 % jedna od druge na osnovu statističkih poređenju (npr. analiza varijance, regresiona analiza).

Faza eliminacije sastoji se od prenosa ispitnih organizama u posude koje sadrže isti supstrat, samo bez ispitivane hemikalije. Tokom faze eliminacije mjerenja se vrše u vremenima uzorkovanja tokom 14 dana (enhitreji) ili 21 dana (kišne gliste), osim ako prethodno analitičko određivanje nije pokazalo 90 % smanjenja ostataka ispitivane hemikalije u crvima. Koncentracija ispitivane hemikalije u crvima na kraju faze eliminacije prijavljuje se kao neeliminirani ostaci. Faktor bioakumulacije stabilnog stanja (BAFss) računa se, po mogućnosti, i kao odnos koncentracije u crvima (Ca) i u tlu (Cs) u očito stabilnom stanju i kao faktor kinetičke bioakumulacije, BAFK, kao odnos konstante brzine apsorpcije iz tla (ks) i konstante brzine eliminacije (ke) (Dodatak 1.), pod pretpostavkom kinetike prvog reda (Dodatak 2.). Ako je očito da se ne može primijeniti kinetika prvog reda, treba se koristiti drugim modelima.

Konstanta brzine apsorpcije, konstanta (ili konstante kada su obuhvaćeni i drugi modeli) brzine eliminacije, faktor kinetičke bioakumulacije (BAFK) te, kad je moguće, granice pouzdanosti svih tih parametara iizračunavaju se iz jednačina kompjutorizovanog modela (za smjernice vidjeti Dodatak 2.). Ispravnost usklađenosti bilo kojeg modela može se

odrediti, npr. iz koeficijenta korelacije ili koeficijenta određivanja (koeficijenti blizu jedinice znak su dobre usklađenosti) ili hi-kvadratom. Isto tako, i veličina standardne greške ili granica pouzdanosti blizu procijenjenih parametara mogu biti znak direktne usklađenosti modela.

Da bi se smanjila varijabilnost rezultata ispitivanja za ispitivane hemikalije visoke lipofilnosti, faktori bioakumulacije trebali bi se izražavati u odnosu na sadržaj lipida i sadržaj organskog ugljenika (kg organskog ugljenika u tlu (OC) kg-1 sadržaja lipida u crvima). Taj se pristup bazira na činjenici da za neke klase hemikalija postoji jasna veza između bioakumulacionog potencijala i lipofilnosti; to je dobro utvrđeno za ribe. Postoji veza između sadržaja lipida u ribama i bioakumulacije takvih hemikalija. Slične su korelacije pronađene i za bentičke organizme. Slično tome, ta je korelacija pokazana i za kopnene oligohete. Ako je na rapolaganju dovoljno tkiva crva, sadržaj lipida ispitnih životinja može se odrediti na istom biološkom materijalu koji se koristio za određivanje koncentracije ispitivane hemikalije. Druga je mogućnost upotreba kontrolnih životinja za mjerenje sadržaja lipida.

1.3. Valjanost ispitivanja

Da bi ispitivanje bilo valjano, moraju biti ispunjeni sljedeći kriterijumi i za kontrolne i za ispitne posude:

- Na kraju ispitivanja ukupna smrtnost tokom faze apsorpcije i faze eliminacije ne bi trebala biti veća od 10 % (kišne gliste) ili 20 % (enhitreji) od ukupnog broja uvedenih crva.
- Za Eisenia fetida i Eisenia andrei srednja vrijednost gubitka mase izmjerena na kraju faze apsorpcije i na kraju faze eliminacije ne bi trebala premašivati 20 % u poređenju s početnom svježom masom (f.w.) na početku svake faze.

2.1 Opis metode

Ispitne vrste

Za ispitivanje bioakumulacije preporučuje se nekoliko vrsta kopnenih oligoheta. Najčešće korištene vrste Eisenia fetida ili Eisenia andrei (Lumbricidae), ili Enchytraeus albidus, Enchytraeus crypticus, ili Enchytraeus luxuriosus (Enchytraeidae) opisane su u Dodatku 5.

Aparatura

Treba se pobrinuti da se izbjegava upotreba materijala, za sve dijelove opreme, koji se mogu rastvarati, adsorbovati ispitivanu hemikaliju ili propuštati druge hemikalije te onih koji imaju negativan efekat na ispitne životinje. Standardne pravougaone ili cilindrične posude, napravljene od hemijski inertnog materijala i prikladne zapremine, mogu se koristiti u skladu s brzinom punjenja, tj. brojem ispitnih crva. Plemeniti čelik, plastika ili staklo mogu se koristiti za svu opremu koja dolazi u doticaj s ispitnim medijumumom. Ispitne posude treba prikladno zatvoriti kako bi se izbjegao bijeg crva te ujedno omogućio dovoljan dotok vazduha. Za hemikalije s visokim koeficijentima adsorpcije, kao što su sintetički piretroidi, možda će biti potrebno silanizirano staklo. U tim će se situacijama oprema morati baciti nakon upotrebe. Treba spriječiti izlazak radioaktivno obilježenih ispitivanih hemikalija i isparivih hemikalija. Treba koristiti zamke (npr. staklene posude za pranje gasova) koje sadrže odgovarajuće apsorbente kako bi se zadržali svi ostaci koji isparavaju iz ispitnih posuda.

Zemljište

Kvalitet ispitnog zemljišta treba omogućiti preživljavanje i, po mogućnosti, razmnožavanje ispitnih organizama za trajanja aklimatizacije i perioda ispitivanja, a da pritom oni ne pokazuju nikakvo neuobičajeno ponašanje ili izgled. Crvi bi trebali rovati u zemljištu.

Kao supstrat u ispitivanjima, preporučuje se upotreba dodatnog zemljišta opisanog u poglavlju C.8 ovog Priloga. Priprema dodatnogzemljišta za upotrebu u ispitivanjima bioakumulacije i preporuke za skladištenje nalaze se u Dodatku 4. Dodato zemljište sušeno na vazduhu može se skladištiti na sobnoj temperaturi do upotrebe.

Međutiim, prirodna zemljišta s nezagaĐenih mjesta mogu poslužiti kao ispitno zemljište i/ili zemljište za uzgoj kultura. Za prirodna zemljišta treba biti svojstveno porijeklo (mjesto skupljanja), pH, sadržaj organskog ugljenika, raspodjela veličine čestica (postotak pijeska, praha i gline), maksimalni vodni kapacitet (WHCmax) te postotak sadržaja vode. Analiza zemljišta ili njegovih sastojaka na mikrozagaĐivače prije upotrebe trebala bi dati korisne informacije. Ako se koristi zemljište s poljoprivrednog zemljišta, isto ne smije biti tretirano proizvodima za zaštitu usjeva niti balegom tretiranih životinja kao gnojivom najmanje godinu dana ranije, a organskim gnojivima najmanje šest mjeseci prije uzorkovanja. Postupci manipulacije prirodnih zemljišta prije njihove upotrebe u ispitivanjima ekotoksičnosti s oligohetima u laboratorijau opisani su niže. Vrijeme skladištenja prirodnih zemljišta u laboratorijau treba biti što je moguće kraće.

Primjena ispitivane hemikalije

Ispitna se hemikalija inkorporira u zemljište. U obzir treba uzeti fizičko-hemijska svojstva ispitivane hemikalije. Ispitivana hemikalija rastorljiva u vodi treba se potpuno rastvoriti u vodi prije miješanja sa zemljištem. Preporučeni postupak spikinga za ispitivane hemikalije slabo rastvorljive u vodi obuhvata premazivanje jednog ili većeg broja sastojaka zemljišta ispitivanom hemikalijom. Kvarc ili njegov dio mogu se prastvoriti u rastvoru ispitivane hemikalije u prikladnom organskom rastvoru, koji onda polako isparava dok ne ostavi suvi pijesak. Premazani dio potom se može umiješati u vlažno zemljište. Glavna prednost ovog postupka jeste taj da se u zemljište uvodi rastvarač. Kada se koristi prirodno zemljište, ispitivana hemikalija može se dodati postupkom spikinga dijela zemljišta sušenog na vazduhu na gore opisani način za ubaceno zemljište ili miješanjem ispitivane hemikalije u vlažno zemljište, uz naknadnu fazu isparavanja ako se koristi ot sredstvo za rastvaranje. Što je moguće više treba izbjegavati dovod vlažnog zemljišta sa rastvaračima. U obzir treba uzeti sljedeće (3):

- Ako se koristi neki drugi rastvarač osim vode, ono treba biti mješljivo s vodom i/ili treba izaći (ispariti) i ostaviti samo ispitivanu hemikaliju na zemljištu.
- Ako se koristi kontrola sa rastvaračem, nema potrebe za negativnom kontrolom. Kontrola s rastvaračem trebala bi sadržavati najvišu koncentraciju rastvarača koja se dodaju zemljištu i u njoj se treba koristiti rastvarač iz iste šarže koja se koristila za radni rastvor. Glavni kriterijum za izbor odgovarajućeg sredstva za rastvaranje trebali bi biti toksičnost i isparljivost rastvarača, rastvorljivost ispitivane hemikalije u odabranom rastvoru.

Za hemikalije koje su slabo rastvorljive u vodi i u organskim rastvaračima 2,0 - 2,5 g fino usitnjenog kvarca po ispitnoj posudi može se pomiješati s količinom ispitivane hemikalije, npr. upotrebom maltera i tucanog pijeska, za dobijanje željene ispitne koncentracije. Ta se smješa kvarca i ispitivane hemikalije dodaje prethodno navlaženom zemljištu i bazirano se izmiješa s odgovarajućom količinom dejonizovane vode da bi se dobio potrebni sadržaj

vlage. Konačna se smješa podijeli na ispitne posude. Taj se postupak ponavlja za svaku ispitnu koncentraciju, a pripremi se takoĐe i kontrola s 2,0 - 2,5 g fino usitnjenog kvarca po ispitnoj posudi. Koncentracija ispitivane hemikalije u zemljištu treba se odrediti nakon postupka spikinga. Homogena raspodjela ispitivane hemikalije u zemljištu treba se provjeriti prije uvođenja ispitnih organizama. Treba izvijestiti o metodi koja se koristila za spiking te o razlozima za izbor specifičnog postupka spikinga.

Između zemljišta i faze međuprostorne vode, u idealnom slučaju, trebala bi se uspostaviti ravnoteža prije dodavanja organizama; preporučuje se vremensko period od četiri dana na 20 °C. Za mnoge organske hemikalije slabo rastvorljive u vodi vrijeme potrebno za postizanje prave ravnoteže između adsorbiranih i rastvorenih dijelova može biti nekoliko dana ili nekoliko mjeseci. U zavisnosti od cilja studije, npr kada treba imitirati uslove u životnoj sredini, zemljište obrađeno postupkom spikinga može se ostaviti duže vrijeme da „stari‖ , npr. za metale to su tri nedelje na 20 °C (22).

Uzgoj kulture ispitnih organizama

Crve, po mogućnosti, treba držati u trajnoj laboratorijaskoj kulturi. Smjernice o metodama uzgoja laboratorijaskih kultura za Eisenia fetida i Eisenia andrei te za vrstu Enchytraeidae navedene su u Dodatku 5. Crvi koji se koriste u ispitivanju ne smiju imati vidljivih bolesti, abnormalnosti i parazita.

2.2 Sprovođenje ispitivanja

Ispitni organizmi izlažu se ispitivanoj hemikaliji tokom faze apsorpcije. Faza apsorpcije treba trajati 14 dana (enhitreji) ili 21 dan (kišne gliste), osim ako se ne pokaže da je postignuto stabilno stanje.

Za fazu eliminacije crvi se prenose u zemljišto u kojem nema ispitivane hemikalije. Prvi uzorak treba uzeti 4 - 24 h nakon početka faze eliminacije. Primjeri rasporeda uzorkovanja za fazi apsorpcije od 21 dana i fazu eliminacije od 21 dana nalaze se u Dodatku 3.

Ispitni organizmi

Za mnoge vrste kopnenih enhitreja vrlo je mala pojedinačna masa (npr. 5-10 mg mokre mase po jedinci Enchytraeus albidus, a još manje za Enchytraeus crypticus ili Enchytraeus luxuriosus); da bi se provelo mjerenja mase i hemijska analiza, možda će biti neophodno pridružiti i crve iz ispitnih posuda za višestruka određivanja (tj. svi će se crvi iz posuda za višestruka određivanja iskoristiti za dobijanje jednog rezultata analize tkiva). 20 jedinki enhitreja dodaje se u posude za višestruka određivanja, a treba biti najmanje tri posude za višestruka određivanja. Ako je granica analitičke detekcije ispitivane hemikalije visoka, možda će biti potrebno još više crva. Za ispitne vrste veće pojedinačne mase (Eisenia fetida i Eisenia andrei) mogu se koristiti posude za višestruka određivanja koje sadrže samo jednu jedinku.

Kišne gliste koje se koriste u ispitivanju trebale bi biti slične mase (npr. Eisenia fetida i Eisenia andrei trebale bi imati pojedinačnu masu od 250 – 600 mg). Enhitreji (npr.

Enchytraeus albidus) trebaju biti dugački otprilike 1 cm. Svi crvi koji se koriste u određenom ispitivanju trebaju dolaziti iz istog izvora i to trebaju biti odrasle životinje s pojasom žljezdanog epitela (klitelum) (vidjeti Dodatak 5.). Budući da masa i starost životinja mogu uticati na vrijednosti BAF-a (npr. zbog varirajućeg sadržaja lipida i/ili prisustva jajašaca), te

parametre treba točno zabilježiti i u obzir uzeti pri tumačenju rezultata. Osim toga, kokoni se mogu polagati i tokom perioda izlaganja, što će takođe imati utjecaja na vrijednosti BAF-a. Preporučuje se da se poduzorak ispitnih crva izvaže prije ispitivanja kako bi se procijenila srednja vrijednost mokre i suve mase.

Treba koristiti visoki odnos tla i crva da bi se na minimum sveo pad koncentracije ispitivane hemikalije u tlu tokom faze apsorpcije. Za vrste Eisenia fetida i Eisenia andrei preporučuje se minimalna količina od 50 g suve mase (d.w.) tla po crvu, a za enhitreje minimalno 10-20 g d.w. tla po ispitnoj posudi. Posude trebaju sadržavati sloj tla debljine 2-3 cm (enhitreji) ili 4-5 cm (kišne gliste).

Crvi koji se koriste u ispitivanju vade se iz kulture (npr. enhitreji pomoću draguljarske pincete). Odrasle se životinje prenose u neobrađeno ispitno tlo radi aklimatizacije i hrane. Ako se uslovi ispitivanja razlikuju od uslova uzgoja kulture, faza aklimatizacije od 24-72 h trebala bi biti dovoljna da se crvi prilagode uslovima ispitivanja. Nakon aklimatizacije kišne gliste se ispiru prenošenjem u staklene posude (npr. petri zdjelice) koje sadrže čistu vodu te se naknadno važu prije nego što se dodaju ispitnom tlu. Prije vaganja iz crva treba odstraniti višak vode blagim pritiskanjem crva o stijenku posude ili pažljivim tapkanjem crva blago navlaženim papirnatim ručnikom.

Treba posmatrati i bilježiti ponašanje ispitnih organizama pri rovanju. U ispitivanjima s kišnim glistama te životinje (kontrolne i ispitne) obično rovare u tlu u roku od par sati; to treba provjeriti najkasnije 24 h nakon dodavanja crva u ispitne posude. Ako kišne gliste ne rovu u tlu (npr. više od 10 % tokom više od polovice trajanja faze apsorpcije), to je znak da ili uslovi ispitivanja nisu prikladni ili ispitni organizmi nisu zdravi. U takvim bi se slučajevima ispitivanje trebalo prekinuti i ponoviti. Enhitreji uglavnom žive u međuprostornim porama tla pa je moguće da je njihova koža samo djelimično u doticaju sa supstratom koji je okružuje; pretpostavlja se da je jednako izlaganje enhitreja koji rovu i onih koji ne rovu te da izostanak rovanja kod enhitreja ne mora nužno značiti i potrebu za ponavljanjem ispitivanja.

Hranjenje

Hranjenje treba planirati kad se koristi tlo s niskim sadržajem organskog ugljenika. Kad se koristi umjetno tlo, za kišne gliste se preporučuje nedelje brzina hranjenja (tj. crve treba hraniti jedanput nedeljno) od 7 mg suhog gnojiva na g suve mase zemljišta a za enhitreje preporučuje se nedelje brzina od 2-2,5 mg usitnjenih zobenih pahuljica na g suve mase zemljišta. Prva porcija hrane treba se izmiješati s tlom neposredno prije dodavanja ispitnih organizama. Po mogućnosti treba koristiti istu vrstu hrane kao i u uzgoju kultura (vidjeti Dodatak 5.).

Svjetlo i temperature

Ispitivanja treba sprovoditi u kontrolisanom ciklusu svjetla i mraka od 16/8 sati, po mogućnosti 400 do 800 luksa u području ispitnih posuda (3). Ispitna temperatura cijelo vrijeme trajanja ispitivanja treba iznositi 20 ± 2 °C.

Ispitne koncentracije

Koristi se samo jedna koncentracija. Treba obrazložiti situacije u kojima je/su potrebna(-e) dodatna(-e) koncentracija(-e). Ako je toksičnost (ECx) ispitivane hemikalije blizu granice analitičke detekcije, preporučuje se upotreba radioaktivno obilježene ispitivane hemikalije

visoke specifične radioaktivnosti. Za metale bi koncentracija trebala biti viša od nivoa u tkivu i zemljištu.

Višestruka određivanja

Za kinetička mjerenja (fazu apsorpcije i fazu eliminacije) minimalni broj ispitnih posuda višestrukog određivanja treba biti tri po mjestu uzorkovanja. Ukupni broj pripremljenih posuda višestrukog određivanja treba biti dovoljan da obuhvati sva vremena uzorkovanja tokom faze apsorpcije i faze eliminacije. Za biološka posmatranja i mjerenja (npr. odnos suve i mokre mase, sadržaj lipida) te za analizu pozadinskih koncentracija u crvima i u tlu treba osigurati najmanje 12 posuda za višestruko određivanje iz negativne kontrole (četiri se uzorkuju na početku, četiri na kraju apsorpcije i četiri na kraju eliminacije) ako se ne koristi nikakvo drugo rastvarač osim vode. Ako se za primjenu ispitivane hemikalije koristi rastvarajuće sredstvo, paralelno s ispitinim posudama za višestruko određivanje treba sprovoditi i ispitivanje kontrolnih posuda s rastvaračom (četiri posude za višestruko određivanje uzorkuju se na početku, četiri na kraju faze apsorpcije i četiri na kraju faze eliminacije) koje sadrže sve sastojke osim ispitivane hemikalije. U tom slučaju mogu se pripremiti i četiri dodatne posude za višestruko određivanje iz negativne kontrole (bez rastvarača) za fakultativno uzorkovanje na kraju faze apsorpcije. Te posude za višestruko određivanje mogu se biološki usporediti s kontrolama s rastvaračom da bi se dobile informacije o mogućem utjecaju rastvarača na ispitne organizme. Preporučuje se da se pripremi dovoljan broj dodatnih posuda za višestruko određivanje (npr. osam) za ispitne i kontrolnu/kontrolne posude.

<u>Učestalost mjerenja kvaliteta zemljišta</u>

pH zemljišta sadržaj vlage u tlu i temperatura (neprekidno) u ispitnoj prostoriji trebaju se mjeriti na početku i na kraju faze apsorpcije i faze eliminacije. Jedanput nedeljno treba presastojciti sadržaj vlage u tlu vaganjem ispitnih posuda i usporedbom stvarnih masa s početnim masama na početku ispitivanja. Gubitke vode treba kompenzirati dodavanjem deionizirane vode.

Uzorkovanje i analiza crva i zemljišta

Primjer rasporeda faze apsorpcije i faze eliminacije u ispitivanjima bioakumulacije kod kišnih glista i enhitreja naveden je u Dodatku 3.

Zemljište se uzorkuje iz ispitnih posuda za određivanje koncentracije ispitivane hemikalije prije umetanja crva te tokom faze apsorpcije i faze eliminacije. Tokom ispitivanja određuju se koncentracije ispitivane hemikalije u crvima i u zemljištu, mjere se ukupne koncentracije u zemljištu. Kao druga mogućnost, mogu se mjeriti koncentracije i u međuprostornoj vodi; u

takvom slučaju treba navesti obrazloženje i metode prije započinjanja studije te ih treba obuhvatiti u izvještaju.

Crvi i zemljište uzorkuju se najmanje u šest prigoda tokom faze apsorpcije i faze eliminacije. Ako se pokazala stabilnost ispitivane hemikalije, može se smanjiti broj analiza zemljišta. Preporučuje se da se analiziraju najmanje tri posude iz višestrukih određivanja na početku i na kraju faze apsorpcije. Ako koncentracija izmjerena na kraju faze apsorpcije odstupa od

početne koncentracije za više od 30 %, treba analizirati i uzorke zemljišta koji su se uzeli drugih dana.

U svakom trenutku uzorkovanja ukloniti crve iz zemljišta predmetne posude za višestruko određivanje (npr. rasuti zemljište iz posude za višestruko određivanje na platou i izvaditi crve mekanom draguljarskom pincetom), brzo ih isprati vodom u plitkoj staklenoj ili čeličnoj posudi. Ukloniti višak vode. Pažljivo prenijeti crve u prethodno izvaganu posudu, smješta ih izvagati, uključujući i sadržaj crijeva.

Kišne gliste (Eisenia sp.) treba potom pustiti da isprazne crijeva tokom noći, npr. na vlažnom filtarskom papiru u zatvorenoj petri zdjeli. Nakon pražnjenja crijeva treba odrediti masu crva kako bi se procijenio eventualno pad biomase tokom ispitivanja. Vaganje i analiza tkiva enhitreja sprovode se bez pražnjenja crijeva jer je to tehnički teško izvodivo zbog male veličine tih crva. Nakon konačnog određivanja mase crve treba odmah usmrtiti, i to najprikladnijom metodom (npr. pomoću tečnog azota ili njihovim zamrzavanjem na temperaturama ispod -18 °C).

Tokom faze eliminacije crvi zamjenjuju zagađeni sadržaj crijeva čistim zemljištem. To znači da mjerenja crva koji nisu ispraznili crijeva (u ovom kontekstu enhitreja) uzorkovanih neposredno prije faze eliminacije uključuje i zagađeno zemljište iz crijeva. Za vodene oligohete pretpostavlja se da se, nakon početnih 4 – 24 h faza eliminacije, većina zagađenog sadržaja crijeva zamijeni čistim sedimentom. Do sličnih rješenja se došlo i za kišne gliste u studijama akumulacije radioaktivno obilježenih kadmijuma i cinka. U enhitrejima koji nisu ispraznili crijeva koncentracija prvog uzorka faze eliminacije može se uzeti u obzir kao koncentracija u tkivu nakon pražnjenja crijeva. Kako bi se u obzir uzelo i razrjeđivanje koncentracije ispitivane hemikalije u nezagađenom zemljištu tokom faze eliminacije, masa sadržaja crijeva može se procijeniti iz odnosa mokre mase crva/mase praha crva ili iz suve mase crva/mase praha crva. Uzorke zemljišta i crva treba, po mogućnosti, analizirati neposredno nakon njihovog vađenja (tj. u roku od 1-2 dana) kako bi se spriječila razgradnja ili drugi gubici, a preporučuje se i iizračunavanje približnih brzina apsorpcije i eliminacije tokom nastavka ispitivanja. Ako se analiza odgodi, uzorke treba uskladištiti prikladnom metodom, npr. dubokim smrzavanjem (≤ -18 °C).

Provjeriti jesu li za određenu metodu zadovoljavajuće preciznost i mjerna obnovljivost hemijske analize, kao i vraćanje ispitivane hemikalije iz uzoraka zemljišta i crva; treba izvijestiti i o efektivnosti ekstrakcije, granici detekcije (LOD) i granici kvantifikacije (LOQ). Slično tome, treba provjeriti može li se ispitivana hemikalija detektovati u kontrolnim posudama u koncentracijama višima od pozadinske. Kad je koncentracija ispitivane hemikalije u eksperimentalne organizmu Ca > 0 u kontrolnim crvima, to treba uzeti u obzir pri izračunu kinetičkih parametara (vidjeti Dodatak 2.). Sa svim uzorcima treba tokom ispitivanja postupati tako da se na minimum svedu zagađenja i gubici (npr. nastali kao rezultat adsorpcije ispitivane hemikalije na uređaj za uzorkovanje).

Pri radu s radioaktivno obilježenim ispitnim hemikalijama moguće je analizirati i polazne hemikalije i njihove metabolite. Korisne informacije donosi kvantifikacija polazne ispitivane hemikalije i metabolita u stabilnom stanju ili na kraju faze apsorpcije. Potom bi uzorke trebalo „očistiti|| kako bi se polazna ispitivana hemikalija mogla posebno kvantitativno odrediti. Ako pojedinačni metaboliti prelaze 10 % ukupne radioaktivnosti u analiziranom(-im) uzorku(-cima), preporučuje se identifikacija tih metabolita. Treba zabilježiti i u Izvještaj uključiti i ukupni oporavak te oporavak ispitivane hemikalije u crvima, zemljištu i ako se

koriste, u zamkama koje sadrže apsorbente radi zadržavanja isparene ispitivane hemikalije. Spajanje jedinki uzorkovanih iz određene ispitne posude prihvatljivo je za crve enhitreja koji su manji od kišnih glista. Ako spajanje obuhvata smanjenje broja posuda za višestruko određivanje, to ograničava statistički postupak koji se može primijeniti na podatke. Ako se traže specifični statistički postupak i snaga, u ispitivanje treba uključiti odgovarajući broj posuda za višekratno određivanje kako bi se omogućilo željeno spajanje, postupak i snaga.

Preporučuje se da se BAF izražava i kao funkcija ukupne suve mase i, kad je to potrebno (tj. za jako hidrofobne hemikalije), kao funkcija sadržaja lipida. Treba koristiti prikladne metode za određivanje sadržaja lipida (neke postojeće metode, treba prilagoditi u tu svrhu). U tim se metodama koristi tehnika ekstrakcije hlorofora/metanola. Međutiim, radi izbjegavanja upotrebe hloriranih rastvarača, treba koristiti izmijenjenu metodu Bligha i Dyera. Budući da razne metode možda neće dati identične vrijednosti, vrlo je važno navesti pojedinosti korištene metode. Kad je to moguće, tj. ako postoji dovoljno tkiva crva, analizu lipida treba, po mogućnosti, sprovoditi na istom uzorku ili ekstraktu kao i u analizi ispitivane hemikalije jer se lipidi često moraju ukloniti iz ekstrakta prije nego što se on može hromatografski analizirati. Druga je mogućnost da se upotrijebe kontrolne životinje za mjerenje sadržaja lipida, što se potom može iskoristiti za normalizaciju vrijednosti BAF-a. Tim se poslednjim pristupom umanjuje zagaĐenost opreme ispitivanom hemikalijom.

Podaci i izvještavanja

3.1 Obrada rezultata

Kriva apsorpcije ispitivane hemikalije dobija se grafičkim prikazom koncentracije u/na crvima tokom faze apsorpcije u zavisnosti od vremena na aritmetičkoj ljestvici. Kada kriva dostigne plato ili stabilno stanje (vidjeti definicije u Dodatku 1.), faktor bioakumulacije stabilnog stanja BAFss iizračunava se iz:

(C_a u stabilnom stanju ili na kraju faze apsorpcije (srednja vrijednost))/(C_s stabilnom stanju ili na kraju faze apsorpcije (srednja vrijednost))

Ca je koncentracija ispitivane hemikalije u eksperimentalnom organizmu

Cs je koncentracija ispitivane hemikalije u zemljištu

Ako se ne postigne stabilno stanje, umjesto BAFss treba odrediti BAFK, na osnovu konstanti brzine, i to na sljedeći način:

- Odrediti faktor akumulacije (BAFK) kao odnos ks/ke.
- Brzina apsorpcije i brzina eliminacije se, po mogućnosti, iizračunavaju istovremeno;
- Konstanta brzine eliminacije (ke) obično se određuje iz krive eliminacije (tj. grafičkog prikaza koncentracije ispitivane supstance u crvima tokom faze eliminacije).

  Konstanta brzine apsorpcije ks iizračunava se na osnovu vrijednosti ke i Ca koje se dobiju iz krive apsorpcije – za opis tih metoda vidjeti Dodatak 2. Za dobijanje BAFK i konstanti brzine, ks, i ke, prednost se daje metodama upotrebe procjene nelinearnih parametara na kompjuteru. Ako eliminacija nije prvog reda, treba primijeniti kompleksnije modele.

Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju treba obuhvatati sljedeće podatke:

Ispitivana hemikalija:

- svi dostupni podaci o akutnoj ili dugotrajnoj toksičnosti (npr. ECx, LCx|| NOEC) ispitivane hemikalije na oligohete iz zemljišta;
- čistoća, fizičko-hemijska svojstva, npr. log Kow, rastvorljivost u vodi;
- podaci za identifikaciju hemikalije, izvor ispitivane supstance, identitet i koncentracija upotrijebljenog rastvarača;
- ako se koristi radioaktivno obilježena ispitivana hemikalija, precizan položaj obilježenih atoma, specifična radioaktivnost i radioaktivno hemijska čistoća.

Ispitne vrste:

- naučni naziv, soj, izvor, sve vrste prethodne obrade, aklimatizacija, starost, red veličina itd.

Uslovi ispitivanja:

- primijenjeni postupak ispitivanja;
- vrsta i svojstva korištene rasvjete i fotoperiod/fotoperiodi;
- plan ispitivanja npr. broj i veličina ispitnih posuda, masa zemljišta i visina sloja zemljišta broj posuda za višestruko određivanje, broj crva u svakoj posudi za višestruko određivanje, broj ispitnih koncentracija, trajanje faze apsorpcije i faze eliminacije, učestalost uzorkovanja);
- obrazloženje izbora materijala ispitne posude;
- metoda pripreme i primjene ispitivane supstance, kao i obrazloženje izbora specifične metode;
- ispitne koncentracije, srednje vrijednosti izmjerenih vrijednosti i njihove standardne devijacije u ispitnim posudama te metoda kojom su dobijene te vrijednosti;
- izvor sastojaka dodatnog zemljišta ili – ako se koriste prirodni medijumumi – porijeklo zemljišta opis svake prethodne obrade, rezultati iz kontrola (preživljavanje, razvoj biomase, razmnožavanje), svojstva zemljišta (pH, sadržaj ukupnog organskog ugljenika, raspodjela veličine čestica (postotak pijeska, praha i gline), WHCmax, postotak sadržaja vode na početku i na kraju ispitivanja i sva ostala sprovedena mjerenja);
- detaljni podaci o obradi uzoraka zemljišta i crva, uključujući i pojedinosti o pripremi, skladištenju, pokolonama spikinga, ekstrakciji i analitičkim pokolonama (i preciznosti) za ispitivanu supstancu u crvima i u zemljištu, te sadržaj lipida (ako je izmjeren) i oporavak ispitivane supstance.

Rezultati:

- smrtnost crva iz kontrola i crva u svakoj ispitnoj posudi te svako zapaženo neuobičajeno ponašanje (npr. izbjegavanje zemljišta nedostatak razmnožavanja u ispitivanjima bioakumulacije s enhitrejima);
- odnos suve mase i mokre mase zemljišta i eksperimentalnih organizama (korisno za normalizaciju);
- mokra masa crva u svakom trenutku uzorkovanja; za kišne gliste mokra masa na početku ispitivanja i u svakom trenutku uzorkovanja prije i poslije pražnjenja crijeva;
- sadržaj lipida eksperimentalnih organzama (ako je određen);

- krive koje pokazuju kinetiku apsorpcije i eliminacije ispitivane hemikalije u crva i vrijeme do stabilnog stanja;
- Ca i Cs (sa standardnom devijacijom i rasponom, ako je to primjereno) za sve trenutke uzorkovanja (Ca izraženo u g kg–1 mokre i suve mase cijelog tijela, Cs izražen u g kg–1 mokre i suve mase tla). Ako se traži i faktor bioakumulacije biota zemljišta (BSAF) (npr. radi uporeĐivanja rezultata dvaju ili većeg broja ispitivanja sprovedenih sa životinjama različitog sadržaja lipida), dodatno se može izraziti Ca kao g kg–1 sadržaja lipida u organizmu, a Cs se može izraziti kao g kg–1 organskog ugljenika (OC) u zemljištu;
- BAF (izražen u kg tla·kg–1 crva), konstanta brzine apsorpcije zemljišta ks (izražena u g zemljišta kg–1 crva na dan–1) i konstanta brzine eliminacije ke (izražena u dana–1); BSAF (izražen u kg zemljišta OC kg–1 sadržaja lipida u crvima) može se prijaviti naknadno;
- ako su mjereni: postoci polazne hemikalije, metaboliti i vezani ostaci (tj. postotak ispitivane hemikalije koja se ne može ekstrahujeti uobičajenim metodama ekstrakcije) detektovani u zemljištu i eksperimentalnim životinjama; - metode korištene za statističke analize podataka.

Vrednovanje rezultata:

- skladnost rezultata s validacionim kriterijumima;
- neočekivani ili neobični rezultati, npr. nepotpuna eliminacija ispitivane hemikalije iz eksperimentalnim životinja.

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Bioakumulacija je porast koncentracije ispitivane hemikalije u ili na organizmu u odnosu na koncentraciju ispitivane hemikalije u medijumumu koji je okružuje. Bioakumulacija nastaje i iz procesa biokoncentracije i iz procesa biomagnifikacije.

Biokoncentracija je porast koncentracije ispitivane hemikalije u ili na organizmu, koja nastaje kao rezultat apsorpcije hemikalije isključivo iz medijumuma koji je okružuje (tj. putem tjelesne površine i konzumiranog zemljišta), u odnosu na koncentraciju ispitivane hemikalije u medijumumu koji je okružuje.

Biomagnifikacija je porast koncentracije ispitivane hemikalije u ili na organizmu, koja nastaje uglavnom kao rezultat apsorpcije iz zagaĐene hrane ili plijena, u odnosu na koncentraciju ispitivane hemikalije u hrani ili plijenu. Biomagnifikacija može dovesti do prenosa akumulacije ispitivane supstance unutar mreža hrane.

Eliminacija ispitivane hemikalije je gubitak te hemikalije iz tkiva eksperimentalnog organizma aktivnim ili pasivnim procesima koji se odvijaju nezavisno o prisustvu ili odsustvu ispitivane supstance u medijumumu koji je okružuje.

Faktor bioakumulacije (BAF) u bilo kojem trenutku tokom faze apsorpcije ovog ispitivanja bioakumulacije je koncentracija ispitivane hemikalije u/na eksperimentalnom organizmu (Ca u g·kg-1 suve mase crva) podijeljena s koncentracijom te hemikalije u medijumumu koji je okružuje (Cs kao g·kg-1 suve mase tla); jedinica za BAF je kg tla·kg-1 crva.

Faktor bioakumulacije stabilnog stanja (BAFss) je BAF u stabilnom stanju i ne mijenja se značajno tokom dužeg perioda, a koncentracija ispitivane hemikalije u medijumumu koji je okružuje (Cs kao g.kg-1 suve mase zemljita) konstantna je tokom tog perioda.

Faktori bioakumulacije izračunati direktno iz odnosa konstante brzine apsorpcije zemljišta i konstante brzine eliminacije zemljišta i ke, vidjeti u nastavku teksta) nazivaju se faktorom kinetičke bioakumulacije (BAFK).

Faktor akumulacije biota zemljišta (BSAF) je koncentracija ispitivane hemikalije u/na eksperimentalnom organizmu, normalizovana lipidima, podijeljena s koncentracijom ispitivane hemikalije u zemljištu, normalizovanom organskim ugljenikom, u stabilnom stanju. Tada se Ca izražava kao g·kg-1 sadržaja lipida organizma, a Cs kao g·kg-1 sadržaja organskog ugljenika zemljišta; jedinica za BSAF je kg OC·kg-1 lipida.

Plato ili stabilno stanje definiše se kao uravnoteženje između procesa apsorpcije i eliminacije koji se odvijaju istovremeno tokom faze izlaganja. Stabilno se stanje postiže na grafičkom prikazu BAF-a u zavisnosti od vremena kada kriva postane paralelna s vremenskom osi i kad se rezultati tri uzastopne analize BAF-a sprovedene na uzorcima koji se uzimaju u razmacima od najmanje dva dana nalaze unutar 20 % jedni od drugih te kad ne postoje statistički značajne razlike meĐu trima razdobljima uzorkovanja. Za ispitivane hemikalije koje se sporo apsorbuju prikladniji bi vremenski razmak bio sedam dana.

Podioni koeficijent organski ugljenik-voda (Koc) je odnos koncentracije hemikalije u/na dijelu zemljišta s organskim ugljenikom i koncentracije hemikalije u vodi u ravnoteži.

Podioni koeficijent oktanol-voda (Kow) je odnos rastvorljivosti hemikalije u n-oktanolu i vodi u ravnoteži, ponekad se izražava i kao Pow. Logaritam Kow (log Kow) koristi se kao znak bioakumulacionog potencijala hemikalije kod vodenih organizama.

Faza apsorpcije ili izlaganja je vrijeme tokom kojeg su eksperimentalni organizmi izloženi ispitivanoj hemikaliji.

Konstanta brzine apsorpcije zemljišta (ks) je brojčana vrijednost koja definiše brzinu porasta koncentracije ispitivane supstance u/na eksperimentalnom organizmu, a koja nastaje kao rezultat apsorpcije iz faze zemljišta. ks se izražava kao g zemljišta kg-1 crva d-1.

Faza eliminacije je vrijeme, nakon prenosa eksperimentalnih organizama iz zagaĐenog medijumuma u medijumum bez ispitivane supstance, tokom kojeg se proučava eliminacija (ili neto gubitak) hemikalije iz eksperimentalnih organizama.

Konstanta brzine eliminacije (ke) je brojčana vrijednost koja definiše brzinu rastvaranja koncentracije ispitivane supstance u/na eksperimentalnim organizmima, nakon prenosa eksperimentalnih organizama iz medijumumuma koji sadržava ispitivanu supstancu u medijumum bez te hemikalije; ke se izražava u d-1.

Dodatak 2.

Izračunavanje parametara apsorpcije i eliminacije

Osnovni konačni efekat ispitivanja bioakumulacije je faktor bioakumulacije, BAF. Izmjereni BAF može se izračunati dijeljenjem koncentracije u eksperimentalnom organizmu, Ca, a koncentracijom u zemljištu, Cs, u stabilnom stanju. Ako se stabilno stanje ne postigne tokom

faze apsorpcije, BAFK se, umjesto BAFss, iizračunava iz konstanti brzine. Međutiim, ipak treba vidjeti bazira li se BAF na koncentracijama u stabilnom stanju ili ne.

Najčešći način dobijanja faktora kinetičke bioakumulacije (BAFK), konstante brzine apsorpcije tla (ks) i konstante brzine eliminacije (ke) jeste upotreba metoda procjene nelinearnih parametara. Kad je zadat niz podataka o koncentracijama u sekvencijalnim vremenima i modeli jednačina:

C_a=k_s/k_e ×C_s (1-e^(-k) e^t) ili

C_a=k_s/k_e ×C_s (e^(-k) e^((t-t_c))-e^(-k) e^t) gdje je

Ca=koncentracija hemikalije u crvima [g kg-1 mokre ili suve mase] ks=konstanta brzine apsorpcije u tkivu [g tla kg-1 crva d-1]
Cs=koncentracija hemikalije u zemljištu [g kg-1 mokre ili suve mase] ke=konstanta brzine eliminacije [d-1] tc=vrijeme na kraju faze apsorpcije, ti kompjuterski programi iizračunavaju vrijednosti BAFK, ks i ke.

Kad se pozadinska koncentracija u neizloženim crvima, npr. na dan 0, značajno razlikuje od nule (to može biti slučaj, npr. za metale), pozadinsku koncentraciju (Ca,0) treba obuhvatiti jednačinama:

C_a=*C_(a,0)+k_s/k_e ×C_s (1-e^(-k) e^t) i*

C_a=C_(a,0)+k_s/k_e ×C_s (e^(-k) e^((t-t_c))-e^(-k) e^t)

U slučajevima kad se primjeti značajan pad koncentracije ispitivane hemikalije u zemljištu tokom perioda trajanja faze apsorpcije, mogu se primijeniti sljedeće: *C_s=C_0 (e^(-k_o t))*

gdje je
Cs= koncentracija hemikalije u zemljišt [g kg-1 mokre ili suve mase] k0= konstanta brzine razgradnje u zemljištu [d-1]
C0= početna koncentracija hemikalije u zemljištu [g kg-1 mokre ili suve mase].

C_a=k_s/(k_e-k_0)×(e^(-k_0 t)-e^(-k) e^t)

C_a=k_s/(k_e-k_0)×e^(-k_0 t)- e^(-k) e^tc e^(-k(t-tc))

gdje je
Ca= koncentracija hemikalije u crvima [g kg-1 mokre ili suve mase],

ks= konstanta brzine apsorpcije u tkivu [g tla kg-1 crva d-1]

k0= konstanta brzine razgradnje u zemljištu [d-1]

ke= konstanta brzine eliminacije [d-1]

tc= vrijeme na kraju faze apsorpcije.

Kad se tokom faze apsorpcije postigne stabilno stanje (tj. t = ∞), *C_a=k_s/k_e ×C_s (1-e^(-k) e^t)* može se skratiti na: *C_a=k_s/k_e ×C_s*

ili

C_a/C_s =k_s/k_e =BAF_K

Tada je ks/ke x Cs pristup koncentraciji ispitivane supstance u tkivu crva u stabilnom stanju (Ca,ss). Faktor akumulacije biota tla (BSAF) može se izračunati na sljedeći način: *BSAF=BAF_K f_oc/f_lip*

gdje je foc udio organskog ugljenika u zemljištu, a flip udio lipida u crvu, a obje te vrijednosti, po mogućnosti, se određuju na uzorcima uzetim iz ispitivanja, a baziraju se jedna na suvoj masi, a druga na mokroj masi.

Ako podaci na grafičkom prikazu u zavisnosti od vremena ukazuju na konstantni eksponencijalni pad koncentracije ispitivane supstance u životinjama:

C_a (t)=C_(a,ss)×e^(-k) e^t

Ponekad se čini da su procesi eliminacije dvofazni i da u njima dolazi do rapidnog pada Ca tokom početnih faza, a to se pretvara u sporiji gubitak ispitivanih supstance u kasnijim fazama eliminacije. Te se dvije faze mogu protumačiti pretpostavkom da u organizmu postoje dva odjela iz kojih se gubi ispitivana hemikalija, i to različitom brzinom. U tim bi slučajevima trebalo proučiti specifičnu literaturu.

Putem gore navedenog modela jednačine mogu se u istom ispitivanju izračunati i kinetički parametri (ks i ke) primjenom kinetičkog modela prvog reda istovremeno na sve podatke, kako iz faze apsorpcije tako i iz faze eliminacije. Za opis metode koja bi omogućila takav kombinovano iizračunavanje konstanti brzine apsorpcije i eliminacije mogu se konzultirati reference.

C_a=K_s/K_e C_s (1-e^(-k_e t))×(m=1)+[K_s/k_e ×C_s (e^(-K_e (t-t_c))-e^(-K_e t))×(m=2)]

Kad se istovremeno procjenjuju parametri apsorpcije i eliminacije iz kombinovanih podataka o apsorpciji i eliminaciji, „m‖ je deskriptor koji kompjuterskom programu omogućava da dodijeli podpojmove jednačine nizovima podataka iz odgovarajuće faze te da se vrednovanje propisno sprovede (m = 1 za fazu apsorpcije; m = 2 za fazu eliminacije).

Ove modele jednačina treba koristiti s oprezom, kada tokom ispitivanja doĐe do promjena biorapoloživosti ili (bio)razgradnje ispitivane hemikalije.

Dodatak 3.

PRIMJERI PLANOVA ISPITIVANJA BIOAKUMULACIJE TLA

Ispitivanje s kišnim glistama

Faza apsorpcije s osam datuma uzorkovanja korištenih za iizračunavanje kinetike

Dan	Djelatnost
– 6	Kondicioniranje pripremljenog zemljišta 48 h;
– 4	Obrada dijela zemljišta spikingom s rastvorom ispitivane hemikalije; isparavanje eventualnih rastvarača; miješanje sastojaka zemljišta; raspodjela zemljišta u ispitne posude; uravnoteženje u uslovima ispitivanja četiri dana (tri nedelje za zemljište obrađeno spikingom s metalima);
– 3 do – 1	Vađenje eksperimentalnih organizama iz uzgojene kulture radi aklimatizacije; priprema i vlaženje sastojaka zemljišta
0	Mjerenje temperature i pH zemljišta; vađenje uzoraka zemljišta iz ispitnih posuda i kontrola sa rastvorom radi određivanja koncentracije ispitivane hemikalije; dodavanje porcije hrane; vaganje i nasumično raspoređivanje crva u ispitne posude; zadržavanje dovoljnog broja poduzoraka crva za određivanje analitičkih pozadinskih vrijednosti, mokre i suve mase te sadržaja lipida; vaganje svih ispitnih posuda radi kontrole vlažnosti zemljišta; kontrola dovoda vazduha ako se koristi zatvoreni sistem ispitivanja;
1	Kontrola dovoda vazduha, bilježenje ponašanja crva i temperature; uzimanje uzoraka zemljišta i crva za određivanje koncentracije ispitivane supstance;
2	Isto kao i 1. dan;
3	Kontrola dovoda vazduha, ponašanja crva i temperature;
4	Isto kao i 1. dan;
5 - 6	Isto kao i 3. dan;
7	Isto kao i 1. dan; dodavanje porcije hrane; kontrola vlažnosti zemljišta ponovnim vaganjem ispitnih posuda i nadomještanje isparene vode;
8 - 9	Isto kao i 3. dan;
10	Isto kao i 1. dan;
11 - 13	Isto kao i 3. dan;
14	Isto kao i 1. dan; dodavanje porcije hrane; kontrola vlažnosti zemljišta ponovnim vaganjem ispitnih posuda i nadomještanje isparene vode;
15 - 16	Isto kao i 3. dan;
17	Isto kao i 1. dan;

18 - 20	Isto kao i 3. dan;
21	Isto kao i 1. dan; mjerenje temperature i pH zemljišta; kontrola vlažnosti zemljišta ponovnim vaganjem ispitnih posuda; kraj faze apsorpcije; prienos crva iz preostalih izloženih posuda za višestruko određivanje u posude koje sadrže čisto zemljište za fazu eliminacije (bez pražnjenja crijeva); uzorkovanje zemljišta i crva iz kontrola s rastvorima.
	Djelatnosti prethodnog izlaganja (fazu uravnotežavanja) treba planirati uzimajući u obzir svojstva ispitivane hemikalije.
	Djelatnosti opisane za 3. dan treba sprovoditi svakodnevno (barem za radnih dana).

(b) Faza eliminacije

Dan	Djelatnost
– 6	Priprema i vlaženje sastojaka zemljišta; kondicioniranje pripremljenog zemljišta 48 h;
– 4	Miješanje sastojaka zemljišta; podjela na ispitne posude; inkubacija u uslovima ispitivanja 4 dana;
0 (kraj faze apsorpcije)	Mjerenje temperature i pH zemljišta; vaganje i nasumična raspodjela crva na ispitne posude; dodavanje porcije hrane; prenos crva iz preostalih izloženih posuda za višestruko određivanje u posude koje sadrže čisto zemljište; uzimanje uzoraka zemljišta i crva nakon 4 - 6 dana za određivanje koncentracije ispitivane hemikalije;
1	Kontrola dovoda vazduha, bilježenje ponašanja crva i temperature; uzimanje uzoraka zemljišta i crva za određivanje koncentracije ispitivane hemikalije;
2	Isto kao i 1. dan;
3	Kontrola dovoda vazduha, ponašanja crva i temperature;
4	Isto kao i 1. dan;
5 - 6	Isto kao i 3. dan;
7	Isto kao i 1. dan; dodavanje porcije hrane; kontrola vlažnosti tla ponovnim vaganjem ispitnih posuda i nadomještanje isparene vode;
8 - 9	Isto kao i 3. dan;
10	Isto kao i 1. dan;

11 - 13	Isto kao i 3. dan;
14	Isto kao i 1. dan; dodavanje porcije hrane; kontrola vlažnosti zemljišta ponovnim vaganjem ispitnih posuda i nadomještanje isparene vode;
15 - 16	Isto kao i 3. dan;
17	Isto kao i 1. dan;
18 - 20	Isto kao i 3. dan;
21	Isto kao i 1. dan; mjerenje temperature i pH zemljišta; kontrola vlažnosti zemljišta ponovnim vaganjem ispitnih posuda; uzorkovanje zemljišta i crva iz kontrola sa rastvaračima.
	Pripremu zemljišta prije početka faze eliminacije treba obaviti na isti način kao i prije faze apsorpcije.
	Djelatnosti opisane za 3. dan treba sprovoditi svakodnevno (barem za radnih dana).

Ispitivanje s enhitrejima

a) Faza apsorpcije s osam datuma uzorkovanja korištenih za iizračunavanje kinetike

Dan	**Djelatnost**
– 6	Priprema i vlaženje sastojaka zemljišta; kondicioniranje pripremljenog zemljišta 48 h;
– 4	Miješanje sastojaka zemljišta; podjela na ispitne posude; inkubacija u uslovima ispitivanja 4 dana;
0 (kraj faze apsorpcije)	Mjerenje temperature i pH zemljišta; vaganje i nasumična raspodjela crva na ispitne posude; dodavanje porcije hrane; prenos crva iz preostalih izloženih posuda za višestruko određivanje u posude koje sadrže čisto zemljište; uzimanje uzoraka zemljišta i crva nakon 4 - 6 dana za određivanje koncentracije ispitivane hemikalije;
1	Kontrola dovoda vazduha, bilježenje ponašanja crva i temperature; uzimanje uzoraka zemljišta i crva za određivanje koncentracije ispitivane hemikalije;
2	Isto kao i 1. dan;
3	Kontrola dovoda vazduha, ponašanja crva i temperature;
4	Isto kao i 1. dan;

5 - 6	Isto kao i 3. dan;
7	Isto kao i 1. dan; dodavanje porcije hrane; kontrola vlažnosti tla ponovnim vaganjem ispitnih posuda i nadomještanje isparene vode;
8 - 9	Isto kao i 3. dan;
10	Isto kao i 1. dan;
11 - 13	Isto kao i 3. dan;
14	Isto kao i 1. dan; dodavanje porcije hrane; kontrola vlažnosti zemljišta ponovnim vaganjem ispitnih posuda i nadomještanje isparene vode;
15 - 16	Isto kao i 3. dan;
17	Isto kao i 1. dan;
18 - 20	Isto kao i 3. dan;
21	Isto kao i 1. dan; mjerenje temperature i pH zemljišta; kontrola vlažnosti zemljišta ponovnim vaganjem ispitnih posuda; uzorkovanje zemljišta i crva iz kontrola sa rastvaračima.
	Pripremu zemljišta prije početka faze eliminacije treba obaviti na isti način kao i prije faze apsorpcije.
	Djelatnosti opisane za 3. dan treba sprovoditi svakodnevno (barem za radnih dana).

Dodatak 4.

Dodato zemljište – preporuke za pripremu i skladištenje

Budući da je moguće da tokom cijele godine neće biti dostupna zemljišta iz određenog izvora, a da priroÐeni organizmi kao i prisustvo mikrozagaÐivača mogu uticati na ispitivanje, za upotrebu u ovom ispitivanju preporučuje se dodati supstrat, dodato zemljište prema poglavlju C.8 ovog Priloga, Toksičnost za kišne gliste. U tom zemljištu može preživjeti, narasti i razmnožavati se nekoliko eksperimentalnih vrsta, a omogućeni su i maksimalna standardizacija, kao i intra- i interlaboratorijaska porrÐrnjr uslova ispitivanja i uzgoja.

Sastojci zemljišta

Treset:	10 %	Sphagnum treset, u skladu sa Smjernicom OECD-a 207 (48),
Kvarc:	70 %	Industrijski kvarc (sušen na vazduhu); veličina zrna: više od 50 % čestica treba biti u rasponu od 50-200 µm, ali sve čestice trebaju biti ≤ 2 mm,

Kaolinitska glina:	20 %	Sadržaj kaolinita ≥ 30 %,
Kalcijum karbonat:	≤ 1 %	$CaCO_3$, u prahu, hemijski čist.

Kao druga mogućnost, može se smanjiti sadržaj organskog ugljenika u dodatom zemljištu, npr. smanjenjem sadržaja treseta na 4-5 % suvog zemljišta i povećanjem sadržaja pijeska. Takvim smanjenjem sadržaja organskog ugljenika može se smanjiti mogućnost adsorpcije ispitivane hemikalije u tzemljište (organski ugljenik), a može se povećati dostupnost ispitivane hemikalije crvima. Pokazalo se da vrste Enchytraeus albidus i Eisenia fetida ispunjavaju validacione kriterijume o razmnožavanju kada se ispituju u zemljištima nižeg sadržaja organskog ugljenika, npr. 2,7 % (33), (201), a iskustvo pokazuje da se to može postići i s dodatim zemljištem s 5 % treseta.

Priprema

Suvi sastojci zemljišta temeljno se izmiješaju (npr. u velikoj laboratorijaskoj miješalici). To treba učiniti otprilike nedelju dana prije početka ispitivanja. Izmiješane suve sastojkezemljišta treba navlažiti dejonizovanom vodom najmanje 48 h prije primjene ispitivane supstance kako bi se uravnotežila/stabilizovala kiselost. Za određivanje pH koristi se smješa zemljišta i rastvora 1 M KCl u odnosu 1:5. Ako se pH vrijednost ne kreće unutar raspona (6,0 ± 0,5), zemljištu se dodaje dovoljna količina CaCO3 ili se pripremi nova šarža zemljišta.

Maksimalni vodni kapacitet (WHC) dodatog zemmljišta određuje se prema MEST ISO 11268-2. Najmanje dva dana prije početka ispitivanja vlaži se suvo dodato zemljište dodavanjem dovoljno dejonizovane ili obrađene vode da bi se dobilo otprilike pola konačnog sadržaja vode. Konačni sadržaj vode treba iznositi 40 % do 60 % maksimalnog WHC-a. Na početku ispitivanja prethodno navlaženo zemljište dijeli se u onoliko šarži koliko ima ispitnih koncentracija i kontrola koje se koriste za ispitivanje, a sadržaj vlage se podešava na od 40 - 60 % WHCmax pomoću rastvora ispitivane supstance i/ili dodavanjem dejonizovane ili obrađene vode. Sadržaj vlage određuje se na početku i na kraju ispitivanja (na 105 °C). On bi trebao biti optimalan za zahtjeve vrsta (sadržaj vlage može se provjeriti i na sljedeći način: kad se zemljište blago zgnječi rukom, među prstima bi se trebale pojaviti sitne kapljice).

Skladištenje

Suvi sastojci dodatog zemljišta mogu se skladištiti na sobnoj temperaturi do upotrebe.
Pripremljeno, prethodno navlaženo zemljište može se skladištiti na hladnom mjestu do tri dana prije spikinga; treba se pobrinuti da se isparavanje vode svede na minimum. Zemljište obrađeno spikingom s ispitivanom supstance treba se iskoristiti odmah, osim ako ne postoje podaci koji naznačavaju da bi se to određeno zemljište moglo skladištiti, a da to nema uticaja na toksičnost i biorapoloživost ispitivane supstance. Onda se uzorci spikingom obrađenog zemljišta mogu skladištiti do analize u uslovima preporučenima za određenu ispitivanu supstancu.

Dodatak 5.

Vrste kopnenih oligoheta preporučene za ispitivanje bioakumulacije iz zemljišta

Kišne gliste

Preporučuje se eksperimentalna vrsta Eisenia fetida (Savigny 1826), koja pripada porodici Lumbricidae. Od 1972. godine ona se dijeli na dvije podvrste (Eisenia fetida i Eisenia andrei). Po Jaenikeu to su prave,posebne vrste. Eisenia fetida lako se raspoznaje po svojim svijetlim žutim trakama između članaka, dok je Eisenia andrei jednoobrazne, tamno-crvene boje. Obje vrste porijeklo vuku iz područja Crnog mora, ali su danas raširene po cijelom svijetu, u antropogenski izmijenjenim staništima, poput gomila komposta. Obje se mogu koristiti i za ispitivanja ekotoksičnosti i za ispitivanja bioakumulacije.

Eisenia fetida i Eisenia andrei dostupne su i u trgovinama, npr. kao mamac za ribe. U poreÐenju s ostalim kišnim glistama iz porodici Lumbricidae te dvije vrste imaju kratak životni ciklus, a zrelost postižu u roku od 2-3 mjeseca (na sobnoj temperaturi). Njihova optimalna temperatura iznosi otprilike 20 – 24 °C. Prednost daju relativno vlažnim supstratima čija je pH gotovo neutralna i koji imaju visok sadržaj organskih supstance. Budući da se te vrste naširoko koriste u standardiziranim ispitivanjima ekotoksičnosti već 25 godina, njihov uzgoj ima dugu tradiciju.

Obje se vrste mogu uzgajati u širokom rasponu životinjskog otpada. pH vrijednost medijumumuma treba biti oko 6 do 7 (reguliše se kalcijumim karbonatom), treba imati nisku jonsku provodlljivost (manje od 6 mS/cm ili manje od 0,5 % koncentracije soli) i ne smije biti zagaÐen amonijakom ili životinjskim urinom. Isto tako, mogu se koristiti zemljište za vrtove iz trgovina koje ne sadržava aditive ili dodato zemljište prema OECD-u ili njihova mješavina u odnosu 50:50. Supstrat bi trebao biti vlažan, ali ne previše mokar. Prikladne su kutije za uzgoj volumena od 10 do 50 litara.

Da bi se dobili crvi standardne starosti i mase, najbolje je uzgoj započeti s kokonima. Dakle, odrasli se crvi dodaju u kutiju za uzgoj koja sadržava svježi supstrat kako bi nastali kokoni. Praktično iskustvo pokazuje da gustina naseljenosti od otprilike 100 odraslih crva na kg supstrata (mokre mase) vodi do dobrih brzina razmnožavanja. Nakon 28 dana odrasli se crvi vade. Kišne gliste koje se izlegu iz kokona koriste se za ispitivanje kad sazriju nakon najmanje dva mjeseca, ali kraće od 12 mjeseci.

Može se smatrati da su crvi gore opisanih vrsta zdravi ako se kreću kroz supstrat, ne pokušavaju izaći iz supstrata i ako se neprekidno razmnožavaju. Sporo kretanje ili zadnji dio žute boje (u slučaju Eisenia fetida) znak su iscrpljenosti supstrata. U tom se slučaju preporučuju svježi supstrat i/ili manji broj životinja po kutiji.

Enhitreji

Preporučena eksperimentalna vrsta je Enchytraeus albidus Henle 1837 (bijeli crvi). Enchytraeus albidus jedna je od najvećih (do 15 mm) vrsta oligoheta iz porodici Enchytraeidae. Enchytraeus albidus može se naći u morskim, limničkim i kopnenim staništima, uglavnom u organskoj supstanci u raspadu (morska trava, kompost), a rijetko na livadama. Ta velika ekološka tolerancija i neke morfološke varijacije znak su da je moguće da postoji više podvrsta ove vrste.

Enchytraeus albidus dostupna je u trgovinama, gdje se prodaje kao hrana za ribe. Treba provjeriti je li kultura zagaÐena drugom, obično manjom vrstom. Ako doÐe do zagaÐenja, sve crve treba oprati vodom u petri zdjelici. Potom se veliki primjeri vrste Enchytraeus albidus biraju (stereomikroskopom) za početak nove kulture. Svi se ostali crvi bacaju. Oni imaju kratak životni ciklus kako se zrelost postiže već od 33. dana (na 18 °C) i 74. dana (na 12 °C). Za ispitivanje treba koristiti samo kulture koje su najmanje 5nedelja (jedan naraštaj) držane u laboratorijai bez problema.

Prikladne su i druge vrste iz roda Enchytraeus, Enchytraeus luxuriosus. Ako se koriste druge vrste Enchytraeus, treba ih jasno identifikovati i u izvještaju treba navesti obrazloženje za izbor te vrste.

Enchytraeus crypticus (Westheide & Graefe 1992) je vrsta koja spada u istu grupu kao i Enchytraeus luxuriosus. Nije dokazano da ona sa sigurnošću nastanjuje polja, samo je opisana za uzgoj kulture crva i gomile komposta (Römbke 2003). Stoga nisu poznati njeni izvorni ekološki zahtjevi. Međutiim, skorašnje laboratorijaske studije različitih zemljišta iz polja potvrdile su da ova vrsta ima veliku toleranciju na svojstva zemljišta poput pH i teksture (Jänsch i sur. 2005). U novije se vrijeme upravo ta vrsta često koristila u studijama ekotoksičnosti, i to radi jednostavnosti njenog uzgoja i ispitivanja, npr. Kuperman i sur. 2003). Međutiim, ona je malena (3 – 12 mm; u prosjeku 7 mm (Westheide & Müller 1996), a zbog toga je rukovanje njome znatno teže u poreĐenju s Enchytraeus albidus. Kad se koristi neka druga vrsta umjesto Enchytraeus albidus, ispitna posuda može, ali i ne mora biti manja. Osim toga, treba uzeti u obzir i to da se ova vrsta rapidno razmnožava, a naraštaji se smjenjuju brže od svakih 20 dana na 20 ± 2 °C (Achazi i sur. 1999), a na višim temperaturama čak i brže.

Enhitreji iz vrste Enchytraeus albidus (kao i iz ostalih vrsta Enchytraeus) mogu se uzgajati velikim plastičnim kutijama (npr. 30 × 60 × 10 cm ili 20 × 12 × 8 cm, što je prikladno za uzgoj crva male veličine) napunjenima mješavinom dodatog zemljišta i nezagađenog vrtnog zemljišta bez aditiva koje se može kupiti u trgovinama. Treba izbjegavati kompost jer on može sadržavati toksične hemikalije poput teških metala. Prije upotrebe iz zemljišta za uzgoj treba odstraniti faunu dubokim smrzavanjem u tri navrata. Može se koristiti i čisto dodato zemljište, ali je moguće da će brzina razmnožavanja biti manja u poreĐenju s onom koja se razvija kod miješanih supstrata. pH supstrata treba iznositi 6,0 ± 0,5. Kultura se drži u inkubatoru na temperaturi od 15 ± 2 °C bez svjetla. U svakom slučaju treba izbjegavati temperature iznad 23 °C. Dodatno/prirodno zemljište treba biti vlažno, ali ne mokro. Kad se zemljište blago stisne rukama, trebaju se pojaviti samo sitne kapljice vode. U svakom slučaju treba izbjegavati anoksične uslove (npr. ako se koristi poklopac, mora postojati dovoljno otvora na poklopcu za dodatnu razmjenu vazduha). Zemljište za uzgoj treba dozračivati pažljivim miješanjem jedanput nedeljno.

Crve treba hraniti najmanje jedanput nedeljno ad libitum usitnjenom zobi koja se stavlja u šupljinu na površini zemljišta i prekriva zemljištom. Ako u rezervoaru ostane hrana preostala od posljednjeg hranjenja, treba prilagoditi količinu nove hrane. Ako na preostaloj hrani narastu gljivice, hranu treba zamijeniti novom količinom usitnjene zobi. Da bi se pospješilo razmnožavanje, usitnjena se zob može svake dvije nedelje zamijeniti proteinskim prahom modifikovanim vitaminima, dostupnim u trgovinama. Nakon tri mjeseca životinje se prenose u svježe pripremljenu kulturu ili supstrat za uzgoj. Usitnjenu zob, koja se mora čuvati u zatvorenim posudama, treba obraditi u autoklavu ili je treba zagrijati prije upotrebe kako bi se izbjegle infekcije grinjama iz brašna (npr. Glyzyphagus sp., Astigmata, Acarina) ili grabežljive grinje (npr. Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles, Gamasida, Acarina). Nakon dezinfekcije hrana se usitnjava da bi se mogla lakše rasuti po površini zemljišta. Još jedan mogući izvor je pekarski kvasac ili riblja hrana TetraMin®.

Uslovi uzgoja su povoljni ako crvi ne pokušavaju izaći iz supstrata, ako se brzo kreću kroz zemljište, imaju sjajnu vanjsku površinu na koju se ne lijepe čestice zemljišta više-manje su bijele boje i ako se vide crvi različite starosti. Zapravo, može se smatrati da su crvi zdravi ako se neprekidno razmnožavaju.

1. Uvod

Ova metoda ispitivanja ekvivalentna je smjernici OECD-a za ispitivanje (TG) 208 (2006). Metode ispitivanja periodično se reviduju u svijetlu naučnog napretka i primjenljivosti za regulatornu upotrebu. Ova inovirana metoda ispitivanja osmišljena je za procjenu potencijalnih efekata hemikalija na nicanje i rast klijanaca. Kao takva ona ne obuhvata hronične efekte niti efekte na razmnožavanje (tj. zametanje sjemena, formiranje cvijeta, zrenje ploda). Moraju se uzeti u obzir uslovi izloženosti i svojstva hemikalije koja će se ispitivati, kako bi upotrijebili odgovarajući metodi ispitivanja (npr. prilikom ispitivanja metala/jedinjenja metala treba uzeti u obzir efekte pH vrijednosti i pripadajućih kontra-jona) (1). Ovom metodom ispitivanja ne ispituju se biljke izložene parama hemikalija. Ova metoda ispitivanja može se primijeniti na ispitivanje hemikalija u opštoj upotrebi, biocida i proizvoda za zaštitu usjeva (poznatih i kao sredstva za zaštitu bilja ili pesticidi). Razvijena je na osnovu postojećih metoda. U obzir je uzeta i ostala literatura koja se odnosi na ispitivanje biljaka. Korišćene definicije date su u Dodatku 1.

1.1 Načelo ispitivanja

Ispitivanjem se procjenjuju efekti na nicanje klijanaca i rani rast viših biljaka nakon izloženosti hemikaliji koja se ispituje a koja se dodaje u zemljište (ili drugi odgovarajući zemljišni matriks). Sjeme se dovodi u dodir sa zemljištem tretiranim hemikalijom koja se ispituje, a procjena efekata vrši se poslije 14 do 21 dan nakon što iznikne 50% klijanaca u kontrolnoj grupi. Parametri praćenja koji se mjere su vizuelna procjena nicanja klijanaca, masa suve materije izdanka (alternativno masa svježe materije izdanka) i, u izvjesnim slučajevima, visina izdanka, kao i procjena vidljivih štetnih efekata na različite dijelove biljke. Ta mjerenja i zapažanja upoređuju se sa onima koji se odnose na netretirane kontrolne biljke.

U zavisnosti od očekivane putanje izlaganja, hemikalija koja se ispituje unosi se u zemljište (ili eventualno u vještački zemljišni matriks) ili se primjenjuje na površinu zemljišta, što zapravo i predstavlja potencijalnu putanju izlaganja hemikaliji. Unošenje u zemljište vrši se tretiranjem zemljišta u rasutom stanju. Nakon primjene hemikalije, zemljište se prebacuje u posude, a zatim se sjeme određene biljne vrste sije u zemljište. Hemikalija se primjenjuje i na površinu zemljišta u posudama u kojima je sjeme već posijano. Zatim se ispitne jedinice (kontrolne jedinice i tretirano zemljište sa sjemenom) stavljaju u odgovarajuće uslove kako bi se potpomoglo klijanje/rast biljaka.

Ispitivanje se može ssprovesti u cilju određivanja krive doza-odgovor, ili kao granično ispitivanje sa samo jednom koncentracijom/dozom primjene, u zavisnosti od cilja proučavanja. Ako rezultati ispitivanja sa samo jednom koncentracijom/dozom primjene premašuju određeni nivo toksičnosti (npr. ako su primijećeni efekti veći od x%), radi se test za određivanje raspona kako bi se odredile gornja i donja granica toksičnosti, a zatim se vrši ispitivanje sa više koncentracija/doza primjene kako bi se dobila kriva doza-odgovor. Odgovarajuća statistička analiza koristi se za dobijanje efektivne koncentracije ECx ili efektivne stope primjene ERx (npr. EC25, ER25, EC50, ER50) za najosjetljivije parametre koji se ispituju. TakoĐe, u ovom ispitivanju može se izračunati najveća koncentracija bez vidljivog efekta (NOEC) i najniža koncentracija sa vidljivim efektom (LOEC).

1.2 Informacije o hemikaliji koja se ispituje

Sljedeće informacije korisne su za identifikaciju očekivane putanje izlaganjahemikaliji i za planiranje ispitivanja: strukturna formula, čistoća, rastvorljivost u vodi, rastvorljivost u organskim rastvaračima, koeficijent raspodjele 1-oktanol/voda, sorpciono ponašanje zemljišta, pritisak pare, hemijska stabilnost u vodi i na svjetlosti i biorazgradljivost.

1.3 Validnost ispitivanja

Da bi se ispitivanje smatralo validnim, u kontrolnim grupama moraju biti zadovoljeni sljedeći kriterijumi učinka:

- nicanje klijanaca iznosi najmanje 70 %;
- na klijancima nema vidljivih fitotoksičnih efekata (npr. hloroze, nekroze, venjenje, deformacije lista i stabljike), na biljkama se primjećuju samo one varijacije u rastu i morfologiji koje su normalne za tu dotičnu vrstu;
- srednja stopa preživljavanja izniklih klijanaca iz kontrolne grupe je najmanje 90% u toku trajanja ispitivanja;
- uslovi okoline za dotičnu vrstu su isti, a medijumumi za uzgoj sadrže istu količinu zemljišnog matriksa, pomoćnih medijumuma ili supstrata iz istog izvora.

1.4 Referentna hemikalija

Referentna hemikalija može se testirati u redovnim intervalima, kako bi se potvrdilo da se uspješnost ispitivanja, odgovor nekih konkretnih ispitnih biljaka i uslovi ispitivanja nijesu značajno promijenili tokom vremena. Umjesto toga, za ocjenjivanje uspješnosti sistema za ispitivanje u određenim laboratorijaama mogu se koristiti ranija mjerenja biomase ili rasta u kontrolnim grupama, što može poslužiti i kao unutarlaboratorijaska mjera kontrole kvaliteta.

2. Opis metode

Prirodno zemljište — vještački supstrat

Biljke se mogu uzgajati u posudama sa pjeskovitom ilovačom, ilovastim pijeskom ili pjeskovito-glinastom ilovačom koja sadrži do 1,5 % organskog ugljenika (oko 3% organske materije). TakoĐe, može se upotrijebiti komercijalna zemlja za saksije ili sintetička mješavina zemlje koja sadrži do 1,5% organskog ugljenika. Glinovitu zemlju ne treba koristiti ako je poznato da hemikalija koja se ispituje ima visok afinitet prema glinama. Zemlju uzetu sa terena treba prosijati tako da najveća veličina čestica bude 2 mm, kako bi se homogenizovala i odstranile krupne čestice. Potrebno je navesti vrstu i teksturu, procenat organskog ugljenika, pH vrijednost i sadržaj soli koji se izražava kao elektronska provodljivost konačnog, pripremljenog zemljišta. Zemljište se klasifikuje u skladu sa standarndnim sistemom klasifikacije (11). Zemlja se može pasterizovati ili termički obraditi kako bi se smanjio učinak patogena iz zemljišta.

Prirodno zemljište može otežati tumačenje rezultata i povećati varijabilnost zbog varirajućih fizičko-hemijskih svojstava i populacija mikroba. Te varijacije sa svoje strane značе različitu sposobnost zadržavanja vlage, sposobnost vezivanja hemikalija, aeraciju i sadržaj nutrijeata i elemenata prisutnih u tragovima. Uz varijacije u ovim fizičkim faktorima, doći će i do varijacija u hemijskim svojstvima kao što je pH vrijednost i redoks-potencijal, što može uticati na biorapoloživost hemikalije koja se ispituje.

Vještački supstrati obično se ne koriste za ispitivanje proizvoda za zaštitu usjeva, ali mogu biti korisni za ispitivanje hemikalija koje su u širokoj upotrebi ili onda kada se želi svesti na najmanju moguću mjeru varijabilnost koju pokazuje prirodno zemljište i povećati uporedivost rezultata ispitivanja. Supstrati koji se koriste treba da se sastoje od inertnih materijala koji na najmanju moguću mjeru svode interakciju sa hemikalijom koja se ispituje, nosačem rastvarača, ili sa oboje. Utvrđeno je da su kiselinom ispran kvarcni pijesak, mineralna vuna i staklena zrnca (npr. prečnika 0,35 do 0,85 mm) pogodni inertni materijali koji minimalno apsorbuju hemikaliju koja se ispituje (15) i tako obezbjeđuju maksimalnu dostupnost hemikalije klijancu za usvajanje preko korijena. U nepogodne supstrate spadaju vermikulit, perlit ili drugi materijali sa visokom sposobnošću apsorpcije. Potrebno je obezbijediti nutrijente za rast biljaka, kako biljke ne bi bile izložene stresu zbog nedostatka nutrijenata, pri čemu, ako je to moguće, to treba procijeniti putem hemijske analize ili vizuelnom procjenom kontrolnih biljaka.

Kriterijumi za izbor ispitnih vrsta

Izabrane vrste treba da budu prilično raznolike, npr. u pogledu njihove taksonomske raznovrsnosti u biljnom carstvu, njihove rasprostranjenosti, brojnosti, karakteristika životnog ciklusa karkaterističnih za datu vrstu i područja gdje rastu u prirodi, kako bi se dobio širok spektar odgovora. Prilikom izbora treba uzeti u obzir sljedeće karakteristike potencijalnih ispitnih vrsta:

- vrsta ima jednoobrazno sjemenje koje se može nabaviti iz pouzdanih izvora standardnog sjemena i koje ima ujednačeno, pouzdano i ravnodnosno klijanje, kao i jednoobrazan rast klijanaca;
- biljka je pogodna za ispitivanje u laboratorijai i može dati pouzdane i reproducibline rezultate kako u okviru iste laboratorijae za ispitivanja tako i u drugim laboratorijaama;
- osjetljivost ispitivane vrste treba da bude dosljedna reakcijama biljaka koje se nalaze u očvrstenju izloženom djelovanju hemikalije;
- vrsta je u određenoj mjeri već korišćena u ranijim ispitivanjima toksičnosti, a njena upotreba u, na primjer, biološkim probama sa herbicidima, otkrivanju prisustva teških metala, ispitivanjima saliniteta i mineralnog stresa ili proučavanjima alelopatije ukazuje na to da je vrsta osjetljiva na širok spektar stresora;
- vrsta je kompatibilna sa uslovima rasta predviđenim metodom ispitivanja;
- vrsta ispunjava kriterijume validnosti ispitivanja.

Neke od dosad najviše korišćenih ispitnih vrsta navedene su u Dodatku 2, a moguće nepoljoprivredne vrste u Dodatku 3.

Broj vrsta koje će se ispitivati zavisi od relevantnih regulatornih zahtjeva, pa on nije preciziran u ovoj metodi ispitivanja.

Primjena hemikalije koja se ispituje

Hemikalija se primjenjuje u odgovaralućem nosaču (npr. vodi, acetone, etanolu, polietilen glikolu, gumi arabici, pijesku). Mogu se ispitivati i smješe (formulisani proizvodi ili formulacije) koje sadrže aktivne sastojke i razne pomoćne supstance.

Unošenje u zemljište/vještački supstrat

Hemikalije koje se mogu rastvoriti ili suspendovati u vodi mogu se dodati u vodu, a potom se odgovarajućim uređajem za miješanje rastvor miješa sa zemljom. Ova vrsta ispitivanja može biti prikladna ako se izloženost hemikaliji odvija putem zemljišta ili putem porne vode iz zemljišta i ako postoji zabrinutost zbog njenog unošenja preko korijena. Dodavanjem hemikalije koja se ispituje ne smije se premašiti kapacitet zemljišta za vodu. Zapremina dodate vode treba da bude ista za svaku ispitnu koncentraciju, ali treba da bude ograničena kako bi se spriječilo stvaranje grudvica zemlje.

Hemikalije koje su slabo rastvorljive u vodi rastvaraju se u odgovarajućem isparljivom rastvaraču (npr. acetone, etanolu) i miješaju sa pijeskom. Rastvarač se zatim može ukloniti iz pijeska mlazom vazduha uz neprestano miješanje pijeska. Tretirani pijesak pomiješa se sa oglednim zemljištem. Pripremi se druga kontrolna grupa u koju se dodaje samo pijesak i rastvarač. Jednake količine pijeska, u koji je rastvarač bio umiješan a potom odstranjen, dodaju se svim nivoima tretiranja i drugoj kontrolnoj grupi. Kada se radi o čvrstim, nerastvorljivim hemikalijama koje se ispituju, suva zemlja i hemikalija miješaju se u odgovarajućem uređaju za miješanje. Zatim se dobijena zemlja sipa u posude, a sjeme se odmah sije.

Kada se umjesto zemlje koristi vještački supstrat, hemikalije koje su rastvorljive u vodi mogu se rastvoriti u hranljivom rastvoru neposredno prije početka ispitivanja. Hemikalije koje nijesu rastvorljive u vodi, ali koje se mogu suspendovati u vodi uz pomoć nosača rastvora dodaju se sa nosačem u hranljivi rastvor. Hemikalije koje nijesu rastvorljive u vodi i za koje ne postoji netoksičan nosač rastvorljiv u vodi rastvaraju se u odgovarajućem isparljivom rastvaraču. Taj rastvor se pomiješa sa pijeskom ili staklenim zrncima, stavi u obrtni akuumski aparat u kom isparava, poslije čega na pijesku ili staklenim zrncima ostaje ravnodnosan sloj hemikalije. Odmjereni dio zrnaca ekstrahuje se istim organskim rastvaračem, a uzorak hemikalije se analizira prije punjenja posuda.

Površinska primjena

Kada se radi o sredstvima za zaštitu usjeva, prskanje površine zemljišta ispitnim rastvorom česta je primjena hemikalije koja se ispituje. Sva oprema koja se koristi prilikom sprovođenja ispitivanja, uključujući opremu koja se koristi za pripremu i nanošenje hemikalije koja se ispituje, treba da bude takve izrade i kvaliteta da se ispitivanja u kojima se koristi ova oprema mogu ssprovesti na precizan način i da daje reproduktibilnu pokrivenost. Pokrivenost treba da bude jednoobrazna na svim dijelovima površine zemljišta. Potrebno je paziti da se izbjegne mogućnost adsorbovanja hemikalija na opremu ili reakcije s opremom (npr. plastične cijevi i lipofilne hemikalije ili čelični djelovi i elementi). Hemikalija koja se ispituje naprska se na površinu zemljišta pri čemu se simulira tipična primjena rezervoara s prskalicom. Uopšte uzevši, količine koje se raspršuju treba da budu u granicama uobičajene poljoprivredne prakse i treba ih navesti (količina vode, itd.). Vrsta mlaznice bira se tako da se obezbijedi jednoobrazna pokrivenost površine zemljišta. Ako se koriste rastvarači i nosači, priprema se druga grupa kontrolnih biljaka koja dobija samo rastvarač/nosač. To nije neophodno za sredstva za zaštitu usjeva koja se ispituju kao formulacije.

Verifikacija koncentracije/doze hemikalije koja se ispituje

Koncentracije/doze primjene moraju se potvrditi odgovarajućom analitičkom provjerom. Kod rastvorljivih hemikalija, provjera svih ispitnih koncentracija/doza može se izvršiti analizom ispitnog rastvora sa najvećom koncentracijom koji je korišćen za ispitivanje sa dokumentacijom o naknadnom razblaživanju i upotrebi kalibrisane opreme za nanošenje (npr. kalibrisane analitičke staklene posude, kalibrisanje opreme za nanošenje

raspršivanjem). Kada se radi o nerastvorljivim hemikalijama, provjera složenog materijala mora se vršiti uz uračunavanje masa hemikalije koja se ispituje a koja je dodata zemljištu. Ako je potrebno dokazati homogenost, može biti neophodna i analiza zemljišta.

2.1 Postupak

Plan ispitivanja

Sjeme iste vrste posije se u posude. Broj posijanih sjemenki po posudi zavisiće od vrste, veličine posude i trajanja ispitivanja. Broj biljaka po posudi treba da bude toliki da omogući odgovarajuće uslove za rast i da za vrijeme ispitivanja ne dođe do prevelike gustine biljaka. Maksimalna gustina biljaka treba da bude između 3-10 sjemenki na 100 cm2, u zavisnosti od veličine sjemenki. Na primjer, preporučuje se jedna do dvije biljke kukuruza, soje, paradajza, krastavca ili šećerne repe po posudi od 15 cm, tri biljke uljane repice ili graška po posudi od 15 cm i 5 do 15 biljaka crnog luka, pšenice ili drugih biljaka sa malim sjemenkama po posudi od 15 cm. Broj sjemenki i ponavljanja (ponavljanje se definiše kao posuda, tako da biljke u istoj posudi ne predstavljaju ponavljanje) treba da bude odgovarajući za optimalnu statističku analizu. Treba napomenuti da će varijabilnost biti veća kod ispitnih vrsta kod kojih se koristi manji broj velikih sjemenki po posudi (ponavljanju) nego kod ispitnih vrsta kod kojih je moguće koristiti veći broj malih sjemenki po posudi. Ta varijabilnost može se svesti na najmanju moguću mjeru tako što će se u svakoj posudi posijati jednak broj sjemenki.

Kontrolne grupe koriste se kako bi se uvjerili da su uočeni efekti povezani samo sa izlaganjem hemikaliji koja se ispituje ili da se samo tome mogu pripisati. Odgovarajuća kontrolna grupa treba u svakom pogledu da bude identična ispitivanoj grupi, osim što se ne izlaže hemikaliji koja se ispituje. U okviru jednog ispitivanja, sve ispitne biljke, uključujući i biljke iz kontrolne grupe, treba da budu iz istog izvora. Da bi se spriječila neobjektivnost, potrebno je nasumice odabrati ispitne i kontrolne posude.

Treba izbjegavati sjeme na kome se nalazi sloj insekticida ili fungicida (tj. „obloženo‖ sjeme). Međutiim, neka regulatorna tijela dozvoljavaju upotrebu određenih nesistemskih kontaktnih fungicida (npr. kaptana, tirama). Ako postoji zabrinutost zbog patogena koji se prenose sjemenom, sjeme se može nakratko prastvoriti u blag, petoprocentni rastvor hipohlorita, a zatim dobro isprati tekućom vodom i osušiti. Nijesu dozvoljeni sanacioni tretmani drugim sredstvima za zaštitu usjeva.

Uslovi ispitivanja

Uslovi ispitivanja treba da budu približni onim uslovima koji su neophodni za normalan rast ispitivanih vrsta i sorti (Dodatak 4 sadrži primjere uslova ispitivanja). Biljke koje niču treba održavati u skladu sa dobrom hortikulturnom praksom u komorama, fitotronima ili staklenicima, u kontrlisanim uslovima. Prilikom upotrebe objekata za uzgoj, ta praksa obično obuhvata kontrolisanje i dovoljno često (npr. svakodnevno) bilježenje temperature, vlažnosti, koncentracije ugljendioksida, svjetlosti (njenog intenziteta, talasne dužine, fotosintetički aktivnog zračenja) i perioda osvijetljenosti, sredstava za navodnjavanje itd. kako bi se obezbijedio dobar rast biljaka, koji se ocjenjuje na osnovu poređenja sa rastom kontrolnih biljaka odabrane vrste. Temperaturu u stakleniku treba kontrolisati uz pomoć sistema za provjetravanje, grijanje i/ili hlađenje. Za ispitivanja u staklenicima obično se preporučuju sljedeći uslovi:

- temperatura: 22 °C ± 10 °C;
- vlažnost: 70 % ± 25 %;

- fotoperiod: najmanje 16 sati osvijetljenosti;
- intenzitet svjetlosti: 350 ± 50 µE/m2/s. Može biti potrebno primijeniti dodatno osvjetljenje ukoliko intenzitet padne ispod 200 µE/m2/s, talasne dužine 400 - 700 nm, izuzev za određene vrste čije su potrebe za svjetlošću manje.

U toku ispitivanja treba pratiti i bilježiti uslove u očvrstenju. Biljke treba uzgajati u neporoznim plastičnim ili glaziranim posudama ispod kojih se stavlja tacna ili tanjirić. Posude se povremeno mogu premještati kako bi se što više smanjila varijabilnost rasta biljaka (zbog razlika u uslovima ispitivanja u okviru objekta za uzgoj). Posude moraju biti dovoljno velike da omoguće normalan rast.

Zemlja se po potrebi može obogatiti hranljivim materijama kako bi se održao dobar vigor biljaka. O potrebi za dodatnim hranljivim materijama i o pravom trenutku za njihovo dodavanje zaključuje se na osnovu posmatranja kontrolnih biljaka. Preporučuje se da se zalivanje ispitnih posuda vrši odozdo (npr. uz pomoć kanapa od fiberglasa). Međutiim, prvo zalivanje može se izvršiti odozgo kako bi se podstaklo klijanje sjemena, a u slučajevima kada se hemikalija primjenjuje na površinu zemljišta, takvo zalivanje olakšava prodiranje hemikalije u zemlju.

Specifični uslovi uzgajanja treba da odgovaraju ispitivanoj vrsti i hemikaliji koja se ispituje. Biljke iz kontrolnih grupa i tretirane biljke moraju se držati u istim uslovima očvrstenja; međutiim, potrebno je preduzeti odgovarajuće mjere da se spriječi unakrsna izloženost (npr. zbog isparljivih hemikalija) između različitih tretiranih grupa i izlaganje kontrolnih grupa hemikaliji koja se ispituje.

Ispitivanje sa jednom koncentracijom/dozom primjene

Da bi se odredila odgovarajuća koncentracija/doza primjene hemikalije za sprovođenje ispitivanja sa jednom koncentracijom ili dozom primjene (test izazova/granični test), niz faktora mora se uzeti u obzir. Kada se radi o hemikalijama u širokoj primjeni, u te faktore spadaju fizičko-hemijska svojstva hemikalije. Kada se radi o sredstvima za zaštitu usjeva, u obzir treba uzeti fizičko-hemijska svojstva i obrazac upotrebe hemikalije koja se ispituje, njenu maksimalnu koncentraciju ili dozu primjene, broj primjena po sezoni i/ili postojanost hemikalije koja se ispituje. Da bi se odredilo da li neka hemikalija u širokoj upotrebi posjeduje fitotoksična svojstva, može biti primjereno da se ispitivanje izvrši na maksimalnoj količini od 1 000 mg/kg suve zemlje.

Test za određivanje raspona

Ako je neophodno, može se uraditi test za određivanje raspona da bi se dobile smjernice u vezi sa koncentracijama/dozama primjene koje treba ispitati u glavom istraživanju odnosa između doze i odgovora. U testu za određivanje raspona potrebno je da ispitne koncentracije/doze primjene budu uzete iz širokog raspona vrijednosti (npr. 0,1, 1,0, 10, 100 i 1 000 mg/kg suve zemlje). Kada se radi o proizvodima za zaštitu usjeva, koncentracije/doze primjene mogu se zasnivati na preporučenoj ili maksimalnoj koncentraciji ili dozi primjene, npr. 1/100, 1/10, 1/1 preporučene/maksimalne koncentracije ili doze primjene

Ispitivanje sa više koncentracija/doza primjene

Cilj ispitivanja sa više koncentracija/doza primjene je utvrĐivanje odnosa između doze i odgovora i određivanje vrijednosti ECx ili ERx za nicanje, biomasu i/ili vizuelne efekte kroz uporeĐivanje sa neizlaganim kontrolnim grupama, kako to zahtijevaju regulatorna tijela.

Broj i razmak između koncentracija ili doza primjene treba da bude dovoljno veliki da se na osnovu njega utvrdi pouzdan odnos između doze i odgovora i regresiona jednačina i izvrši procjena ECx ili ERx. Izabrane koncentracije/doze primjene treba da obuhvate vrijednosti ECx ili ERx, koje treba odrediti. Na primjer, ako je potrebno odrediti vrijednost EC50, bilo bi poželjno vršiti ispitivanje sa dozama koje izazivaju efekat u rasponu od 20 do 80 %. Preporučeni broj ispitnih koncentracija/doza primjene za postizanje navedenog je najmanje pet u geometrijskom nizu plus netretirana kontrolna grupa, sa faktorom razmaka ne većim od tri. Za svaku tretiranu i kontrolnu grupu, broj ponavljanja treba da iznosi najmanje četiri, a ukupan broj sjemenki treba da iznosi najmanje 20. Za određene biljke sa malom brzinom klijanja ili sa promjenljivim karakteristikama rasta može biti potrebno više ponavljanja kako bi se povećala statistička snaga ispitivanja. Broj ponavljanja se može smanjiti ako se koristi veći broj ispitnih koncentracija/doza primjene. Ako treba procijeniti NOEC, za dobijanje željene statističke snage može biti potrebno više ponavljanja.

Posmatranja

Tokom perioda posmatranja, tj. 14 do 21 dan nakon nicanja 50% kontrolnih biljaka (kao i biljaka iz kontrolnih grupa kojima je dodat rastvarač, ako je primjenljivo), biljke se često posmatraju (najmanje jedanput sedmično, a po mogućnosti i svakodnevno) kako bi se pratilo nicanje, vizuelna fitotoksičnost i mortalitet. Na kraju ispitivanja treba zabilježiti izmjereni procenat izniklih biljaka i biomasu preživjelih biljaka, kao i vidljive štetne efekte na različitim djelovima biljke. U pomenute štetne efekte spadaju abnormalnosti u izgledu izniklih klijanaca, zakržljali rast, hloroza, obezbojenost, uginuće i efektni na razvoj biljke. Konačna biomasa može se izmjeriti uz pomoć konačne prosječne suve mase izdanaka preživjelih biljaka, tako što se izdanci odsijeku pri površini zemljišta i suše na 60 °C dok se ne dobije stalna masa. Drugi način je da se konačna masa izmjeri uz pomoć svježe mase izdanaka.

Visina izdanka može biti još jedan parametar praćenja, ako to zahtijevaju regulatorna tijela. Potrebno je koristiti jedinstven sistem bodovanja vizuelno uočljivih povreda kako bi se procijenii uočljivi toksični odgovori. Primjeri za kvalitativno i kvantitativno vizuelno ocjenjivanje dati su literaturi (23) (24).

3. Podaci i izvještavanje

Statistička analiza

Ispitivanje sa jednom koncentracijom/dozom primjene

Potrebno je analizirati podatke za svaku biljnu vrstu uz pomoć odgovarajuće statističke metode. Bilježi se nivo efekta pri određenoj ispitnoj koncentraciji/dozi primjene, ili nepostizanje datog efekta pri određenoj koncentraciji/dozi primjene (npr. efekat < x % uočen pri koncentraciji ili dozi primjene y).

Ispitivanje sa više koncentracija/doza primjene

Odnos doze i odgovora utvrđuje se regresionom jednačinom. Mogu se koristiti različiti modeli: na primjer, za procjenu vrijednosti ECx ili ERx (npr. EC25, ER25, EC50, ER50) i njihovih granica pouzdanosti za nicanje, u obliku kvantalnih podataka, prikladni mogu biti modeli logit, probit, Vejbul (Weibull), Spirman-Karberova (Spearman-Karber), modifikovana

Spriman –Karberova metoda, itd. Za rast klijanaca (masa i visina), kao stalnih parametara praćenja, vrijednosti ECx ili ERx i njihove granice pouzdanosti mogu se procijeniti uz pomoć odgovarajuće regresione analize (npr. Brus-Verstigova (Bruce-Versteeg) nelinearna regresiona analiza. Kada god je to moguće, vrijednost R2 treba da iznosi 0,7 ili više za najosjetljivije vrste, a upotrijebljene ispitne koncentracije/doze primjene treba da obuhvate efekte od 20% do 80%. Ako je potrebno procijeniti NOEC, treba se odlučiti za primjenu moćnih statističkih testova, koji se biraju na osnovu distribucije podataka. *Izvještaj o ispitivanju*

U izvještaju o ispitivanju treba prikazati rezultate proučavanja i dati detaljan opis ispitnih uslova, temeljnu diskusiju rezultata, analizu podataka i zaključke izvučene iz analize. Izvještaj treba da sadrži tabelarni kratak prikaz i apstrakt rezultata. Izvještaj mora obuhvatiti sljedeće:

Ispitivana hemikalija:

- podaci za identifikaciju hemikalije, relevantna svojstva ispitivane hemikalije (npr. log Pow, rastvorljivost u vodi, pritisak pare i informacije o životnom ciklusu i ponašanju hemikalije u životnoj sredini, ako su dostupne);
- podaci o pripremanju ispitnog rastvora i verifikaciji ispitnih koncentracija na način predviĐen u stavu 18.

Ispitne vrste:

- podaci o ispitnom organizmu: vrsta/sorta, porodice biljaka, naučni i uobičajeni nazivi, izvor i što je moguće detaljnija istorija sjemena (tj. naziv dobavljača, procenat klijanja, klasa veličine sjemena, broj serije ili partije, sjemena godina ili vegetacijska sezona u kojoj je sjeme prikupljeno, datum ocjenjivanja klijavosti), životna sposobnost itd.;
- broj ispitanih vrsta monokotila i dikotila;
- obrazloženje izbora vrsta;
- opis skladištenja, tretiranja i održavanja sjemena.

Uslovi ispitivanja:

- objekat u kom je izvršeno ispitivanje (npr. komora za uzgoj, fitotron i staklenik);
- opis sistema za ispitivanje (npr. dimenzije posuda, materijal od kog su posude napravljene i količine zemlje);
- karakteristike zemlje (tekstura ili vrsta zemlje: distribucija i klasifikacija čestica zemlje, fizička i hemijska svojstva uključujući procenat organske materije, procenat organskog ugljenika i pH vrijednost);
- pripremanje zemlje/supstrata prije ispitivanja (npr. zemlja, vještačka zemlja, pijeska i ostalo);
- opis medijumuma sa nutrijentima, ako je korišćen;
- primjena hemikalije koja se ispituje; opis metode primjene, opis opreme, doze i količine izlaganja uključujući verifikaciju hemikalije, opis metode kalibracije i opis uslova u očvrstenju za vrijeme primjene;
- uslovi rasta: intenzitet svjetlosti (npr. PAR - fotosintetički aktivno zračenje), fotoperiod, najviše/najniže temperature, raspored i način zalivanja, Đubrenje;
- broj sjemenki po posudi, broj biljaka po dozi, broj ponavljanja (posuda) po dozi izloženosti;

- vrsta i broj kontrolnih grupa (negativne i/ili pozitivne kontrolne grupe, kontrolna grupa kojoj je dodat rastvarač, ako je korišćena); - trajanje ispitivanja.

Rezultati:

- tabela sa svim parametrima praćenja za svako ponavljanje, ispitnu koncentraciju/dozu primjene i vrstu;
- broj i procenat nicanja u poreĐenju sa kontrolnim grupama;
- mjerenja biomase (suva ili svježa masa izdanka) biljaka kao procentualna vrijednost u odnosu na kontrolne grupe;
- visina izdanaka biljaka kao procenat u odnosu na kontrolne grupe, ako je mjerena;
- procentualno izraženo vizuelno oštećenje i kvalitativno-kvantitativni opis vizuelnog oštećenja (hloroza, nekroza, venjenje, deformacija lista i stabljike, kao i eventualni izostanak efekata) izazvanog ispitivanom hemikalijom, u poreĐenju sa kontrolnim biljkama;
- opis skale ocjenjivanja korišćene za procjenu vizuelnog oštećenja, ako je vizuelno ocjenjivanje prikazano u izvještaju;
- u slučaju da je ispitivana samo jedna doza primjene, potrebno je navesti stepen oštećenja u procentualnom obliku;
- vrijednosti ECx ili ERx (npr. EC50, ER50, EC25, ER25,) i pripadajuće granice pouzdanosti. Ako je izvršena regresiona analiza, potrebno je navesti standardnu grešku za regresionu jednačinu i standardnu grešku za procjenu pojedinačnog parametra (npr. nagib, tačka presijecanja);
- vrijednosti NOEC (i LOEC) ako su računate;
- opis korišćenih statističkih postupaka i pretpostavki;
- grafički prikaz ovih podataka i odnosa doza-odgovor ispitivanih vrsta.

Odstepena od postupaka opisanih u ovoj metodi ispitivanja i sve eventualne neuobičajene pojave u toku ispitivanja.

efinicije

Aktivni sastojak (a.i.) (ili aktivna supstanca (a.s.)): material namijenjen za postizanje određenog biološkog efekta (npr. suzbijanje insekata, suzbijanje bolesti biljaka, suzbijanje korova u tretiranoj zoni), poznat i kao aktivni sastojak/aktivna supstanca tehničke čistoće..

Hemikalija: supstanca ili smješa.

Sredstva za zaštitu usjeva (SZU) ili sredstva za zaštitu bilja (SZB) ili pesticidi: materijali sa specifičnom biološkom aktivnošću koji se ciljano koriste za zaštitu usjeva od štetočina (npr. od gljivičnih bolesti, insekata i konkurentskih biljaka).

Cx. koncentracija sa efektom od x % ili ERx. doza sa efektom od x %: koncentracija ili doza koja rezultira nepoželjnom promjenom od x% u parametru praćenja koji se mjeri u ispitivanju u odnosu na kontrolne grupe (npr. 25-procentno odnosno 50-procentno smanjenje nicanja klijanaca, mase izdanaka, konačnog broja prisutnih biljaka ili 25-procentno odnosno 50procentno povećanje vidljivih oštećenja daje EC25/ER25 odnosno EC50/ER50).

Nicanje: pojavljivanje koleoptila ili kotiledona iznad površine zemlje.

Formulacija: komercijalno formulisani proizvod koji sadrži aktivnu supstancu (aktivni sastojak), poznat i kao finalni preparatili tipični proizvod za krajnju upotrebu.

LOEC (najniža koncentracija sa vidljivim efektom): najniža koncentracija hemikalije koja se ispituje pri kojoj je uočen efekat. U ovom ispitivanju, koncentracija koja odgovara LOEC-u ima statistički značajan efekat ($p < 0,05$) u okviru datog perioda izloženosti u poređenju sa kontrolnom grupom i veća je od vrijednosti NOEC-a.

Biljke koje ne pripadaju ciljnoj grupi: one biljke koje su izvan zone sa biljkama iz ciljne grupe. Ako se radi o sredstvima za zaštitu usjeva, to se obično odnosi na biljke izvan tretirane zone.

NOEC (najveća koncentracija bez vidljivog efekta): najveća koncentracija hemikalije koja se ispituje pri kojoj nije primijećen nikakav efekat. U ovom ispitivanju, koncentracija koja odgovara NOEC-u nema statistički značajan efekat ($p < 0,05$) u okviru datog perioda izloženosti u poređenju sa kontrolnom grupom.

Fitotoksičnost: Štetna odstepena (utvrđena na osnovu mjerenja i vuzuelnom procjenom) od normalnog obrasca izgleda i rasta biljaka kao posljedica primjene date hemikalije.

Ponavljanje: ogledna jedinica koja predstavlja kontrolnu grupu i/ili tretiranu grupu. U ovom ispitivanju, posuda se definiše kao ponavljanje.

Vizuelna procjena: ocjenjivanje vidljivog oštećenja zasnovano na posmatranju položaja i vigora biljke, njenih deformacija, hloroze, nekroze i sveukupnog izgleda u poređenju sa kontrolnom grupom.

Hemikalija koja se ispituje: svaka supstanca ili smješa koja se ispituje primjenom ove metode ispitivanja.

Spisak vrsta korišćenih u dosadašnjim ispitivanjima biljaka

Porodica	Vrsta	Uobičajeni naziv
DIKOTILE		
Apiaceae (Umbelliferae)	*Daucus carota*	Šargarepa
Asteraceae (Compositae)	*Helianthus annuus*	Suncokret
Asteraceae (Compositae)	*Lactuca sativa*	Zelena salata
Brassicaceae (Cruciferae)	*Sinapis alba*	Bijela slačica
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica campestris var. chinensis*	Kineski kupus
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica napus*	Uljana repica
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica oleracea var. capitata*	Kupus
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica rapa*	Repa
Brassicaceae (Cruciferae)	*Lepidium sativum*	Baštenska grbica
Brassicaceae (Cruciferae)	*Raphanus sativus*	Rotkvica
Chenopodiaceae	*Beta vulgaris*	Šederna repa

Cucurbitaceae	*Cucumis sativus*	Krastavac
Fabaceae (Leguminosae)	*Glycine max (G. soja)*	Soja
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus aureus*	Mungo pasulj
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus vulgaris*	Obični pasulj
Fabaceae (Leguminosae)	*Pisum sativum*	Grašak
Fabaceae (Leguminosae)	*Trigonella foenum-graecum*	Piskavica (grčka djetelina)
Fabaceae (Leguminosae)	*Lotus corniculatus*	Žuti zvjezdan
Fabaceae (Leguminosae)	*Trifolium pratense*	Crvena djetelina
Fabaceae (Leguminosae)	*Vicia sativa*	Obična grahorica
Linaceae	*Linum usitatissimum*	Lan
Polygonaceae	*Fagopyrum esculentum*	Heljda
Solanaceae	*Solanum lycopersicon*	Paradajz
MONOKOTILE		
Liliaceae (Amarylladaceae)	*Allium cepa*	Crni luk
Poaceae (Gramineae)	*Avena sativa*	Zob
Poaceae (Gramineae)	*Hordeum vulgare*	Ječam
Poaceae (Gramineae)	*Lolium perenne*	Obični ljulj
Poaceae (Gramineae)	*Oryza sativa*	Pirinač
Poaceae (Gramineae)	*Secale cereale*	Raž
Poaceae (Gramineae)	*Sorghum bicolor*	Obični sirak
Poaceae (Gramineae)	*Triticum aestivum*	Pšenica
Poaceae (Graminae)	*Zea mays*	Kukuruz

Spisak mogućih nepoljoprivrednih vrsta

Vrste koje OECD propisuje kao moguće vrste za ispitivanje toksičnosti za biljke

Napomena: U sljedećoj tabeli nalaze se informacije o 52 nepoljoprivredne vrste (literature je navedena u zagradama kod svakog unosa). Navedene stope nicanja uzete su izobjavljene literature i služe samo kao opšta smjernica. Pojedinačna iskustva mogu varirati u zavisnosti od izvora sjemena i drugih faktora.

PORODICA Botanički naziv vrste (Uobičajeni naziv na	**Životni vijek i stanište**	**Masa sjemena (mg)**	**Fotoperiod za klijanje ili rast**	**Dubina sađenja (mm)**	**Vrijeme potrebno za klijanje (u danima)**	**Posebna obrad**	**Test toksičnosti**	**Dobavljači sjemena**	**Ostala upućiva**

cnogorskom jeziku)									
APIACEAE *Torilis japónica* (Krpeljica, čekinjavka)	J, D narušena područja, žive ograde, pašnjaci (16, 19)	1,7- ,9 1 .9) (14,	L = D (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	hladna stratifikacija (7, 14, 18, 19) dozrijevanje može biti neopodno o (19) klijanje inhibirano tamom (1, 19) bez ikakve posebne obrade (5)	POST (5)		
ASTERACEAE *Bellis perennis* (Bijela rada)	V travnjaci, oranice, ledine (1 6, 19)	0,09- (4, 0,17 19)	L = D (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	zračenje ne utiče na klijanje (8, 19) bez ikakve posebne obrade (4, 14)	POST (4)	A, D, F	7
Centaurea cyanus (Različak)	J polja, pored puteva, otvorena staništa (16)	4,1 -4,9 (4, 14)	L = D (14)	0-3 (2, 4, 14)	14-21 (10 %) (14)	bez ikakve posebne obrade (2, 4)	POST (2,4)	A, , E, F	7

Centaurea nigra (Crna zečina)	V polja, pored puteva, otvorena staništa (16, 19)	2,4-2,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	dozrijevanje može biti neophodno (18, 19) klijanje inhibirano tamom (19) bez ikakve posebne obrade (5 14, 26)	POST (5, 22, 26)	A	
Inula helenium Oman	V vlažna, narušena mjesta (16)	1-1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		bez ikakve posebne obrade (4)	POST (4)	A, F	
Leontodon hispidus (Lavlji zub)	V polja, pored puteva, narušena područja (16, 19)	0,85 - 1,2 14, 19)	L = D (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	klijanje inhibirano tamom (17, 18, 19) bez ikakve posebne obrade (5, 23)	POST (5, 22, 23)		
Rudbeckia hirta (Rudbekija)	D, V narušena područja (16)	0,3 (4, 14)	L = D (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33	bez ikakve posebne obrade (4, 14, 33)	POST (4, 33)	C, D, E, F	

Solidago canadensis Kanadska štapika	V pašnjaci, otvorena područja (16)	0,06-0,08 (4, 14)	L = D (11)	0 (4)	14-21 (11)	pomiješati sa jednakom količinom pijeska i prastvoriti 24 sata u 500 pp GA (11) bez ikakve posebne obrade (4)	POST (4)	E, F	

Xanthium pensylvanicum (boca)	J polja, otvireni habitati (16)	25-61 (14, 29)		0(1) 5(29)		klijanje inhibirano tamom (1) prastvoriti u toplu vodu 12 sati (29)	PRE & POST (31)	A	
Xanthium spinosum (trnovita boca)	J otvorena staništa (16)	200 (14)	L = D (14) L > D (6)	10 (6)		skarifikacija (14) bez ikakve posebne obrade (6)	PRE & POST (6)	A	
Xanthium strumarium (obična boca)	J polja, otvorena staništa (16)	67,4 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 21)		bez ikakve posebne obrade (6, 14, 21)	PRE & POST (6, 21, 28, 31)	A	

BRASSICACEAE *Cardamine pratensis* (Livadska režuha)	V (16, polja, pored puteva, ledine 19)	0,6 (14, 1)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 (18)	klijanje inhibirano tamom (18, 19) bez ikakve posebne obrade (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	
CARYOPHYLLACEAE *Lychnis flos-cuculi* (Ušac)	V (16)	0,21 (14)	L = D (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	dozrijevanje može biti neophodno (18) bez ikakve posebne obrade (5, 14, 15, 22-26)	POST (5, 15, 22-26)	F	
CHENOPODIACEAE *Chenopodium album* (Pepeljuga)	J obod polja, narušena područja (16, 19)	0,7-1,5 (14, 19, 34)	L = D (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	obrada se razlikuje u zavisnosti od boje sjemena (19) dormant	PRE & POST (28, 31, 34)	A	32

						nost pri suvom skladištenju (19) klijanje inhibirano tamom (1, 18, 19) hladna stratifikacija (18) bez ikakve posebne obrade (14, 34)			
CLUSIACEAE *Hypericum perforatum* (kantarion)	V polja, oranice, otvorena staništa (16, 19)	0,1 - 0,23 (14, 19)	L= D (14)	0 (1, 19)	3 (19) %) 11 (90 (18)	klijanje inhibirano tamom (1, 18, 19) bez ikakve posebne obrade (5, 14, 15, 25, 27)	POST (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE *Ipomoea hederacea* (ladlež)	J pored puteva, otvorena staništa, kukuruzišta (16)	28,2 (14)	L > D (6, 10)	10-20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	zračenje ne utiče na klijanje (1) bez ikakve posebne obrade (6, 21)	PRE & POST (6, 12, 21, 28)	A	

CYPERACEAE *Cyperus rotundus* (Okruglastioštrik)	V oranice, pašnjaci, pored puteva (16, 30)	0,2 (14)	L= D (14)	0 (1) 10-20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	klijanje inhibirano tamom (1) bez ikakve posebne obrade (6, 10, 14)	PRE & POST (6, 28, 31)	B	7
FABACEAE	V	1-1,67	L = D (14)		1 (50 %)	skarifikacija (14,	POST	A, D, E, F	

Lotus corniculatus (žuti zvjezdan)	travnae površine, pored puteva, otvorena staništa (16, 19)	(14, 19)			(19)	19) zračenje ne utiče na klijanje (18, 19) bez ikakve posebne obrade (23, 25)	(5, 23, 25)		

Senna obtusifolia (sena)	J ume vlažne (16)	23-28 (9)	L = D (14) L > D (9)	10-20 (6,9)		prastvoriti sjeme u vodu na 24 sata (9) skarifikacija (14) životna sposobnost sjemena se razlikuje u zavisnosti od boje (1) bez ikakve posebne obrade (6)	POST (6,9)	A	
Sesbania exaltata (konoplja)	J aluvijalno zemljište (16)	11- 13 (9, 14)	L > D (9)	10-20 (9, 21)		prastvoriti sjeme u vodu na 24 sata (9) zračenje ne utiče na klijanje (1)) bez ikakve posebne obrade (21)	PRE & POST (9, 21, 28, 31)	A	
Trifolium pratense (Crvena djetelina)	V polja, pord puteva, oranice (16,	1,4-1,7 (14, 19)	L= D (14)		1 (50 %) (19)	skarifikacija (14, 18) dozrijeva	POST (5)	A, E, F	

	19)					nje može biti neophodno (19) zračenje ne utiče na klijanje (1, 19) bez ikakve posebne obrade (5)			
LAMIACEAE *Leonurus cardiaca* (Srdačica	V otvorena područja (16)	0,75 - 1,0 (4, 14)	L= D (14)	0 (4)		bez ikakve posebne obrade (4, 14)	POST (4)	F	
Mentha spicata (Nana obična)	V vlažna područja (16)	2,21 (4)		0 (4)		bez ikakve posebne obrade (4)	POST (4)	F	
Nepeta cataria (Macina tava)	V narušena područja (16)	0,54 (4, 14)	L= D (14)	0 (4)		bez ikakve posebne obrade (2, 4, 14)	POST (2,4)	F	

Prunella vulgaris (Crnjevac)	V oranice, travnate površine, narušene površine (16, 19)	0,58 - 1,2 (4, 14, 19)	L= D (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	klijanje inhibirano tamom (18, 19) veda klijavost kod krupnijih sjemenki (1) bez ikakve posebne obrade (4, 14, 22)	POST (4, 22)	A, F	
Stachys officinalis (Crna bokvica)	V travnjaci, obod polja (19)	14-18 (14, 19)	L= D (14)		7 (50 %) (1)	bez ikakve posebne obrade (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	

MALVACEAE *Abutilón theophrasti* (Lipica)	J polja, otvorena staništa (16)	8,8 (14)	L= D (14)	10-20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	skarifikacija (14) bez ikakve posebne obrade (5, 10, 21)	PRE & POST (6, 22, 28, 31)	A, F	
Sida spinosa (/)	J polja, pored puteva (16)	3,8 (14)	L= D (14)	10-20 (6, 21)		skarifikacija (14) zračenje ne utiče na klijanje (1) bez ikakve posebne obrade (6, 21)	PRE & POST (6, 21, 28, 31)	A, F	

PAPAVERACEAE *Papaver rhoeas* (Bulka)	J polja, oranice, narušene površine (16, 19)	0,1 - 0,3 (4, 14, 19, 29)	L= D (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	hladna stratifikacija & skarifikacija (1, 19, 32) bez ikakve posebne obrade (4, 14, 29)	POST (4)	A, D, E, F, G	
POACEAE *Agrostis tenuis* (Obična rosulja)	travnjaci, pašnjaci (16)	0,07 (14)	L > D (ĸO)	20 (10)	10 (62 % (10)	klijanje inhibirano tamom (1, 1719) bez ikakve posebne obrade (10)	POST (10)	A, E	
Alopecurus myosuroides (Mišji repak)	J polja, otvorena staništa (16)	0,9-1,6 (29, 34)	L = D (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	skarifikacija (14) tretirati sa 101 mg/L KNO3 (14) topla stratifikacija (1) klijanje	PRE & POST (28, 34)	A	32

						inhibirano tamom (1) bez ikakve posebne obrade (34)			

Avena fatua (Divlja zob)	J kultivisane površine, otvorena staništa (16)	7-37,5 (14, 30)	L = D (14) L > D (6)	10-20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	skarifikacija (7, 32) klijanje inhibirano tamom (1) hladna stratifikacija (1, 18) bez ikakve posebne obrade (6, 10, 14)	PRE & POST (6, 10, 28, 31)	A	
Bromus tectorum (Crvena klasača)	J polja, pored puteva, oranice (16)	0,452,28 (14, 29)	L = D (14)	3 (29)		period dozrijevanja (1, 7, 32) klijanje inhibirano svjetlošdu (1) bez ikakve posebne obrade (14)	PRE & POST (28, 31)	A	
Cynosurus cristatus (Pijetlova krestica)	V polja, pored puteva, otvorena staništa (16, 19)	0,5-0,7 (14, 19, 29)	L = D (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	zračenje ne utiče na klijanje (19) bez ikakve posebne obrade (14, 29)	POST (5)	A	

Digitaria sanguinalis (Obična svračica)	J polja, ledine, otvorena staništa (16)	0,52-0,6 (14, 30)	L = D (14)	10-20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	skarifikacija, hladna stratifikacija, & dozrijevanje (1, 7, 14, 32) tretirati sa 101 mg/L KNO3 (14) klijanje inhibirano tamom (1) bez ikakve posebne obrade (21)	PRE & POST (18, 25, 31)	A	
Echinochloa crusgalli (Muhar veliki)	J (16)	1,5 (14)	L = D (14) L > D (3)	10-20 (7, 21)		skarifikacija (7, 32) zračenje ne utiče na klijanje (1) bez ikakve posebne obrade (3, 14, 21)	PRE & POST (3, 21, 28, 31)	A	
Elymus canadensis (Kanadska pirevina)	V rječne obale, narušena područja (16)	4-5 (14, 30)	L = D (11)	1 (11)	14-28 (11)	bez ikakve posebne obrade (2, 11)	POST (2)	C, D, E	

Festuca pratensis (Livadski vijuk)	V polja, vlažna područja (16, 19)	1,53-2,2 (16, 19)	L = D (14) L > D (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	bez ikakve posebne obrade (10, 19)	POST (10)	A	7
Hordeum pusillum (Mali ječam)	J pašnjaci, pored puteva, otvorena staništa (16)	3,28 (14)				topla stratifikacija (1) zračenje ne utiče na klijanje (1)	PRE (31)		7
Phieum pratense (Mačji repak)	V pašnjaci, oranice, dinarušena područja (16, 19)	0,45 (14, 19)	L > D (10, 14)	0-10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	klijanje inhibirano tamom (19) zračenje ne utiče na klijanje (17) bez ikakve posebne	POST (10)	A, E	

						obrade (10, 14, 17, 19)			
POLYGONACEAE *Polygonum convolvulus* (Njivski vijušac)	J otvorena staništa, pored puteva (16)	5-8 (4, 14, 29)	L = D (20)	0-2 (4, 29)		hladna stratifikacija u trajanju od 4 — 8 sedmica (1, 2, 4, 20, 29) zračenje ne utiče na klijanje (1)	PRE & POST 1, 2, 20, 28, 31	A	32

Polygonum lapathifolium (Veliki lisac)	J vlažno zemljište (16)	1,8-2,5 (14)	L > D (6)		5 (94 %) (18)	zračenje ne utiče na klijanje (1) klijanje inhibirano tamom (18) hladna stratifikacija (1) bez ikakve posebne obrade (5)	PRE & POST (6)	A, E	
Polygonum pennsylvanicum (/)	J polja, otvorena staništa (16)	3,6-7 (14, 29)		2 (29)		hladna stratifikacija u trajanju od 4 sedmice na 0 — 5 o C (1, 29) klijanje inhibirano tamom (1)	PRE (31)	A, E	
Polygonum periscaria (Mali lisac)	J narušena područja, oranice (16, 19)	2,1 - 2,3 (14, 19)	L > D (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	skarifikacija, hladna stratifikacija, tretiranje sa GA (14) hladna	POST (13)	A	32

						stratifikacija, dozrijevanje (17-19) klijanje inhibirano tamom (19) bez ikakve posebne obrade (13)			
Rumex crispus (Obični štavelj)	V oranice, pored puteva, otvorena područja (16, 19)	1,3-1,5 (4, 14, 19)	L = D (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 % (33)	klijanje inhibirano tamom (18, 19) dozrijevanje može biti neophodno (18) bez ikakve posebne obrade (4, 14, 33)	POST (4, 33)	A, E	32

PRIMULACEAE *Anagallis arvensis* (Crvena vidovčica)	J oranice, otvorena područja, narušena područja (16, 19)	0,4-0,5 (4, 14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	hladna stratifikacija, tretiranje sa GA (1,14, 18, 19, 32) za klijanje je potrebna svjetlost (1) bez ikakve posebne obrade (2, 4)	POST (2,4)	A, F	
RANUNCULACEAE *Ranunculus acris* (Brdski ljutid)	V oranice, pored puteva, otvorena područja (16, 19)	1,5-2 (14, 19, 29)	L = D (14)	1 (29)	41 -56 (19, 29)	bez ikakve posebne obrade (5, 14, 22, 24-26)	POST (5, 22, 24-26)		32

ROSACEAE *Geum urbanum* (Zečja stopa)	V žive ograde, vlažna područja (16, 19)	0,8 — 1,5 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	klijanje inhibirano tamom (18, 19) topla stratifikacija (1) bez ikakve posebne obrade (5, 14, 22, 25, 26)	POST (5, 22, 25, 26)	A	

RUBIACEAE *Galium aparine* (Divlji brod)	J oranice, vlažni predjeli, narušeni predjeli (16, 19)	7-9 (14, 19)	L = D (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	hladna stratifikacija (1, 18, 19) zračenje ne utiče na klijanje (18, 19) svjetlost inhibira klijanje (1)) bez ikakve posebne obrade (6, 14)	PRE & POST (6, 28)	A	32
Galium mollugo (Obična brodika)	V žive ograde, otvorena područja (8)	7 (29)	L = D (14)	2 (29)		bez ikakve posebne obrade (5, 14, 22, 24, 26, 29)	POST (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE *Digitalis purpurea* (Crveni naprstak)	D, V žive ograde, otvorena područja (16, 19)	0,1 -0,6 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	klijanje inhibirano tamom (1, 1719) bez ikakve posebne obrade (4, 22-26)	POST (4, 22—26)	D, G, F	
Veronica persica (persijska čestoslavica)	J oranice, otvorena područja, narušena	0,5-0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3(19) 5 (96 %) (18)	klijanje inhibirano tamom (18, 19) hladna stratifika	PRE & POST (28)	A	32

	područja (16, 19)					cija (18)) bez ikakve posebne obrade (14)			

(9) J = jednogodišnja biljka D = dvogodišnja biljka V = višegodišnja biljka.

(10) Reference 11, 14 i 33 odnose se na udio svjetlosti (L) i tame (D) potreban za podsticanje klijanja. Reference 3, 6, 9, 10, 13 i 20 odnose se na uslove uzgoja u staklenicima.

(11) 0 mm ukazuje na to da je sjeme posijano na površinu tla ili da mu je potrebna svjetlost da bi proklijalo.

(12) Navedeni brojevi označavaju broj dana potrebnih da proklija određeni procenat sjemena prema navedenoj referenci, npr. klijanje za tri dana (50 %) (referenca br. 19).

(13) Podaci o trajanju dozrijevanja i/ili stratifikaciji nijesu uvijek dostupni. Osim kad je potreban hladni tretman, temperaturni uslovi nijesu navedeni jer je pri ispitivanju u stakleniku kontrola temperature ograničena. Većina sjemena proklijaće uz normalne fluktuacije temperatura koje se javljaju u staklenicima.

(14) Ukazuje na to da je vrsta upotrijebljena u ispitivanju toksičnosti za biljke primjenom herbicida prije nicanja (PRE) i/ili nakon nicanja (POST). (15) Navodi se primjer(i) komercijalnih dobavljača sjemena.

(16) Navode se dva dodatna konsultovana izvora iz literature.

Dodatak 4

Primjeri odgovarajućih uslova rasta za određene poljoprivredne vrste

Sljedeći uslovi smatraju se pogodnim za 10 poljoprivrednih vrsta i mogu se koristiti i kao smjernica za ispitivanja u komorama za uzgoj na nekim drugim vrstama:

Koncentracija ugljendioksida: 350 ± 50 ppm;

Relativna vlažnost: 70 ± 5 % u periodima osvijetljenosti i 90 ± 5 % u periodima mraka;

Temperatura: 25 ± 3 °C u toku dana, 20 ± 3 °C u toku noći;

Fotoperiod: 16 sati svjetlosti/8 sati mraka, uz pretpostavku da prosječna talasna dužina iznosi od 400 do 700 nm;

Svjetlost: luminansa od 350 ± 50 µE/m2/s, mjereno na vrhu nadzemnog dijela biljke.

Poljoprivredne vrste su:

- paradajz (Solanum lycopersicon);
- krastavac (Cucumis sativus);
- zelena salata (Lactuca sativa);
- soja (Glycine max);
- kupus (Brassica oleracea var. capitata);
- šargarepa (Daucus carota); - zob (Avena sativa);

- običnи ljulj (Lolium perenne);
- kukuruz (Zea mays);

C.32. ISPITIVANJE REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI NA ENHITREJAMA

1. Uvod

Ova metoda ispitivanja ekvivalentna je smjernici OECD-a za ispitivanje (TG) 220 (2004). Namijenjena je da se koristi za procjenu efekata hemikalija na reproduktivnu uspješnost crva enhitreja, *Enchytraeus albidus* Henle 1873, u zemljištu. Razmotrene su I druge metode za ispitivanje toksičnosti hemikalija na enhitrejama i kišnim glistama.

1.1 Početna razmatranja

Člankoviti crvi koji žive u zemljištu i koji pripadaju rodu *Enchytraeus* ekološki su relevantne vrste za ekotoksikološka ispitivanja. Iako se enhitreje često nalaze u zemljištu u kojem ima i kišnih glista, tačno je i da ih često u velikom broju ima u mnogim zemljištima u kojima nema kišnih glista. Enhitreje se mogu koristiti u laboratorijaskim ispitivanjima kao i u poluterenskim i terenskim proučavanjima. S praktične tačke gledišta, mnoge vrste iz roda *Enchytraeus* jednostavne su za rukovanje i gajenje, a njihovo generacijsko vrijeme značajno je kraće od generacijskog vremena kišnih glista. Stoga trajanje ispitivanja reprodukcije kod enhitreja iznosi samo 4-6 sedmica, dok kod kišnih glista (*Eisenia fetida*) iznosi 8 sedmica.

1.2 Načelo ispitivanja

Odrasli crvi enhitreja izlažu se spektru koncentracija hemikalije koja se ispituje a koja je umiješana u vještačko zemljište. Ispitivanje se može podijeliti u dva koraka: (a) test za određivanje raspona, koji se radi u slučaju da nije dostupno dovoljno informacija, a u kojem je mortalitet glavni parameter praćenja koji se procjenjuje nakon izloženosti koja je trajala dvije sedmice i (b) glavno ispitivanje reproduktivne toksičnosti, u kojem se procjenjuju ukupan broj mladih koje je dala roditeljska životinja i preživljavanje roditeljskih životinja. Glavno ispitivanje traje šest sedmica. Nakon prve tri sedmice izvade se odrasli crvi i zabilježe morfološke promjene. Nakon još tri sedmice prebroje se potomci koji su se izlegli iz larvi koje su proizvele odrasle jedinke. Reproduktivna uspješnost životinja izloženih hemikaliji koja se ispituje upoređuje se sa reproduktivnoom uspješnošću kontrolne grupe ili grupa, kako bi se odredila (i) najveća koncentracija bez vidljivog efekta (NOEC) i/ili (ii) EC_x (npr. EC_{10}, EC_{50}) tako što se uz pomoć regresionog modela procijeni koncentracija koja bi dovela do x-procentnog smanjenja reproduktivne uspješnosti. Ispitne koncentracije treba da obuhvate EC_x (npr. EC_{10}, EC_{50}) tako da se EC_x dobije interpolacijom umjesto ekstrapolacijom.

1.3 Informacije o hemikaliji koja se ispituje

Ako je moguće, treba da se zna rastvorljivost u vodi, log K_{ow}, koeficijent raspodjele zemljište-voda (npr. poglavlje C.18 ili C.19 ovog Aneksa) i pritisak pare. Poželjno je znati i dodatne informacije o životnom ciklusu hemikalije u zemljištu, kao što je stopa fotolize i stopa hidrolize.

Ova metoda ispitivanja može se koristiti i za hemikalije koje su rastvorljive u vodi i za hemikalije koje nijesu rastvorljive u vodi. Međutiim, način unošenja hemikalije koja se ispituje će se shodno tome razlikovati. Ova metoda ispitivanja ne može se primijeniti na isparljive hemikalije, tj. na hemikalije za koje su Henrijeva konstanta ili koeficijent raspodjele vazduh-voda veći od jedan, ili na hemikalije čiji pritisak pare prekoračuje 0,0133 Pa na 25 °C.

1.4 Validnost ispitivanja

Da bi ispitivanje bilo validno, u kontrolnim grupama moraju biti zadovoljeni sljedeći kriterijumi performasi:

— mortalitet odraslih jedinki ne smije biti veći od 20 % na kraju testa za određivanje raspona i nakon prve tri sedmice ispitivanja reproduktivne toksičnosti.

— polazeći od pretpostavke da je za pripremanje ispitivanja korišćeno 10 odraslih jedinki po posudi, na kraju ispitivanja mora biti najmanje 25 mladih jedinki po posudi.

— koeficijent varijacije oko srednje vrijednosti broja mladih jedinki ne smije biti veći od 50% na kraju ispitivanja reproduktivne toksičnosti.

Ako ispitivanje ne ispunjava gore navedene kriterijume validnosti, ispitivanje treba prekinuti izuzev ako se može dati obrazloženje opravdanosti nastavka ispitivanja. Izvještaj o ssprovedenom ispitivanju treba da sadrži to obrazloženje.

1.5 Referentna hemikalija

Referentnu hemikaliju treba testirati u redovnim vremenskim razmacima ili je uvrstiti u svako ispitivanje kako bi se utvrdilo da se tokom vremena odgovor ispitnih organizama nije značajno promijenio. Pogodna referentna hemikalija je karbendazim, za koji se pokazalo da utiče na preživljavanje i razmnožavanje enhitreja, ili se mogu koristiti i druge hemikalije čija je toksičnost dobro poznata. U međulaboratorijaskom uporednom ispitivanju korišćena je formulacija karbendazima poznata pod trgovačkim nazivom Derosal™, koju isporučuje AgrEvo Company (Frankfurt, Njemačka) i koja sadrži 360 g/l (32,18 %) aktivnog sastojka. Vrijednost EC_{50} za reprodukciju, određena u međulaboratorijaskom uporednom ispitivanju, kretala se u granicama 1,2 ± 0,8 mg aktivnog sastojka (a.i) /kg suve mase (2). Ako se u ispitni niz uvrsti pozitivni standard toksičnosti, tada se koristi jedna koncentracija, a broj ponavljanja treba da bude isti kao u kontrolnim grupama. Za karbendazim se preporučuje ispitivanje sa 1,2 mg a.i./kg suve mase (ispitano u obliku tečne formulacije).

2. Opis ispitivanja

Oprema

Ispitne posude treba da budu izrađene od stakla ili nekog drugog hemijski inertnog materijala. Pogodne su staklene tegle (npr. zapremine: 0,20 - 0,25 litara; prečnika: ≈ 6

cm). Posude treba da imaju providne poklopce (npr. staklene ili od polietilena) koji su napravljeni tako da smanjuju isparavanje vode dok istovremeno omogućavaju razmjenu gasova između zemlje i atmosfere. Poklopci treba da su providni kako bi propuštali svjetlost.

Potrebna je uobičajena laboratorijaska oprema, a naročito sljedeće:

— ormar za sušenje;

— stereomikroskop;

— pH-metar i fotometar;

— odgovarajuće precizne vage;

— odgovarajuća oprema za kontrolisanje temperature;

— odgovarajuća oprema za kontrolisanje vlažnosti (nije od suštinske važnosti ako posude imaju poklopce);

— inkubator ili mala soba sa klima-uređajem;

— pincete, kuke ili petlje;

— kada za razvijanje fotografija.

Pripremanje vještačke zemlje

U ovom ispitivanju koristi se vještačka zemlja sljedećeg sastava (na osnovu suve 11 mase, sušene na 105°C do dobijanja stalne mase): .

— 10 % sfagnum treseta, osušenog na vazduhu i sitno mljevenog (veličina čestice od 2 ± 1 mm je prihvatljiva); preporučuje se da se provjeri da li je zemlja pripremljena sa svježom šaržom treseta pogodna za uzgajanje crva prije nego što se upotrijebi u ispitivanju;

— 20 % kaolinske gline (pri čemu je poželjno da sadržaj kaolinita bude iznad 30 %);

— oko 0,3 do 1,0 % kalcijum karbonata ($CaCO_3$, sprašenog, analitičkog stepena čistoće) kako bi se dobila pH vrijednost od 6,0 ± 0,5; količina kalcijum karbonata koju treba dodati zavisi prevashodno od kvaliteta/prirode treseta;

— oko 70 % kvarcnog pijeska osušenog na vazduhu (u zavisnosti od potrebne količine $CaCO_3$), pretežno sitnog pijeska sa više od 50 % čestica veličine između 50 i 200 mikrona.

Preporučljivo je da se dokaže pogodnost vještačke zemlje za uzgajanje crva i za postizanje kriterijuma validnosti ispitivanja prije nego što se ta zemlja upotrijebi u glavnom ispitivanju. Naročito se preporučuje da se takva provjera izvrši kako bi se sa sigurnošću utvrdilo da uspješnost ispitivanja neće biti ugrožena ukoliko se smanji sadržaj organskog ugljenika u vještačkoj zemlji, npr. smanjivanjem sadržaja treseta na 4-5% i odgovarajućim povećavanjem sadržaja pijeska. Takvim smanjivanjem sadržaja organskog ugljenika može se smanjiti mogućnost adsorpcije hemikalije koja se ispituje u zemlju, pa se može povećati dostupnost ispitivane hemikalije crvima. Pokazano je da *Enchytraeus albidus* može ispuniti kriterijume validnosti koji se odnose na reproduktivnost kada se ispitivanje vrši u zemlji uzetoj sa terena čiji je sadržaj organskog ugljenika niži od gore pomenutog (npr. 2,7 %) (15), a postoji iskustvo – mada neveliko – da se to može postići i u vještačkoj zemlji sa 5% treseta.

Napomena: Ako se u dodatnom ispitivanju (npr. višeg nivoa) koristi prirodna zemlja, potrebno je pokazati da je ta zemlja pogodna i da su zadovoljeni kriterijumi validnosti ispitivanja.

Dobro se izmiješaju suvi sastojci tla (npr. u velikom laboratorijaskom mikseru). To treba u početka ispitivanja. Izmiješanu zemlju treba odložiti da odstoji dva dana kako bi se određivanje pH vrijednosti koristi se smješa zemlje i 1 M rastvora kalijum hlorida (KCl) odnosi 1:5 (v. (16) i Dodatak 3). Ako je kiselost zemljišta iznad traženog raspona (dodavanjem odgovarajuće količine $CaCO_3$. Ako je zemlja previše bazna, ali bez $CaCO_3$.

Maksimalni kapacitet vještačke zemlje za vodu (WHC) određuje se u skladu sa pokolonama opisanim u Dodatku 2. Jedan ili dva dana prije početka ispitivanja, suva vještačka zemlja navlaži se dodavanjem dejonizovane vode u količini dovoljnoj da se dobije oko polovine konačne sadržine vode, tj. 40 do 60% od maksimalnog kapaciteta za vodu. Na početku ispitivanja, prethodno navlažena zemlja dijeli se na onoliko djelova koliko je ispitnih koncentracija (prema potrebi uključujući i referentnu hemikaliju) i kontrolnih grupa koje se koriste u ispitivanju. Sadržaj vlage koriguje se na 40-60% maksimalnog kapaciteta za vodu dodavanjem rastvora hemikalije koja se ispituje i/ili dodavanjem destilovane ili dejonizovane vode (v. st. 19-21). Sadržaj vlage određuje se

na početku i na kraju ispitivanja (sušenjem na 105 °C do dobijanja konstantne mase) i ona treba da bude u okviru optimalnog raspona za preživljavanje crva. Gruba provjera sadržaja vlage u zemlji može se izvršiti tako što se zemlja uzme u ruku i blago stisne:
ako je sadržaj vlage odgovarajući, trebalo bi da se između prstiju pojave male kapi vode.

Biranje i pripremanje ispitnih životinja

Preporučena ispitna vrsta je *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (bijeli crv), koji pripada porodici *Enchytraeidae* (red *Oligochaeta*, razdio *Annelida*). *E. albidus* je jedna od najvećih vrsta enhitreja, sa zabilježenom dužinom primjerka od 35 mm. *E. albidus* rasprostranjena je širom svijeta i može se naći u morskim, slatkovodnim i kopnenim staništima, uglavnom u organskoj materiji koja se raspada (morski korov, kompost) a rijetko na livadama. Njena široka ekološka tolerancija i neke morfološke varijacije mogu biti pokazatelj postojanja različitih rasa.

E. albidus je komercijalno dostupna, u obliku hrane za ribe. Potrebno je provjeriti da li je kultura kontaminirana drugim, obično sitnijim vrstama (1) (19). Ako je došlo do kontaminacije, sve crve treba oprati vodom u petrijevoj šolji. Zatim treba odabrati velike odrasle primjerke *E. albidus* (uz pomoć stereomikroskopa) da bi se započela nova kultura, a sve ostale crve treba odbaciti.*E. albidus* se može lako gajiti u širokom spektru organskih materijala (v. Dodatak 4).Životni ciklus *E. albidus* je kratak pošto zrelost dostiže poslije 33 (na temperaturi od 18 °C) i 74 dana (na temperaturi od 12 °C) (1). Za ispitivanje se koriste samo one kulture koje su u laboratorijai držane bez problema najmanje 5 sedmica (jedna generacija).

Druge vrste roda *Enchytraeus* su takođe prikladne, npr. *E. buchholzi* Vejdovski 1879 ili *E. crypticus* Westheide & Graefe 1992 (v. Dodatak 5). Ako se koriste druge vrste *Enchytraeus*, moraju se jasno identifikovati i navesti obrazloženje za izbor.

Životinje koje se koriste u ispitivanjima su odrasli crvi. Oni treba da imaju jajašca (bijele tačkice) u zoni kliteluma i da budu približno iste veličine (dužine oko 1 cm). Sinhronizacija uzgajane kulture nije neophodna.

Ako enhitreje nijesu uzgajane u istoj vrsti zemlje i pod uslovima (uključujući ishranu) koji su korišćeni za glavno ispitivanje, moraju se aklimatizovati u trajanju od najmanje 24 sata pa do tri dana. Potrebno je na početki aklimatizovati veći broj odraslih jedinki nego što ih je potrebno za izvođenje ispitivanja, kako bi se ostavilo prostora za odbacivanje oštećenih ili iz drugog razloga neodgovarajućih primjeraka. Na kraju perioda aklimatizacije, za ispitivanje se biraju samo oni crvi koji u sebi imaju jajašca i ne pokazuju nikakve abnormalnosti u ponašanju (npr. pokušaj bježanja iz zemlje). Crvi se pažljivo izvade uz pomoć juvelirskih pinceta, kuka ili petlji i stave u petrijevu šolju u kojoj se nalazi mala količina svježe vode. Za ovu svrhu prednost se daje obrađenoj svježoj vodi, kako je predloženo u poglavlju C.20 ovog Aneksa (Ispitivanje reproduktivne toksičnosti na vrsti *Daphnia magna*), pošto bi dejonizovana, demineralizovana ili voda sa slavine mogla biti štetna za crve. Crvi se pregledaju pod stereomikroskopom i odbacuju se svi oni koji ne sadrže jajašca. Vodi se računa o tome da se izvade i bace sve grinje ili *collembola* koji su eventualno inficirali kulture. Zdravi crvi koji nijesu upotrijebljeni za ispitivanje vraćaju se u početnu kulturu.

Pripremanje ispitnih koncentracija

Ispitivana hemikalija rastvorljiva u vodi

Rastvor hemikalije koja se ispituje priprema se u dejonizovanoj vodi u količini dovoljnoj sva ponavljanja jedne ispitne koncentracije. Preporučuje se da se koristi odgovaraju količina

vode kako bi se postigao traženi sadržaj vlage, tj. 40 do 60 % maksimaln kapaciteta za vodu. Svaki rastvor hemikalije koja se ispituje dobro se promije sa jednom šaržom prethodno navlažene zemlje prije nego što se uspe u ispitnu posudu.

Ispitivana hemikalija nerastvorljiva u vodi

Kada se radi o hemikalijama koje nijesu rastvorljive u vodi ali su rastvorljive u organskim rastvaračima, hemikalija koja se ispituje može se rastvoriti u najmanjoj mogućoj količini odgovarajućeg nosača (npr. acetona). Treba koristiti samo isparljive rastvarače. Nosač se naprska ili se pomiješa sa malom količinom, na primjer 2,5 g, sitnog kvarcnog pijeska. Nosač se odstranjuje isparavanjem ispod laboratorijaske kapele u trajanju od najmanje jednog sata. Ta smješa kvarcnog pijeska i hemikalije koja se ispituje dodaje se u prethodno navlaženu zemlju i dobro izmiješa nakon što se doda odgovarajuća količina dejonizovane vode, kako bi se dobila tražena vlažnost. Konačna smješa usipa se u ispitne posude.

Kada se radi o hemikalijama koje su slabo rastvorljive u vodi i u organskim rastvaračim ekvivalent od 2,5 g sitno mljevenog kvarcnog pijeska po ispitnoj posudi pomiješa se hemikalijom koja se ispituje u količini potrebnoj da se dobije željena ispitna koncentrac Ta smješa kvarcnog pijeska i hemikalije koja se ispituje dodaje se u prethodno navlaže zemlju i sve se dobro izmiješa nakon što se doda odgovarajuća količina dejonizovane vo kako bi se dobilo traženi sadržaj vlage. Konačna smješa podijeli se u ispitne posu Postupak se ponavlja za svaku ispitnu koncentraciju, a priprema se i odgovarajuća kontro grupa. Hemikalije obično ne bi trebalo ispitivati u koncentracijama većim od 1000 mg suve mase zemlje. Međutim, primjena većih koncentracija može biti potrebna zbog cilje nekog posebnog ispitivanja.

2.1 IzvoĐenje testova

Ispitne grupe i kontrole

Za svaku ispitnu koncentraciju u ispitnu posudu stavlja se količina ispitnog zemljišta koja odgovara količini od 20 g suve mase (v. st. 19 – 21). Pripremaju se i kontrole bez ispitivane hemikalije. U svaku posudu dodaje se hrana u skladu sa pokolonama Deset crva se nasumično raspoređuje u svaku ispitnu posudu. Crvi se pažljivo prenose u svaku ispitnu posudu i smještaju na površinu zemljišta pomoću npr. juvelirske pincete, kuke ili petlje. Broj ponavljanja za ispitne koncentracije i kontrole zavisi od primijenjenog plana ispitivanja. Ispitne posude nasumično se raspoređuju u ispitni inkubator i njihov položaj se nasumično mijenja svake nedjelje.

Ako se za aplikovanje ispitne hemikalije koristi vehikulum, uz ispitni niz treba uvesti i kontrolni niz koji sadrži kvarcni pijesak poprskan rastvaračem ili pomiješan sa njim. Koncentracija rastvarača ili sredstva za dispergovanje mora biti jednaka koncentraciji koja se koristi u ispitnim posudama koje sadrže hemikaliju koja se ispituje. Kontrolni niz koji sadrži dodatni kvarcni pijesak (2,5 g po posudi) uvodi se za hemikalije koje se moraju primijeniti u skladu sa pokolonama.

Uslovi ispitivanja

Temperatura na kojoj se vrši ispitivanje iznosi 20 ± 2 °C. Kako bi se onemogućilo bježanje crva iz zemljišta, ispitivanje se izvodi u kontrolisanim ciklusima naizmjeničnog izlaganja svjetlosti i mraku (po mogućnosti 16 sati svjetlosti i 8 sati mraka), pri osvijetljenosti od 400 do 800 luksa na mjestu ispitnih posuda.

Radi provjere vlažnosti zemljišta, posude se vagaju na početku ispitivanja, a zatim jednom sedmično. Gubitak na masi nadoknaĐuje se dodavanjem odgovarajuće količine dejonizovane vode. Potrebno je napomenuti da nedostatak vode može da se smanji održavanjem visoke vlažnosti vazduha (> 80%) u ispitnom inkubatoru.

Sadržaj vlage i pH vrijednost moraju se izmjeriti na početku i na kraju ispitivanja kojim se određuje oblast koncentracija i na početku i na kraju glavnog ispitivanja. Potrebno je izvršiti mjerenja u kontrolnim i tretiranim (sve koncentracije) uzorcima zemljišta koji su pripremljeni i održavani na isti način kao i ispitivane kulture, ali u kojima nema crva. Hrana se u tim uzorcima zemljišta dodaje samo na početku ispitivanja da bi se omogućila mikrobna aktivnost. Količina hrane koja je dodata treba da je ista kao i količina koja je dodata ispitnim kulturama. Nije potrebno više dodavati hranu u te posude tokom ispitivanja.

Davanje hrane

Koristi se hrana kojom je moguće održavati populaciju enhitreja. Kao odgovarajuća hrana pokazao se valjani ovas koji je, po mogućnosti, prije upotrebe sterilisan u autoklavu da bi se izbjegla kontaminacija mikroorganizmima (može se primijeniti i sterilizacija toplotom).

Hrana se isprva daje tako što se 50 mg mljevenog valjanog ovsa miješa sa zemljištem u svakoj posudi prije unošenja crva. Nakon toga hrana se daje svake sedmice do dvadeset prvog dana. Hranjenje se ne vrši dvadeset osmog dana iz razloga što su odrasle jedinke u toj fazi uklonjene, dok mlade jedinke nakon toga zahtijevaju relativno malo dodatne hrane. Tokom ispitivanja hranjenje podrazumijeva davanje 25 mg mljevenog valjanog ovsa po posudi, koji se pažljivo stavlja na površinu zemljišta da bi se izbjeglo povrjeĐivanje crva. Da bi se smanjio rast gljivica, pahuljice ovsa potrebno je prekriti malom količinom zemljišta. Ako hrana ostane nepojedena, potrebno je smanjiti porcije hrane.

Plan ispitivanja za određivanje oblasti koncentracija

Kada je potrebno, sprovodi se ispitivanje za određivanje oblasti koncentracija i to sa npr. pet hemijskih koncentracija od 0,1, 1,0, 10, 100 i 1 000 mg/kg (suve mase zemljišta). Dovoljno je jedno ponavljanje svakog tretmana i kontrole.

Ispitivanje u kojem se određuje oblast koncentracija vrši se dvije sedmice. Na kraju ispitivanja, procjenjuje se smrtnost crva. Crv se evidentira kao mrtav ako mehanički podsticaj njegovog prednjeg dijela tijela ne proizvodi reakciju. Osim podataka o smrtnosti, i drugi podaci mogu biti od koristi prilikom odlučivanja o oblasti koncentracija koja će se primjenjivati u glavnom ispitivanju. Potrebno je evidentirati promjene u ponašanju odraslih jedinki (npr. nemogućnost da se ukopavaju u zemljište; nepomično ležanje uz stakleni zid ispitne posude) i promjene u morfologiji (npr. pojavu otvorenih rana), kao i prisustvo mladih jedinki. Prisustvo mladih jedinki može se utvrditi primjenom metode bojenja koja je opisana u Dodatku 6.

Moguće je približno odrediti vrijednost LC_{50} iizračunavanjem geometrijske sredine podataka o smrtnosti. Pri odreĐivanju oblasti koncentracija za potrebe glavnog ispitivanja, podrazumijeva se da su efekti na reprodukciju niži od vrijednosti LC_{50} za faktor koji nije veći od 10. Radi se, međutiim, o empirijskom odnosu koji može biti različit u svakom pojedinačnom slučaju. Dodatna zapažanja tokom ispitivanja za određivanje oblasti koncentracija, kao što je prisustvo mladih jedinki, mogla bi da pomognu da se preciznije odredi oblast koncentracija ispitivane hemikalije koja će se primjenjivati u glavnom ispitivanju.

Radi tačnog utvrĐivanja vrijednosti LC_{50}, preporučuje se da se ispitivanje izvodi sa najmanje četiri ponavljanja za svaku koncentraciju ispitivane hemikalije i sa odgovarajućim brojem koncentracija sa ciljem da se postignu najmanje četiri statistički značajno različita srednja odgovora. Sličan broj koncentracija i ponavljanja primjenjuje se i za kontrole, ako ih je moguće primijeniti.

Plan glavnog ispitivanja reproduktivne toksičnosti

Na osnovu preporuka do kojih se došlo u uporednom ispitivanju predlažu se tri plana:

— Za utvrĐivanje vrijednosti NOEC, mora se izvršiti ispitivanje najmanje pet koncentracija u

geometrijskom nizu. Preporučuju se četiri ponavljanja za svaku ispitnu koncentraciju i još osam kontrola. Koncentracije bi trebalo da se razlikuju za faktor koji nije veći od 1,8.

— Za utvrĐivanje vrijednosti EC_x (npr. EC_{10}, EC_{50}) potrebno je ispitati najmanje pet koncentracija koje uključuju vrijednost EC_x kako bi se EC_x mogla predvidjeti interpolacijom, a ne ekstrapolacijom. Preporučuju se najmanje četiri ponavljanja za svaku ispitnu koncentraciju i četiri kontrolna ponavljanja. Faktor razmaka može da varira, odnosno može iznositi 1,8 ili manje u oblasti koncentracija pri kojima se očekuje da će doći do odgovora ili može iznositi iznad 1,8 pri nižim ili višim koncentracijama.

— Kombinovani pristup predviĐa utvrĐivanje i vrijednosti NOEC i vrijednosti EC_x. Potrebno je primijeniti osam ispitnih koncentracija u geometrijskom nizu. Preporučuju se četiri ponavljanja za svaki tretman i osam kontrola. Koncentracije treba da se razlikuju za faktor koji nije veći od 1,8.

Potrebno je upotrijebiti deset odraslih jedinki crva po ispitnoj posudi. Hrana se u ispitne posude dodaje na početku ispitivanja, a zatim jednom sedmično zaključno sa dvadeset prvim danom. Dvadeset prvog dana uzorci zemljišta pažljivo se pretražuju rukom i žive odrasle jedinke se posmatraju i broje, a zatim se i evidentiraju promjene u njihovom ponašanju (npr. nemogućnost ukopavanja u zemlju; nepomično ležanje uz stakleni zid ispitne posude), kao i promjene u morfologiji (npr. pojava otvorenih rana). Sve odrasle jedinke crva se zatim uklanjaju iz ispitnih posuda i ispitnog zemljišta. Ispitno zemljište u kome se nalaze kokoni inkubira se još tri sedmice pod istim uslovima ispitivanja, s tim što se hrana daje samo trideset petog dana (25 mg mljevenog valjanog ovsa po posudi).

Nakon šest nedjelja prebrojavaju se novoizlegli crvi. Preporučuje se metoda bojenja bengalskim crvenilom (v. Dodatak 6), premda se pokazalo da se u tu svrhu mogu

primijeniti i druge tehnike ekstrakcije i flotacije (u mokrim uslovima, ali ne i postupkom izlaganja toploti) (v. Dodatak 6). Preporučuje se bojenje bengalskim crvenilom, zato što postupak ekstrakcije u mokrim uslovima može ometati zamućenost koja se javlja zbog suspendovanih čestica gline.

Granično ispitivanje

Ukoliko pri najvišoj koncentraciji (npr. 1 000mg/kg) na ispitivanju za određivanje oblasti koncentracija nema vidljivog odgovora, test reproduktivne toksičnosti može se izvesti kao granično ispitivanje pri čemu se koristi 1 000 mg/kg kako bi se pokazalo da je vrijednost NOEC za reprodukciju viša od te vrijednosti.

Sumarni pregled i raspored ispitivanja

Postupak ispitivanja može se sažeto izložiti na sljedeći način:

Vrijeme	Ispitivanje za određivanje oblasti koncentracija	Glavno ispitivanje
Dan –7. ili ranije	— Priprema vještačkog zemljišta (miješanje suvih sastojaka)	—Priprema vještačkog zemljišta (miješanje suvih sastojaka)
Dan –5.	— Provjera pH vrijednosti vještačkog zemljišta	—Provjera pH vrijednosti vještačkog zemljišta
	— Mjerenje maksimalnog WHC zemljišta	—Mjerenje maksimalnog WHC zemljišta
Dan –5. do –3.	— Klasifikovanje crva za aklimatizaciju	—Klasifikovanje crva za aklimatizaciju
Dan — 3 do 0	— Aklimatizacija crva u trajanju od najmanje 24 sata	—Aklimatizacija crva u trajanju od najmanje 24 sata

Dan –1.	— Prethodno vlaženje vještačkog zemljišta i raspoređivanje u šarže	—Prethodno vlaženje vještačkog zemljišta i raspoređivanje u šarže
Dan 0.	— Priprema osnovnog rastvora —Primjena ispitivane hemikalije — Odmjeravanje ispitnog supstrata u ispitne posude — Miješanje hrane — Unošenje crva — Mjerenje pH vrijednosti zemljišta i sadržaja vlage	—Priprema osnovnog rastvora — Primjena ispitivane hemikalije —Odmjeravanje ispitnog supstrata u ispitne posude —Miješanje hrane —Unošenje crva —Mjerenje pH vrijednosti zemljišta i sadržaja vlage
Dan 7.	— Provjera sadržaja vlage u zemljištu	—Provjera sadržaja vlage u zemljištu —Davanje hrane
Dan 14.	— UtvrĐivanje smrtnosti odraslih jedinki	—Provjera sadržaja vlage u

	— Procjena broja mladih jedinki — Mjerenje pH vrijednosti zemljišta i sadrţaja vlage	zemljištu — Davanje hrane
Dan 21.		— Posmatranje ponašanja odraslih edinki — Uklanjanje odraslih jedinki — UtvrĊivanje smrtnosti odraslih jedinki — Provjera sadrţaja vlage u zemljištu — Davanje hrane
Dan 28.		— Provjera sadrţaja vlage u zemljištu — Bez dodavanja hrane
Dan 35.		— Provjera sadrţaja vlage u zemljištu — Davanje hrane
Dan 42.		— Prebrojavanje mladih jedinki crva — Mjerenje pH vrijednosti i sadrţaja vlage u zemljištu

3. Podaci i izvještaji

Obrada rezultata

Premda je u Dodatku 7 dat opšti pregled, ova metoda ispitivanja ne nudi konačnu statističku smjernicu za analizu rezultata ispitivanja.

U ispitivanju za određivanje oblasti koncentracija, glavni parametar praćenja predstavlja smrtnost. Promjene u ponašanju odraslih jedinki crva (npr. nemogućnost ukopavanja u zemljište; nepomično ležanje uz stakleni zid ispitne posude) i promjene u morfologiji (npr. pojavu otvorenih rana) potrebno je evidentirati zajedno sa prisustvom mladih jedinki. Da se odredi vrijednost LC_{50}, uobičajeno se primjenjuju probit analiza ili logistička regresija. U slučajevima kada te metode analize nisu odgovarajuće (npr. u slučaju kada se rapolaže sa manje od tri koncentracije koje djelimično uzrokuju smrtnost), moguće je primijeniti alternativne metode. Te metode mogu obuhvatiti metodu pokretnih prosjeka, modifikovanu Spirman-Karberovu metodu (trimmed Spearman-Karber method) ili prostu interpolaciju (npr. geometrijski prosjek LC_0 i LC_{100} koji se dobija množenjem kvadratnog korijena vrijednosti LC_0 sa LC_{100}). U glavnom ispitivanju, parametar praćenja čini fekunditet (tj. broj izleglih mladih jedinki). Međutiim, kao i u ispitivanju za određivanje oblasti koncentracije, i ovdje bi u završnom izvještaju trebalo evidentirati i sve druge pokazatelje štetnih uticaja. Za obradu podataka koji se tiču reprodukcije, statistička analiza iziskuje poznavanje aritmetičke sredine i standardne devijacije po tretmanu i po kontroli.

Ako je obavljena analiza varijanse, standardna devijacija, s, i broj stepeni slobode, df, mogu se zamijeniti objedinjenom procjenom varijanse dobijenom metodom ANOVA i njenim stepenima slobode – pod uslovom da varijansa ne zavisi od koncentracije. U tom slučaju koriste se pojedinačne varijanse kontrole i tretmana. Te vrijednosti uglavnom se iizračunavaju pomoću komercijalnog statističkog programa, pri čemu se rezultati po posudi uzimaju kao ponavljanja. Ako se čini logičnijim objediniti podatke za negativnu kontrolu i kontrolu sa rastvaračem nego vršiti ispitivanje u odnosu na samo jednu od tih kontrola, te je podatke potrebno ispitati da bi se utvrdilo da se značajno ne razlikuju.

Dalje statističko ispitivanje i zaključivanje zavise od toga da li su vrijednosti dobijene iz ponavljanja normalno distribuirane i da li su njihove varijanse homogene.

Procjena vrijednosti NOEC

Daje se prednost primjeni snažnih testova. Da bi se znalo da li su podaci otprilike normalno distribuirani, potrebno je koristiti podatke iz npr. prethodnog iskustva iz uporednog ispitivanja ili podatke iz ranije izvoĐenih ispitivanja. Značajnija je homogenost varijanse (homoskedastičnost). Iskustvo govori da varijansa često raste sa porastom srednje vrijednosti. U tim slučajevima do homoskedastičnosti se može doći transformacijom podataka. Međutiim, tu transformaciju trebalo bi zasnovati na podacima iz ranijih ispitivanja, a ne na podacima koji se istražuju. Na osnovu homogenih podataka potrebno je izvršiti t-testove višestrukog poreĐenja kao što je Vilijamsov test (Williams' test) (α = 0,05, jednosmjerni) ili Danetov test (Dunnett's test) u pojedinim slučajevima. Treba napomenuti da se, u slučaju nejednake replikacije, tablične t-vrijednosti moraju korigovati na način kako to predlažu Danet i Vilijams. Ponekad zbog velike varijacije, ne dolazi do redovnog povećanja/smanjenja odgovora. U slučaju takvog velikog odstepena od monotoničnosti, podesniji je Danetov test. Ukoliko postoje odstepena od homoskedastičnosti, opravdano je da se detaljnije istraže mogući efekti na varijanse da bi se donijela odluka o tome da li se t-testovi mogu primijeniti, a da značajnije ne izgube

na snazi. Alternativno se mogu primijeniti višestruki U-test (a multiple U-test), Bonferonijev U-test (Bonferroni-U-test) prema Holmu ili, onda kada podaci pokazuju heteroskedastičnost, ali se inače slažu sa osnovnim monotoničnim odnosom doze i odgovora, drugi neparametrijski testovi [npr. Džonkhir-Terpstra test (JonckheereTerpstra) ili Širlijev test (Shirley)] kojima se uobičajeno daje prednost u odnosu na ttestove za nejednake varijanse (v. šemu u Dodatku 7).

Ako je izvedeno granično ispitivanje i ako su ispunjeni svi preduslovi za izvođenje parametrijskih testova (normalnost, homogenost), moguće je primijeniti Studentov t-test za parove podataka ili u drugim slučajevima Man-Vitnijev U-test (the Mann-Whitney-Utest procedure).

Procjena vrijednosti EC_x

Za iizračunavanje bilo koje vrijednosti EC_x, za regresionu analizu (linearnu ili nelinearnu) primjenjuju se srednje vrijednosti po tretmanu i to nakon što se dobije odgovarajuća funkcija doza-odgovor. Za rast crva u smislu kontinuiranog odgovora, vrijednosti EC_x procjenjuju se pomoću odgovarajuće regresione analize. MeĐu odgovarajućim funkcijama za kvantalne podatke (smrtnost/preživljavanje i broj izleglih mladih jedinki) nalaze se normalna sigmoidna funkcija, logistička ili Vejbulova (Weibull) funkcija sa dva do četiri parametra, a neke od njih mogu prikazati hormetičke odgovore. Ako je funkcija doza-odgovor prilagođena linearnom regresionom analizom, regresionom analizom treba da se odredi i značajni r^2 (koeficijent determinacije) i/ili nagib prije procjene vrijednosti EC_x tako što će se u jednačinu koja se dobije regresionom analizom unijeti vrijednost koja odgovara x-procentnoj kontrolnoj srednjoj vrijednosti. Granice povjerenja od 95% iizračunavaju se prema Fieleru (Fieller) (citirano prema Finiju (Finney)) ili pomoću drugih odgovarajućih modernih metoda.

Alternativno, odgovor se prikazuje kao procenat ili dio parametra modela koji se tumači kao kontrolni srednji odgovor. U tim slučajevima, normalna (logistička, Vejbulova) sigmoidna kriva često može lako da se prilagodi rezultatima uz pomoć postupka probit regresije. Tada i funkcija ponderisanja mora da se prilagodi za metričke odgovore na način koji je prikazan kod Kristensena (Christensen). Međutiim, ako se uoči hormeza, probit analizu trebalo bi zamijeniti četiri-parametarskom logističkom ili Vejbulovom funkcijom prilagođenom nelinearnom regresijom. Ako odgovarajuća doza-odgovor funkcija ne može da se prilagodi podacima, za procjenu EC_x i njenih granica povjerenja mogu se koristiti alternativne metode kao što su metoda pokretnih prosjeka prema Tompsonu i modifikovana Spirman- Karberova metoda.

Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju mora obuhvatiti sljedeće informacije:

Ispitivana hemikalija:

— fizičko stanje i, tamo gdje je od značaja, fizička i hemijska svojstva (npr. rastvorljivost u vodi, napon pare);

— hemijsku identifikaciju ispitivane hemikalije po IUPAC nomenklaturi, broj CAS, šaržu, seriju, strukturnu formulu i čistoću;

—rok trajanja uzorka.

Ispitne vrste:

— korišćene ispitne životinje: vrsta, naučno ime, izvor organizama i uslovi uzgoja..

Uslovi ispitivanja:

—sastojke i pripremu vještačkog zemljišta;

—metodu primjene ispitivane hemikalije;

— opis uslova ispitivanja, uključujući temperaturu, sadržaj vlage, pH vrijednost, itd; — kompletan opis plana eksperimenta i eksperimentalnih procedura.

Rezultati ispitivanja:

— smrtnost odraslih jedinki crva poslije dvije sedmice i broj mladih jedinki na kraju testa za određivanje oblasti koncentracija;

— smrtnost odraslih jedinki crva poslije tri sedmice izloženosti i potpunu evidenciju o mladim jedinkama na kraju glavnog ispitivanja;

— sve uočene fizičke ili patološke simptome i biheviоralne promjene kod ispitih životinja;

— vrijednosti LC_{50}, NOEC i/ili EC_x (npr. EC_{50}, EC_{10}) za reprodukciju, ako se neke od njih mogu primijeniti, sa intervalima povjerenja, i dijagram prilagoĐenog modela koji je korišćen za njihovo iizračunavanje i sve podatke i zapažanja korisna za tumačenje rezultata.

Odstepena od procedura koje su opisane u ovoj ispitnoj metodi i sve neuobičajene pojave za vrijeme ispitivanja.

Dodatak 1

Značenje izraza

Za potrebe ove ispitne metode podrazumijeva se da je:

Hemikalija – supstanca ili smješa,

EC_x (koncentracija povezana sa x% odgovora) - koncentracija koja proizvodi x% efekta na ispitnim organizmima u toku datog vremena izlaganja u poreĐenju sa kontrolom. U ovom

ispitivanju, koncentracije s efektom iskazuju se kao masa ispitivane hemikalije po suvoj masi ispitnog zemljišta,

LC_0 (neletalna koncentracija) – koncentracija ispitivane hemikalije koja ne uzrokuje smrt nijednog izloženog ispitnog organizma u toku datog vremenskog perioda. U ovom ispitivanju, LC_0 se iskazuje kao masa ispitivane hemikalije po suvoj masi ispitivanog zemljišta,

LC_{50} (srednja letalna koncentracija) – koncentracija ispitivane hemikalije koja uzrokuje smrt kod 50% izloženih ispitnih organizama u toku datog vremenskog perioda. U ovom ispitivanju, LC_{50} se iskazuje kao masa ispitivane hemikalije po suvoj masi ispitnog zemljišta,

LC_{100} (apsolutna letalna koncentracija) – koncentracija ispitivane hemikalije koja uzrokuje smrt kod 100% izloženih organizama u toku datog vremenskog perioda. U ovom ispitivanju, LC_{100} se iskazuje kao masa ispitivane hemikalije po suvoj masi ispitnog zemljišta,

LOEC (najniža koncentacija sa vidljivim efektom) – najniža koncentracija ispitivane hemikalije sa statistički značajnim efektom ($p < 0,05$). U ovom ispitivanju, LOEC se iskazuje kao masa ispitivane hemikalije po suvoj masi ispitnog zemljišta. Po pravilu, sve ispitne koncentracije iznad LOEC-a treba da proizvode efekat koji se statistički razlikuje od kontrole. Sva odstepena od navedenog pri odreĐivanju LOEC-a moraju se obrazložiti u izvještaju o ispitivanju,

NOEC (koncentracija bez vidljivog efekta) – najviša koncentracija ispitivane hemikalije bez vidljivog efekta odmah ispod najniže koncentracije sa vidljivim efektom. U ovom ispitivanju, koncentracija koja odgovara NOEC-u nema statistički značajan efekat ($p < 0,05$) u toku datog vremena izlaganja u poreĐenju sa kontrolom,

stopa reprodukcije – srednji broj mladih jedinki crva izleglih od broja odraslih jedinki u toku ispitnog vremena,

stopa reprodukcije – srednji broj mladih jedinki crva po datom broju odraslih jedinki nastao za vrijeme ispitnog perioda, **ispitivana hemikalija** – svaka supstanca ili smješa koja se ispituje pomoću ove metode.

Dodatak 2

Određivanje maksimalnog vodnog kapaciteta

Određivanje vodnog kapaciteta vještačkog zemljišta

Sljedeća metoda pokazala se kao odgovarajuća. Ta metoda opisana je u Aneksu C standarda ISO DIS 11268-2.

Zahvati se utvrĐena količina (npr. 5 gr) zemljišta, odnosno ispitnog supstrata odgovarajućim instrumentom (uzorkivačem sa epruvetom (auger tube) itd.). Dno epruvete prekrije se komadom filter papira, epruveta se napuni vodom, pa se smješti na rešetku u kupatilo s

tečnošću. Epruveta se postepeno prastvara sve dok nivo vode ne bude iznad površine zemljišta. Zatim se ostavlja u vodi na tri sata. Budući da se u zemljištu ne može zadržati sva voda koju upiju kapilari, uzorak zemljišta treba da se ostavi da se cijedi dva sata tako što se epruveta stavi na podlogu od veoma mokrog fino usitnjenog kvarcnog pijeska u zatvorenoj posudi (da bi se spriječilo sušenje). Uzorak se nakon toga vaga i suši do stalne mase na 105°C. Vodni kapacitet (WHC) se zatim iizračunava na sljedeći način:

$$WHC\ \%\ suve\ mase\ = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

gdje je: S= supstrat zasićen vodom + masa epruvete + masa filter papira, T=tara (masa epruvete + masa filter papira),D=suva masa supstrata.

Dodatak 3

Određivanje pH vrijednosti zemljišta

Sljedeća metoda određivanja pH vrijednosti zemljišta zasniva se na opisu datom u standardu ISO 10390 (Kvalitet zemljišta – Određivanje pH vrijednosti).

Definisana količina zemljišta suši se na sobnoj temperaturi najmanje 12 sati. Zatim se pravi suspenzija zemljišta (sadrži najmanje 5 grama zemljišta) sa petostruko većom količinom rastvora 1 M kalijum-hlorida (Kcl) analitičkog stepena čistoće ili 0,01 M rastvora kalcijumhlorida (CaCl2) analitičkog stepena čistoće. Suspenzija se zatim snažno mućka pet minuta.

Nakon mućkanja, suspenzija se ostavlja da se taloži najmanje dva sata, ali ne duže od 24 sata. Zatim se mjeri pH vrijednost tečne faze pomoću pH-metra koji se prije svakog mjerenja kalibriše odgovarajućim nizom puferskih rastvora (npr. pH 4,0 i 7,0).

Dodatak 4

Uslovi uzgoja Enchytraeus sp.

Enhitreide vrste Enchytraeus albidus (kao i druge vrste Enchytraeus) mogu da se uzgajaju u velikim plastičnim kutijama (npr. 30 × 60 ×10 cm) koje su napunjene smješom od vještačkog zemljišta i prirodnog, nekontaminiranog baštenskog zemljišta u odnosi 1:1. Kompost se mora izbjegavati, zato što sadrži toksične hemikalije kao što su teški metali. Prije upotrebe potrebno je ukloniti faunu iz zemljišta (npr. dubokim zamrzavanjem). Može se koristiti i supstrat koji se sastoji samo od vještačkog zemljišta, ali stopa reprodukcije može biti niža od stope koja se dobija upotrebom miješanog zemljišta. pH vrijednost supstrata koji se upotrebljava za uzgoj treba da iznosi 6,0 ± 0,5.

Kultura se čuva u mraku na temperaturi od 15 do 20 °C ± 2 °C. Moraju se izbjegavati temperature više od 23 °C. Zemljište mora da se održava vlažnim, ali ne smije postati mokro. Pokazatelj adekvatnog sadržaja vlage u zemljištu su sitne kapljice vode koje se javljaju na blagi stisak zemljišta između prstiju. Mora se izbjeći stvaranje anoksičnih uslova time što će se voditi računa da poklopci posuda u kojima se vrši uzgoj kulture omogućavaju razmjenu gasova sa atmosferom. Zemljište se svake sedmice mora pažljivo rastresti da bi se omogućilo snabdijevanje vazduhom.

Crvi mogu da se hrane valjanim ovsem. Ovas treba da se čuva u zatvorenim posudama i to sterilisan u autoklavu ili toplotom prije upotrebe da bi se izbjeglo da doĐe do infekcije grinjama brašna (npr. Glyzyphagus sp, Astigmata, Acarina) ili predatorskim grinjama (npr. Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles, Gamasida, Acarina). Nakon obrade toplotom, hrana treba da se samelje tako da se njome može lako zasuti površina zemljišta. Uz valjani ovas, mogu se povremeno dodavati i vitamini, mlijeko i ulje jetre bakalara. Adekvatan izvor hrane čine i pekarski kvasac i riblja hrana „Tetramin—.

Davanje hrane vrši se otprilike dva puta sedmično. Odgovarajućom količinom valjanog ovsa zaspe se površina zemljišta ili se ovas pažljivo umiješa u supstrat prilikom rastresanja zemljišta zbog aeracije. Apsolutna količina hrane koja se daje zavisi od broja crva u supstratu. Na primjer, količina hrane treba da se povećava ako se u potpunosti pojede u toku jednog dana od davanja. I obrnuto, ako pri sljedećem davanju hrane (nedjelju dana kasnije) još uvijek ima hrane na površini zemljišta, količinu hrane trebalo bi smanjiti. Hrana kontaminirana gljivicama treba da se ukloni i zamijeni. Poslije tri mjeseca, potrebno je da se crvi prenesu u svježe pripremljen supstrat.

Smatra se da su uslovi uzgoja zadovoljavajući ako crvi: (a) ne nastoje da izaĐu iz supstrata, (b) brzo se kreću kroz zemljište, (c) imaju sjajnu poljnu površinu tijela za koju ne prianjaju čestice zemljišta, (d) imaju uglavnom bjeličastu boju, (e) u kulturama su prisutne jedinke u različitim razvojnim stadijumima i (f) neprekidno se razmnožavaju.

Dodatak 5

IzvoĐenje ispitivanja sa drugim vrstama Enchytraeus

Izbor vrste

Osim E. albidus, mogu se upotrebljavati i druge vrste i, shodno tome, potrebno je prilagoditi i postupak ispitivanja i kriterijume valjanosti. Kako su mnoge vrste Enchytraeus lako dostupne i mogu se na zadovoljavajući način održavati u laboratorijai, najvažniji kriterijum za izbor druge vrste za vršenje ispitivanja je ekološka relevantnost i, uz nju, uporedna osjetljivost. Mogu postojati i formalni razlozi zbog kojih je potrebno koristiti drugu vrstu. Na primjer, u državama u kojima se ne javlja E. albidus i ne može da se uveze (npr. ako postoje ograničenja uvedena zbog karantina), biće neophodno koristiti drugu vrstu Enchytraeus.

Primjeri odgovarajućih alternativnih vrsta

— Enchytraeus crypticus (Vesthajde i Gref, 1992) (Westheide i Graefe 1992): Tokom posljednjih godina, ova vrsta često se upotrebljava u ekotoksikološkim istraživanjima zbog jednostavnosti uzgoja i testiranja. Vrsta je manja, međutiim, zbog čega je i rukovanje njom teže u poreĐenju sa E. albidus (naročito u fazama prije primjene metode bojenja). Nije sa sigurnošću utvrĐeno da vrsta E. crypticus obitava u poljima, opisana je samo iz kultura kišnih glista. Iz tog razloga nisu poznati ekološki zahtjevi vrste.

— Enchytraeus buchholzi (Vejdovski, 1879) (Vejdovsky 1879): Ovaj naziv vjerovatno obuhvata grupu blisko povezanih vrsta koje se morfološki teško razlikuju. Ne preporučuje se upotreba ove vrste u svrhu ispitivanja ako se jedinkama u ispitivanju ne može pripisati pripadnost vrsti. E. buchholzi uglavnom obitava na livadama i u uslovima degradiranih ekosistema, npr. uz puteve.

— Enchytraeus luxuriosus: Ova vrsta prvobitnog naziva E. „minutus— tek je nedavno opisana. (1). Otkrio je U. Gref (Hamburg) na livadi u blizini Sankt Peter-Ordinga (Šlezvig-

Holštajn, Njemačka). Vrsta E. luxuriosus je otprilike dvostruko manja od E. albidus, ali je veća od drugih vrsta o kojima je ovdje bilo riječi; iz ovog razloga mogla bi da bude dobra alternativa vrsti E. albidus.

— Enchytraeus bulbosus (Nilsen i Kristensen, 1963) (Nielsen i Christensen 1963): Prisustvo ove vrste do sada je zabilježeno u mineralnim zemljištima u Njemačkoj i Španiji gdje se uobičajeno nalazi, mada vrsta nije brojna. U poređenju sa drugim sitnim vrstama ovog roda, relativno je lako prepoznati. Nije poznato ponašanje ove vrste na laboratorijaskim testovima kao ni njena osjetljivost na hemikalije. Pokazalo se, pak, da je lako uzgojiti. (E. Beloti, lična komunikacija) (Belotti).

Uslovi uzgoja

Sve navedene vrste Enchytraeus moguće je uzgajati u istim supstratima koji se koriste za vrstu E. albidus. Budući da se radi o manjoj vrsti, to znači da i posude u kojima se uzgajaju mogu biti manje i da se porcije hrane moraju prilagoditi, iako se može koristiti ista hrana. Životni ciklus ovih vrsta kraći je nego kod vrste E. albidus, pa bi davanje hrane trebalo da se obavlja češće.

Uslovi ispitivanja

Uslovi ispitivanja su u suštini isti kao kod vrste E. albidus, sa sljedećim izuzecima:

- veličina posude za ispitivanje može (ali nije nužno) biti manja;
- test reproduktivne toksičnosti može (ali nije nužno) trajati kraće, npr. četiri umjesto šest nedjelja; međutiim, test za određivanje oblasti koncentracija ne smije se mijenjati;
- budući da su primjeri mladih crva sitni, za njihovo prebrojavanje preporučuje se primjena metode bojenja;
- kriterijum valjanosti koji se odnosi na „broj mladih jedinki po ispitnoj posudi na kontroli— treba da se promijeni u „50—.

Dodatak 6

Detaljni opis tehnika ekstrahovanja

Bojenje bengalskim crvenilom

Ovu metodu, prvobitno razvijenu u ekologiji kopnenih voda (1) za brojanje mladih jedinki prvi je predložio V. de Koen (Univerzitet u Gentu, Belgija) (W. De Coen) u testu reprodukcije enhitreida. Nezavisno od toga, na RIVM-u u Bilthovenu (2) (3) razvijena je izmijenjena verzija metode (beglasko crvenilo pomiješano sa formaldehidom umjesto sa etanolom).

Na kraju glavnog ispitivanja (odnosno za šest nedjelja), zemljište se iz ispitnih posuda prenosi u plitku posudu. U tu svrhu mogu se koristiti plastična (tipa Bellaplast) posuda ili kadica za razvijanje fotografija sa rebrastim dnom budući da „rebra— ograničavaju kretanje crva na područje koje se posmatra. Mlade jedinke fiksiraju se etanolom (otprilike 5 ml po ponavljanju). Posude se zatim pune vodom do visine od 1 do 2 cm. Dodaje se nekoliko kapi (200 do 300 µl) bengalskog crvenila (1-postotni rastvor sa etanolom) (0,5-postotni eozin se takođe može koristiti) pa se obije komponente pažljivo izmiješaju. Poslije 12 sati, trebalo bi da crvi postanu prebojeni crvenkastom bojom i da se mogu lako prebrojati zato što će ležati na površini supstrata. Druga mogućnost je da se smješa supstrata i alkohola ispere kroz sito (veličina mrežnog otvora 0,250 mm) prije nego što se crvi prebroje. Tim postupkom

omogućava se spiranje kaolinita, treseta i izvjesne količine pijeska pa se crvenkasto prebojeni crvi lakše mogu vidjeti i prebrojati. Brojanje se dodatno može olakšati upotrebom svjetlosnog mikroskopa (dimenzije sočiva najmanje 100 × 75 mm sa faktorom uvećanja dva do tri puta).

Tehnika bojenja smanjuje vrijeme prebrojavanja na nekoliko minuta po posudi, pa bi jednom stručnom licu bilo potrebno najviše dva dana da izvrši procjenu svih posuda iz jednog testiranja.

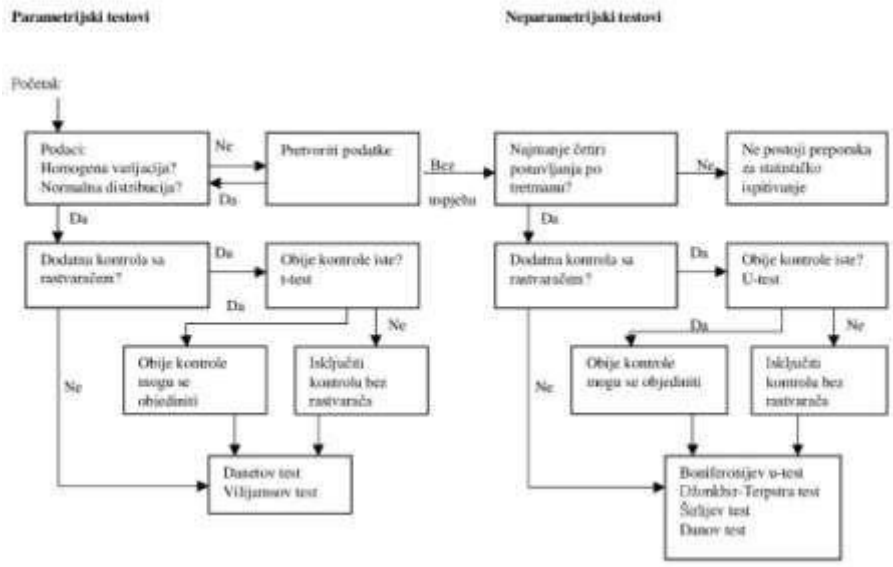
Ekstrahovanje u mokrim uslovima

Ekstrahovanje u mokrim uslovima trebalo bi započeti odmah po završetku testiranja.
Zemljište iz svake posude sipa se u plastična sita veličine mrežnog otvora oko 1 mm. Sita se zatim okače na plastične zdjele tako da ne dodiruju dno. Zdjele se pažljivo pune vodom dok uzorci u sitima ne budu u potpunosti prastvoreni. Da bi se obezbijedila stopa iskorišćenja iz supstrata više od 90% prisutnih crva, potrebno je vršiti ekstrakciju u trajanju od tri dana pri temperaturi od 20 ± 2 °C. Po isteku vremena ekstrahovanja, sita se uklanjaju, a voda (osim male količine) se polako presipa tako da se talog na dnu zdjela ne poremeti. Plastične zdjele se zatim lagano mućkaju da bi se dobila suspenzija taloga i vode nad njim. Voda se presipa u Petrijevu šolju i (nakon što se čestice zemljišta slegnu), enhitreide se mogu identifikovati, ukloniti i prebrojati pomoću stereomikroskopa i pincete od mekog čelika.

Flotacija
Metodu zasnovanu na flotaciji opisao je u napomeni R. Kuperman (4). Nakon što se sadržaj ispitne posude fiksira etanolom, zemljište se natapa Ludoksom (AM-30 koloidna silika, 30 wt. % vodene suspenzije) do visine od 10 do 15 mm iznad površine zemljišta. Nakon što se zemljište temeljno izmiješa sa flotacionim agensom u trajanju od dva do tri minuta, mlade jedinke crva koje plutaju po površini mogu se lako prebrojati.

Dodatak 7

Pregled statističke procjene podataka (određivanje vrijednosti NOEC)



C.33. TEST REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI NA KIŠNIM GLISTAMA (EISENIA FETIDA/ EISENIA ANDREI)

1. Uvod

Ova ispitna metoda odgovara smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 222 (2004).

Osmišljena je za procjenu efekata hemikalija u zemljištu na reproduktivni uspjeh (i druge subletalne parametre praćenja) kišnih glista vrsta Eisenia fetida (Savinji 1826) (Savigny) ili Eisenia andrei. Metoda je prethodno podvrgnuta uporednom ispitivanju (3). Postoji metoda ispitivanja akutne toksičnosti kod kišnih glista (4). Objavljeno je nekoliko drugih međunarodnih i nacionalnih smjernica za ispitivanje akutne i hronične toksičnosti kod kišnih glista.

Vrste Eisenia fetida /Eisenia andrei uzimaju se za predstavnike faune u zemljištu, naročito kišnih glista. U literaturi su dostupni osnovni podaci o ekologiji kišnih glista i njihovoj upotrebi u ekotoksikološkim ispitivanjima.

1.1 Princip testiranja

Odrasle jedinke izlažu se nizu koncentracija ispitivane hemikalije koja je umiješana u zemljište ili, u slučaju pesticida, primijenjena u ili na zemljište u postupku koji odgovara obrascu za primjenu te hemikalije. Metoda primjene određena je svrhom testa. Određuje se oblast ispitnih koncentracija tako da se njom obuhvate one koncentracije koje će vjerovatno izazvati subletalne i letalne efekte u periodu od osam sedmica. Smrtnost i efekti na rast kod odraslih jedinki glista procjenjuju se poslije 4 sedmice izlaganja. Odrasle jedinke se zatim uklanjaju iz zemljišta, a efekti na reprodukciju procjenjuju se poslije perioda od još 4 sedmice prebrojavanjem broja njihovih mladih prisutnih u zemljištu. Reproduktivni uspjeh glista izlaganih ispitnoj hemikaliji upoređuje se sa jednom ili više kontrola kako bi se utvrdila (i) najviša koncentracija bez vidljivog efekta (NOEC) i/ili (ii) EC_x (npr. EC_{10}, EC_{50}) tako što se primjenjuje regresioni model da se procijeni koncentracija koja bi izazvala x-postotno smanjenje reproduktivnog uspjeha. Ispitne koncentracije treba da obuhvate EC_x (npr. EC_{10}, EC_{50}) tako da se vrijednost EC_x dobija interpolacijom, a ne ekstrapolacijom (za značenje pojedinih izraza v. Dodatak 1).

1.2 Podaci o ispitivanoj hemikaliji

Da bi se isplanirao odgovarajući postupak ispitivanja, moraju biti dostupni sljedeći podaci o ispitivanoj hemikaliji:

— rastvorljivost u vodi;

— log Kow;

— napon pare;

— ako je moguće, podaci o životnom ciklusu i ponašanju u životnoj sredini (brzina fotolize i brzina hidrolize ako su relevantne za način primjene).

Ova metoda ispitivanja može se primijeniti na sve hemikalije bez obzira na njihovu rastvorljivost u vodi. Metodu nije moguće primijeniti na isparljive hemikalije koje se ovdje definišu kao hemikalije za koje je Henrijeva konstanta ili koeficijent raspodjele između vazduha i vode veći od jedan, odnosno na hemikalije sa naponom pare većim od 0,0133 Pa pri 25 °C.

Ovom metodom ispitivanja nije predviđena eventualna razgradnja ispitivane hemikalije za vrijeme trajanja testa. Zato nije moguće poći od pretpostavke da će se do kraja ispitivanja održati početne vrijednosti koncentracija izlaganja. U tom slučaju, preporučuje se da se izvrši hemijska analiza ispitivanih hemikalija na početku i na kraju testiranja.

1.3 Referentna hemikalija

Moraju se utvrditi NOEC i/ili EC_x referentne hemikalije da bi se osigurali adekvatni uslovi laboratorijaskih ispitivanja i da bi se utvrdilo da se odgovor ispitnih organizama statistički ne mijenja u vremenu. Preporučuje se testiranje ispitivane hemikalije najmanje jednom godišnje ili, kada se testiranje vrši rjeđom dinamikom, uporedo sa utvrđivanjem toksičnosti ispitivane hemikalije. Karbendazim ili benomil su adekvatne referentne hemikalije za koje se pokazalo da utiču na reprodukciju (3). Značajne efekte trebalo bi zapaziti između (a) 1 i 5 mg aktivnog sastojka (a.s.)/kg suve mase ili (b) 250-500 g/ha ili 25-50 mg/m2. Ako se u ispitni niz uključi pozitivni toksični standard, koristi se jedna koncentracija i isti broj ponavljanja kao kod kontrola.

1.4 Valjanost ispitivanja

Da bi se rezultat ispitivanja smatrao valjanim, potrebno je da kontrole zadovoljavaju sljedeće kriterijume:

— da je iz svakog ponavljanja (sa 10 odraslih jedinki) proizašlo ≥ 30 mladih jedinki do kraja testiranja;

— da je koeficijent varijacije reprodukcije ≤ 30 %;

— da je stopa smrtnosti odraslih jedinki tokom prve četiri sedmice testiranja ≤ 10 %.

Kada ispitivanje ne zadovoljava navedene kriterijume, potrebno ga je prekinuti, osim ako za nastav izvoĐenja testa postoji obrazloženje. To obrazloženje treba da se unese u izvještaj.

2. Opis testiranja

Oprema

Potrebno je koristiti ispitne posude od stakla ili drugog hemijski inertnog materijala zapremine od jednog do dva litra. Poprečni presjek posuda treba da iznosi oko 200 cm2 tako da se postigne dubina mokrog supstrata od 5-6 cm kada se doda 500 do 600 g suve mase supstrata. Poklopac posude treba da je napravljen tako da omogući razmjenu gasova između supstrata i atmosfere i pristup svjetlosti (npr. pomoću perforisanog providnog poklopca) a da istovremeno sprječava gliste da pobjegnu. Ako je količina korišćenog ispitnog supstrata znatno veća od 500 do 600 g po ispitnoj posudi, potrebno je sodnosno povećati i broj glista.

Potrebna je uobičajena laboratorijaska oprema, a naročito sljedeća oprema:

— ormar za sušenje;

— stereomikroskop;

— pH-metar i fotometar;

— odgovarajuća precizna vaga;

— odgovarajuća oprema za kontrolu temperature;

— odgovarajuća oprema za kontrolu vlažnosti (nije neophodna ako posude za izlaganje imaju poklopce);

— inkubator ili manja prostorija sa klima uređajem;

— pincete, kuke ili petlje; — kupatilo sa tečnošću.

Priprema vještačkog zemljišta

U ovom testiranju koristi se vještačko zemljište sljedećeg sastava (na osnovu suve mase osušene na konstantnu masu pri temperaturi od 105 °C):

— 10% treseta od mahovine roda Sphagnum (što bliže pH vrijednosti od 5,5 do 6,0, bez vidljivih ostataka biljaka, fino usitnjen, osušen do izmjerenog sadržaja vlage);

— 20% kaolinitske gline (sadržaj kaolinita po mogućnosti iznad 30%);

— od 0,3 do 1,0% kalcijum-karbonata ($CaCO_3$, sprašenog, analitičkog stepena čistoće) za postizanje početne pH vrijednosti od 6,0 ± 0,5;

— 70% kvarcnog pijeska sušenog na vazduhu (u zavisnosti od potrebne količine $CaCO_3$) pretežno sitnog pijeska sa više od 50% čestica reda veličine između 50 i 200 mikrona.

Napomena 1: Potrebna količina $CaCO_3$ zavisiće od sastojaka supstrata, što uključuje i hranu, i treba da se utvrdi mjerenjima poduzoraka zemljišta neposredno prije testiranja. pH vrijednost mjeri se na uzorku zemljišta sa rastvorom 1 M kalijum-hlorida (KCl) ili sa 0,01 M kalcijum-hlorida ($CaCl_2$) (13).

Napomena 2: Sadržaj organskog ugljenika u vještačkom zemljištu može se smanjiti, npr. smanjenjem sadržaja treseta na 4% do 5% i sodnosnim povećanjem sadržaja pijeska. Takvim smanjenjem sadržaja organskog ugljenika može biti smanjena adsorpcija ispitivane hemikalije u zemljište (organski ugljenik), a dostupnost ispitivane hemikalije glistama može porasti. Pokazalo se da na testu u zemljištu sa nižim sadržajem organskog ugljenika (npr. 2,7%) (14) Eisenia fetida može zadovoljiti kriterijume valjanosti koji se tiču reprodukcije, a iskustvo pokazuje da se isto može postići i u vještačkom zemljištu sa 5% treseta. Zato, prije upotrebe takvog zemljišta u glavnom ispitivanju, nije neophodno dokazivati adekvatnost vještačkog zemljišta da bi ispitivanje ispunilo kriterijume valjanosti, osim ako se sadržaj treseta smanji više nego što je navedeno.

Napomena 3: Kada se prirodno zemljište koristi u dodatnim ispitivanjima (npr. u testovima višeg stepena) potrebno je ispitati da li zemljište odgovara i dokazati da su ispunjeni kriterijumi valjanosti ispitivanja.

Dobro se izmiješaju suvi sastojci zemljišta (npr. u velikom laboratorijaskom mikseru) na dobro provjetrenom mjestu. Prije početka testiranja, suvo vještačko zemljište vlaži se dodavanjem dovoljne količine dejonizovane vode dok se ne dostigne oko polovina konačnog sadržaja vode, što je 40-60% maksimalnog vodnog kapaciteta (odgovara sadržaju vlage od 50 ± 10 % po suvoj masi). Ovim će se dobiti supstrat na kojem se voda ne nalazi niti curi iz njega kada se stisne rukom. Maksimalni vodni kapacitet (WHC) vještačkog zemljišta utvrđuje se u skladu sa pokolonama opisanim u Dodatku 2, standardu MEST ISO 11274 (15) ili ekvivalentnom standardu EU.

Ako se ispitivana hemikalija primjenjuje na površinu supstrata ili miješa u zemljište bez vode, konačna količina vode može se umiješati u vještačko zemljište za vrijeme pripreme zemljišta. Ako se ispitivana hemikalija miješa u zemljište sa određenom količinom vode, voda se kasnije može dodavati sa ispitivanom hemikalijom.

Vlažnost zemljišta utvrđuje se na početku i na kraju ispitivanja u skladu sa standardom ISO 11456 (16) ili ekvivalentnim EU standardom, dok se pH vrijednost zemljišta određuje u skladu sa Dodatkom 3, standardom ISO 10390 (13) ili ekvivalentnim EU standardom.
UtvrĐivanja treba da se vrše na uzorku kontrolnog zemljišta i na uzorcima zemljišta tretiranih svakom ispitnom koncentracijom. pH zemljišta nije potrebno prilagoĐavati kada se ispituju kisele ili bazne hemikalije. Sadržaj vlage trebalo bi da se prati periodičnim vaganjem posuda do kraja ispitivanja.

Izbor i priprema ispitnih životinja

Vrsta koje se koristi u ispitivanju je Eisenia fetida ili Eisenia andrei. Da bi se počelo ispitivanje, potrebne su odrasle gliste stare između dva mjeseca i godinu dana koje imaju pojas žljezdanog epitela. Gliste je potrebno izabrati iz sinhronizovane kulture sa relativno homogenom starosnom strukturom (Dodatak 4). Jedinke u okviru ispitne grupe ne smiju da se razlikuju po starosti za više od četiri nedjelje.

Izabrane gliste potrebno je aklimatizovati najmanje jedan dan u onoj vrsti vještačkog zemljišta koje će se koristiti u ispitivanju. Za to vrijeme potrebno je hraniti gliste istom hranom koja će se koristiti u ispitivanju (v. st. 31 do 33).

Na početku ispitivanja, potrebno je pojedinčano izvagati grupe od 10 jedinki glista i nasumično ih rasporediti u ispitne posude. Gliste se prije mjerenja isperu (dejonizovanom vodom), a višak vode se upije kratkim spuštanjem glista na filter papir. Mokra masa pojedičnih glista treba da iznosi između 250 i 600 mg.

Priprema ispitnih koncentracija

Mogu se koristiti dvije metode primjene ispitivane hemikalije: miješanje ispitivane hemikalije sa zemljištem (v. st. 19-21) ili nanošenje hemikalije na površinu zemljišta (v. st. 22-24). Od svrhe ispitivanja zavisi koja će se metoda koristiti. U načelu, preporučuje se miješanje ispitivane hemikalije sa zemljištem. Međutiim, može biti potrebno primijeniti i postupke koji su u skladu sa uobičajenom poljoprivrednom praksom (npr. prskanje tečne formulacije ili upotreba posebnih formulacija pesticida kao što su granule ili sredstava za tretiranje sjemena). Rastvore koji pomažu kod tretiranja zemljišta ispitivanom hemikalijom potrebno je birati na osnovu niske toksičnosti po gliste, a u plan ispitivanja mora biti uključena i kontrola sa odgovarajućim rastvaračem.

Miješanje ispitivane hemikalije sa zemljištem

Ispitivana hemikalija rastvorljiva u vodi

Neposredno prije početka ispitivanja, priprema se rastvor ispitivane hemikalije u dejonizovanoj vodi u količini koja je dovoljna za sva ponavljanja jedne koncentracije. Da bi se olakšala priprema ispitnog rastvora, može biti potreban i kosolvent. Praktično je da se pripremi količina rastvora koja je neophodna da bi se postigao konačni sadržaj vlage (40 do 60% maksimalnog vodnog kapaciteta). Prije unošenja u ispitnu posudu, rastvor se temeljno miješa sa supstratom.

Ispitivana hemikalija ratvorljiva u vodi

Ispitivana hemikalija rastvori se u maloj količini odgovarajućeg organskog rastvarača (npr. acetona), a zatim raspršiti po maloj količini sitnog kvarcnog pijeska ili pomiješa sa njim. Rastvarač se zatim u digestoru uklanja isparavanjem u trajanju od najmanje nekoliko minuta. Tretirani pijesak se potom dobro izmiješa sa već navlaženim vještačkim zemljištem. Dodaje se dejonizovana voda (potrebna količina) da bi se postigao konačni sadržaj vlage od 40% do 60% maksimalnog vodnog kapaciteta i miješa se sa zemljištem. Zemljište je tada spremno za raspoređivanje u ispitne posude. Potreban je oprez, jer neki rastvarači mogu biti toksični za gliste.

Ispitivana hemikalija nerastvorljiva u vodi i organskim rastvaračima

Priprema se mješavina koja sadrži 10 g fino usitnjenog industrijskog kvarcnog pijeska sa količinom ispitivane hemikalije koja je potrebna da se postigne ispitna koncentracija u

zemljištu. Smješa se zatim dobro izmiješa sa prethodno navlaženim vještačkim zemljištem. Dodaje se dejonizovana voda u količini koja je potrebna da se postigne konačni sadržaj vlage od 40% do 60% maksimalnog vodnog kapaciteta i umiješa se u zemljište. Zemljište je tada spremno za raspoređivanje u ispitne posude.

Aplikovanje ispitivane hemikalije na površinu zemljišta

Zemljište se tretira pošto se dodaju gliste. Prvo se ispitne posude pune navlaženim supstratom i izvagane gliste stavljaju se na površinu zemljišta. Zdrave jedinke se obično odmah ukopavaju u zemljište, pa se sve gliste koje i poslije 15 minuta ostanu na površini evidentiraju kao oštećene i moraju se zamijeniti. Ako se gliste zamijene, nove i zamijenjene gliste moraju se izvagati tako da na početku ispitivanja bude poznata ukupna živa masa izložene grupe glista i ukupna masa posude zajedno sa glistama.

Unosi se ispitivana hemikalija. Hemikalija ne treba da se dodaje u zemljište u roku od pola sata od unošenja glista (ili dok se gliste nalaze na površini zemljišta) da bi se izbjeglo da dođe do direktne izloženosti ispitivanoj hemikaliji u kontaktu sa kožom. Ako je ispitivana hemikalija pesticid, može se primijeniti na površinu zemljišta raspršivanjem. Ispitivana hemikalija se na površinu zemljišta nanosi što ravnodnosnije pomoću odgovarajućeg laboratorijaskog raspršivača kojim se simulira efekat raspršivanja u prirodnim uslovima. Prije nanošenja ispitne hemikalije potrebno je skinuti poklopac ispitne posude i zamijeniti ga oplatom koja će zaštititi bočne zidove posude od prskanja.

Oplata se može napraviti i od ispitne posude kojoj je uklonjeno dno. Hemikalija se primjenjuje na temperaturi od 20 ± 2 °C, a za vodene rastvore, emulzije ili disperzije primjenjuje se doza od 600 do 800 µl/m2. Doza se mora provjeriti upotrebom odgovarajuće tehnike kalibracije. Potrebno je koristiti posebne formulacije poput granula ili sredstava za tretiranje sjemena na način na koji se upotrebljavaju u poljoprivredi.

Ispitne posude potrebno je ostaviti nepokrivene sat vremena kako bi isparili svi isparljivi rastvarači koji se koriste prilikom primjene ispitivane hemikalije. U ovoj fazi ispitivanja potreban je oprez kako gliste ne bi pobjegle iz ispitnih posuda.

2.1 Postupak

Ispitne grupe i kontrole

Preporučuje se unošenje 10 kišnih glista u 500-600 g suve mase vještačkog zemljišta (tj. 50-60 g zemljišta po glisti). Ako se koriste veće količine zemljišta, kao što je slučaj kod ispitivanja pesticida kod kojih se zahtijevaju posebni modusi primjene, poput sredstava za tretiranje sjemena, da bi se održala količina zemljišta od 50-60 g po glisti, potrebno je povećati broj glista. Deset glista pripremi se za svaku kontrolnu i tretiranu posudu. Gliste se isperu vodom, obrišu i zatim nakratko spuste na papirnati ubrus da se višak vode iscijedi.

Da bi se izbjegle sistemske greške prilikom raspoređivanja glista u ispitne posude, potrebno je utvrditi homogenost ispitne populacije pojedinačnim vaganjem 20 nasumično odabranih glista iz iste populacije koja će se koristiti na ispitivanju. Kada se postigne homogenost, serije glista se biraju, vagaju i nasumično raspoređuju u ispitne posude. I poslije unošenja glista, potrebno je izvagati svaku ispitnu posudu da bi se utvrdila

početna masa koja se može koristiti kao polazište za praćenje sadržaja vlage tokom ispitivanja. Ispitne posude se zatim zatvaraju i smještaju u ispitnu komoru.

Za svaku metodu primjene ispitivane hemikalije pripremaju se odgovarajuće kontrole. Slijede se odgovarajući postupci za pripremu kontrola, s tim što se ne dodaje ispitivana hemikalija. Shodno tome, po potrebi se kontrolama dodaju organski rastvarači, kvarcni pijesak ili drugi vehikulumi u koncentracijama/količinama koje odgovaraju onima koje se koriste u tretmanima. Za dodavanje ispitivane hemikalije uz pomoć rastvarača ili drugog vehikuluma, potrebno je pripremiti dodatnu kontrolu bez vehikuluma i testirati je da bi se osiguralo da vehikulum nema uticaj na rezultat ispitivanja.

Uslovi ispitivanja

Temperatura ispitivanja iznosi 20 ± 2 °C. Ispitivanje se vrši u kontrolisanim ciklusima svjetlosti i mraka (po mogućnosti 16 sati svjetlosti pa 8 sati mraka) pri osvijetljenosti od 400 do 800 luksa nad ispitnim posudama.

Ne vrši se aeracija ispitnih posuda za vrijeme trajanja ispitivanja, ali poklopci ispitnih posuda moraju biti tako napravljeni da obezbijede razmjenu gasova i istovremeno ograniče isparavanje vlage.

Tokom ispitivanja, sadržaj vode u supstratu u ispitnim posudama održava se periodičnim vaganjem ispitnih posuda (bez poklopaca). Gubici se, po potrebi, nadoknaĐuju dejonizovanom vodom. Sadržaj vode ne treba da varira za više od 10% u odnosu na sadržaj izmjeren na početku ispitivanja.

Davanje hrane

Sva hrana koja je takvog kvaliteta da se njom može makar održavati masa glista tokom ispitivanja smatra se prihvatljivom. Iskustvo pokazuje da se u tu svrhu kao hrana može koristiti ovseno brašno, kravlje ili konjsko Đubrivo. Potrebno je utvrditi da krave i konji čije se Đubrivo uzima nisu podvrgnuti medikamentoznoj terapiji ili tretmanima koji uključuju hemikalije, kao što su stimulatori rasta, nematicidi ili slični veterinarski proizvodi koji bi mogli negativno da se odraze na gliste tokom ispitivanja. Preporučuje se da se kravlje Đubrivo neposredno sakuplja, zato što iskustvo pokazuje da kravlje Đubrivo koje je dostupno na tržištu, a koje se koristi kao baštensko Đubrivo, može imati negativne efekte na gliste. Đubrivo treba da bude osušeno na vazduhu, fino usitnjeno i pasterizovano prije upotrebe.

Prije nego što se upotrijebe u ispitivanju, sve svježe serije hrane treba da se daju kulturi crva koja ne učestvuje u ispitivanju kako bi se osiguralo da su zadovoljavajućeg kvaliteta. Rast i proizvodnja kokona ne smiju biti smanjeni u odnosu na gliste iz supstrata u koji nije dodata nova serija hrane (uslovi su opisani u ispitnoj metodi C.8(4)).

Hrana se prvi put daje dan poslije unošenja glista i primjene ispitivane hemikalije na zemljište. Oko 5 grama hrane raširi se po površini zemljišta u svakoj posudi i skvasi dejonizovanom vodom (oko 5 do 6 ml po posudi). Od tog trenutka, hrana se daje jednom sedmično tokom ispitnog perioda od 4 sedmice. Ako hrana ostaje nepojedena, potrebno je smanjiti porciju da bi se izbjegao rast gljivica ili nakupljanje buĐi. Odrasle jedinke se uklanjaju iz zemljišta dvadeset osmog dana ispitivanja. Zatim se u svaku ispitnu posudu

dodaje još 5 grama hrane. Tokom posljednje 4 sedmice ispitivanja hrana se više ne dodaje.

Izbor ispitnih koncentracija

Pri izboru odgovarajućih ispitnih koncentracija korisno je prethodno poznavati toksičnost ispitivane hemikalije, npr. iz testa akutne toksičnosti (4) i/ili iz studija za određivanje oblasti koncentracija. Po potrebi, test za određivanje oblasti koncentracija sprovodi se sa, primjera radi, pet ispitnih koncentracija od 0,1, 1,0, 10, 100 i 1 000 mg/kg (suve mase zemljišta). Dovoljno je jedno ponavljanje za svaki tretman i kontrolu. Trajanje testa za određivanje oblasti koncentracija iznosi dvije nedjelje, a smrtnost se procjenjuje na kraju ispitivanja.

Plan eksperimenta

Kako se za ovo ispitivanje ne može propisati jedinstvena zbirna statistika, ova ispitna metoda predviđa utvrĐivanje vrijednosti NOEC i EC_x. Regulatorna tijela će vjerovatno u bližoj budućnosti zahtijevati utvrĐivanje vrijednosti NOEC. Moguće je da će u bližoj budućnosti biti usvojena i šira upotreba vrijednosti EC_x, shodno statističkim i ekološkim zahtjevima. Tako se, na osnovu preporuka proizašlih iz uporednog ispitivanja testa reproduktivne toksičnosti za enhitreje (17), predlažu tri plana.

Pri odreĐivanju oblasti koncentracija, moraju biti ispunjeni sljedeći zahtjevi:

— Za utvrĐivanje vrijednosti NOEC, potrebno je ispitati najmanje pet/dvanaest koncentracija u geometrijskom nizu. Preporučuju se četiri ponavljanja za svaku ispitnu koncentraciju i još osam kontrola. Koncentracije treba da se razlikuju za faktor koji nije veći od 2,0.

— Za utvrĐivanje vrijednosti EC_x (npr. EC_{10}, EC_{50}), preporučuje se odgovarajući broj koncentracija kojim se dolazi do najmanje četiri statistički značajno različita srednja odgovora pri tim koncentracijama. Preporučuju se najmanje dva ponavljanja za svaku ispitnu koncentraciju i šest kontrolnih ponavljanja. Koncentracije se mogu razlikovati za faktor koji može da varira, npr. da iznosi 1,8 ili manje u oblasti u kojoj se očekuje odgovor ili da iznosi iznad 1,8 za više ili niže koncentracije.

— Kombinovani pristup predviđa utvrĐivanje obije vrijednosti, i NOEC i EC_x. Potrebno je primijeniti osam koncentracija u geometrijskom nizu. Preporučuju se četiri ponavljanja za svaki tretman i još osam kontrola. Koncentracije treba da se razlikuju za faktor koji nije veći od 1,8.

Trajanje ispitivanja i mjerenja

Dvadeset osmog dana žive odrasle jedinke glista posmatraju se i prebrojavaju. Bilježi se i svako neuobičajeno ponašanje (npr. nemogućnost da se ukopaju u zemljište; nepomično ležanje), kao i promjene u morfologiji (npr. pojava otvorenih rana). Zatim se sve odrasle jedinke uklanjaju iz ispitnih posuda, broje i vagaju. Traganje za glistama može se olakšati ako se zemljište u kojem se nalaze gliste prenese na čistu plitku posudu prije

procjenjivanja. Gliste koje se ekstrahuju iz zemljišta potrebno je oprati prije vaganja (dejonizovanom vodom), a višak vode ukoniti spuštajući gliste nakratko na filter-papir. Sve gliste koje se do tog trenutka ne pronaĐu evidentiraju se kao uginule, zato što se mora poći od pretpostavke da su uginule i raspale se prije procjene.

Ako je zemljište prenošeno iz posuda, sada se vraća (bez odraslih jedinki ali sa nastalim kokonima). Zemljište se zatim inkubira još četiri sedmice pod istim uslovima ispitivanja, osim što se hrana daje jednom, na početku ove faze ispitivanja.

Na kraju drugog perioda od četiri sedmice, postupkom opisanim u Dodatku 5, utvrđuje se broj mladih jedinki izleglih iz kokona u ispitno zemljište i broj kokona. Potrebno je evidentirati i sve znake povrede ili oštećenja glista tokom ispitivanja.

Granično ispitivanje

Ukoliko se pri najvišoj koncentraciji na testu za određivanje oblasti koncentracija (tj. 1 000 mg/kg) ne uoči odgovor, test reproduktivne toksičnosti izvodi se kao granični test sa koncentracijom od 1 000 mg/kg. Granični test pruža mogućnost da se pokaže da je vrijednost NOEC za reprodukciju viša od granične koncentracije i da se, istovremeno, broj glista koje se koriste u ispitivanju svede na minimum. Potrebno je koristiti osam ponavljanja i za tretirano zemljište i za kontrolu.

3.Podaci i izvještaji

Obrada rezultata

Iako je opšti pregled dat u Dodatku 6, ova ispitna metoda ne nudi konačnu statističku smjernicu za analizu rezultata ispitivanja.

Jedan od parametara praćenja čini smrtnost. Evidentiraju se i promjene u ponašanju (npr. nemogućnost ukopavanja u zemljište, nepomično ležanje uz stakleni zid ispitne posude), promjene u morfologiji (npr. pojava otvorenih rana) odraslih jedinki glista, kao i prisustvo svih mladih jedinki. Uglavnom je potrebno primijeniti Probit analizu (18) ili logističku regresiju da se utvrdi LC_{50}. U slučajevima kada ova metoda nije odgovarajuća (npr. kada imamo na rapolaganju manje od tri koncentracije koje izazivaju djelimičnu smrtnost), mogu se koristiti alternativne metode. MeĐu tim metodama nalaze se metoda pokretnih prosjeka (19), modifikovana Spirman-Karberova metoda (20) ili metoda proste interpolacije (npr. geometrijski prosjek LC_0 i LC_{100}, koji se dobija množenjem kvadratnog korijena iz vrijednosti LC_0 vrijednošću LC_{100}.

Drugi parametar praćenja čini fekunditet (broj izleglih mladih jedinki). Kao i kod testa za određivanje oblasti koncentracija, i ovdje je potrebno evidentirati i sve druge pokazatelje štetnih uticaja. Za obradu podataka koji se tiču razmnožavanja, statistička analiza iziskuje poznavanje aritmetičke sredine $\bar{x}$ i standardne devijacije po tretmanu i po kontroli.

Ako je obavljena analiza varijanse, standardna devijacija, s, i broj stepeni slobode, df, mogu se zamijeniti objedinjenom procjenom varijanse dobijenom metodom ANOVA i njenim stepenima slobode – pod uslovom da varijansa ne zavisi od koncentracije. U tom

slučaju, koriste se pojedinačne varijanse kontrole i tretmana. Te vrijednosti uglavnom se računaju pomoću komercijalnog statističkog programa, pri čemu se rezultati po posudi uzimaju kao ponavljanja. Ako objedinjavanje podataka za negativnu kontrolu i kontrolu sa rastvaračem djeluje logičnije nego upoređivanje rezultata samo sa jednom od tih kontrola, potrebno je ispitati te podatke da bi se utvrdilo da se značajno ne razlikuju.

Dalje statističke analize i zaključivanje zavise od toga da li su vrijednosti dobijene iz ponavljanja normalno distribuirane i da li su njihove varijanse homogene.

Procjena vrijednosti NOEC

Daje se prednost primjeni snažnih testova. Da bi se znalo da li su podaci otprilike normalno distribuirani, potrebno je koristiti informacije iz npr. prethodnog iskustva sa uporednim ispitivanjem ili podatke iz ranije vršenih ispitivanja. Značajnija je homogenost varijanse (homoskedastičnost). Iskustvo govori da varijansa često raste sa porastom srednje vrijednosti. U tim slučajevima do homoskedastičnosti se može doći transformacijom podataka. Međutiim, tu transformaciju trebalo bi zasnovati na podacima iz ranijih testiranja, a ne na podacima koji se istražuju. Sa homogenim podacima potrebno je izvršiti t-testove višestrukog poređenja kao što je Vilijamsov test ($\alpha = 0,05$, jednosmjerni) ili Danetov test u pojedinim slučajevima. Treba napomenuti da se, u slučaju nejednake replikacije, tablične t-vrijednosti moraju korigovati na način kako to predlažu Danet i Vilijams. Ponekad zbog velike varijacije, ne dolazi do redovnog povećanja/opadanja odgovora. U slučaju tolikog odstepena od monotoničnosti, podesniji je Danetov test. Ukoliko postoje odstepena od homoskedastičnosti, opravdano je detaljnije istražiti moguća dejstva na varijanse da bi se donijela odluka o tome da li se ttestovi mogu primijeniti, a da značajnije ne izgube na snazi. Alternativno se mogu primijeniti višestruki U-test, Bonferonijev U-test prema Holmu ili, onda kada podaci pokazuju heteroskedastičnost, ali se inače slažu sa osnovnim monotoničnim odnosom doza-odgovor, drugi neparametrijski test [npr. Džonkhir-Terpstra test ili Širlijev test] koji se uobičajeno stavljaju ispred t-testova za nejednake varijanse (v. i šemu u Dodatku 6).

47 Ako je izvršeno granično ispitivanje i ako su ispunjeni svi preduslovi za izvođenje
. parametrijskih testova (normalnost, homogenost), moguće je primijeniti Studentov t-test za parove podataka, u suprotnom, primjenjuje se Man-Vitnijev U-test.

Procjena vrijednosti EC_x

Za iizračunavanje bilo koje vrijednosti EC_x, za regresionu analizu (linearnu ili nelinearnu) primjenjuju se srednje vrijednosti po tretmanu, nakon što se dobije odgovarajuća funkcija doza-odgovor. Za rast crva u smislu kontinuiranog odgovora, vrijednosti EC_x procjenjuju se pomoću odgovarajuće regresione analize (32). Među odgovarajućim funkcijama za kvantalne podatke (smrtnost/preživljavanje i broj izleglih mladih jedinki) nalaze se i normalna sigmoidna funkcija, logistička ili Vejbulova funkcija koje sadrže od dva do četiri parametra, a neki od njih mogu prikazati hormetičke odgovore. Ako je funkcija dozaodgovor prilagođena linearnom regresionom analizom, regresionom analizom treba da se odredi značajni r^2 (koeficijent determinacije) i/ili nagib prije procjene vrijednosti EC_x tako što će se u jednačinu koja se dobije regresionom analizom unijeti vrijednost koja odgovara x-procentnoj kontrolnoj srednjoj vrijednosti. Granice povjerenja od 95% iizračunavaju se prema Fieleru (citirano prema Finiju) ili pomoću drugih odgovarajućih modernih metoda.

Alternativno, odgovor se prikazuje kao procenat ili dio parametra modela koji se tumači kao kontrolni srednji odgovor. U tim slučajevima normalna (logistička, Vejbulova) sigmoidna kriva često može lako da se prilagodi rezultatima uz pomoć postupka probit regresije. U tim slučajevima funkcija ponderisanja mora da se prilagodi za metričke odgovore na način koji je prikazan kod Kristensena. Međutiim, ako se uoči hormeza, probit analizu trebalo bi zamijeniti četiri-parametarskom logističkom ili Vejbulovom funkcijom prilagoĐenom nelinearnom regresijom. Ako odgovarajuća doza-odgovor funkcija ne može da se prilagodi podacima, za procjenu EC_x i njenih granica povjerenja mogu se koristiti alternativne metode kao što su metoda pokretnih prosjeka prema Tompsonu i modifikovana Spirman- Karberova metoda.

3.1 Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju mora obuhvatiti sljedeće informacijie:

Ispitivana hemikalija:

— sveobuhvatan opis ispitivane hemikalije, šaržu, seriju i broj CAS, čistoću;

— svojstva ispitivane hemikalije (npr. log Kow, rastvorljivost u vodi, napon pare, Henrijeva konstanta (H) i podaci o životnom ciklusu i ponašanju).

Ispitni organizmi:

— korišćene ispitne životinje: vrstu, naučno ime, izvor organizama i uslove uzgoja;

—starost, sve veličine (mase) ispitnih organizama.

Uslovi ispitivanja:

—bliže podatke o pripremi ispitnog zemljišta;

—maksimalni vodni kapacitet zemljišta;

— opis tehnike korišćene prilikom primjene ispitivane hemikalije na zemljište;

— bliže podatke o pomoćnim hemikalijama korišćenim za primjenu ispitivane hemikalije;

— po potrebi, detalje o kalibraciji opreme za raspršivanje;

— opis plana eksperimenta i postupka rada;

—veličinu ispitnih posuda i zapreminu ispitnog zemljišta;

— uslove ispitivanja: intenzitet svjetlosti, trajanje ciklusa svjetlost-mrak, temperatura; — opis režima hranjenja, vrstu i količinu hrane korišćene u ispitivanju, datume davanja hrane;

— pH vrijednost i sadržaj vode u zemljištu na početku i kraju ispitivanja.

Rezultati ispitivanja:

— smrtnost kod odraslih jedinki (%) za svaku ispitnu posudu na kraju prve četiri sedmice ispitivanja;

— ukupnu masu odraslih jedinki na početku ispitivanja za svaku ispitnu posudu;

— promjene u tjelesnoj masi živih odraslih jedinki (% početne mase) za svaku ispitnu posudu nakon prve četiri sedmice ispitivanja;

— broj mladih jedinki dobijenih u svakoj ispitnoj posudi na kraju ispitivanja;

— opis vidljivih ili patoloških simptoma ili primjetnih promjena u ponašanju;

— rezultate dobijene primjenom ispitivane referentne hemikalije;

— vrijednost LC_{50}, NOEC i/ili EC_x (npr. EC_{50}, EC_{10}) za reprodukciju po potrebi sa intervalima povjerenja, i dijagram prilagođenog modela koji je korišćen za njihovo iizračunavanje, kao i sve informacije i zapažanja koja su od pomoći prilikom tumačenja rezultata;

—dijagram odnosa doza-odgovor;

—rezultate za svaku ispitnu posudu;

Odstepena od postupaka opisanih u ovoj metodi ispitivanja i sve neuobičajene pojave za vrijeme ispitivanja.

Dodatak 1

Značenje izraza

Za svrhe ove ispitne metode podrazumijeva se da je:

EC_x (koncentracija povezana sa x% odgovora) - koncentracija koja proizvodi x% efekta na ispitnim organizmima u toku datog vremena izlaganja u poređenju sa kontrolom. Na primjer, EC_{50} je koncentracija za koju se procjenjuje da uzrokuje efekat na ispitnom parametru praćenja kod 50% izložene populacije za vrijeme izlaganja. U ovom ispitivanju, koncentracije s efektom iskazuju se kao masa ispitivane hemikalije po suvoj masi ispitnog zemljišta,

LC_0 (neletalna koncentracija) – koncentracija ispitivane hemikalije koja ne uzrokuje smrt nijednog izloženog ispitnog organizma u toku datog vremenskog perioda. U ovom ispitivanju
LC_0 se iskazuje kao masa ispitivane hemikalije po suvoj masi ispitivanog zemljišta,

LC_{50} (srednja letalna koncentracija) – koncentracija ispitne hemikalije koja uzrokuje smrt kod 50% izloženih ispitnih organizama u toku datog vremenskog perioda. U ovom ispitivanju LC_{50} se iskazuje kao masa ispitne hemikalije po suvoj masi ispitnog zemljišta,

LC_{100} (apsolutna letalna koncentracija) – koncentracija ispitivane hemikalije koja izaziva smrt kod 100% izloženih organizama u toku datog vremenskog perioda. U ovom ispitivanju LC_{100} se iskazuje kao masa ispitivane hemikalije po suvoj masi ispitnog zemljišta,

LOEC (najniža koncentacija sa vidljivim efektom) – najniža koncentracija ispitivane hemikalije sa statistički značajnim efektom ($p < 0,05$). U ovom ispitivanju LOEC se iskazuje kao masa ispitivane hemikalije po suvoj masi ispitnog zemljišta ili kao masa ispitivane hemikalije po jedinici površine zemljišta. Po pravilu sve ispitne koncentracije iznad LOEC-a treba da pokazuju efekat koji se statistički razlikuje od kontrole. Sva odstepena od navedenog pri odreĐivanju LOEC-a moraju se obrazložiti u izvještaju o ispitivanju,

NOEC (koncentracija bez vidljivog efekta) – najviša koncentracija ispitivane hemikalije bez vidljivog efekta odmah ispod najniže koncentracije sa vidljivim efektom. U ovom ispitivanju, koncentracija koja odgovara NOEC-u nema statistički značajan efekat ($p < 0,05$) u toku datog vremena izlaganja u poreĐenju sa kontrolom,

stopa reprodukcije – srednji broj mladih jedinki crva izleglih od datog broja odraslih jedinki u toku ispitnog vremena, **ispitivana hemikalija** – svaka supstanca ili smješa koja se ispituje pomoću ove metode.

Dodatak 2

Određivanje maksimalnog vodnog kapaciteta zemljišta

Sljedeća metoda pokazala se kao odgovarajuća za određivanje maksimalnog vodnog kapaciteta zemljišta. Ta metoda opisana je u Aneksu C standarda MEST ISO DIS 11268-2.

Zahvati se utvrĐena količina (npr. 5 gr) zemljišta, odnosno ispitnog supstrata odgovarajućim instrumentom (uzorkivačem sa epruvetom (auger tube) itd.). Prekrije se dno epruvete komadom filter papira, epruveta se napuni vodom, pa se smješti na rešetku u kupatilo s tečnošću. Epruveta se postepeno prastvara sve dok nivo vode ne bude iznad površine zemljišta. Zatim se ostavlja u vodi na tri sata. Budući da se u zemljištu ne može zadržati sva voda koju upiju kapilari, uzorak zemljišta treba da se ostavi da se cijedi dva sata tako što se epruveta stavi na podlogu od veoma mokrog, fino usitnjenog kvarcnog pijeska u zatvorenoj posudi (da bi se spriječilo sušenje). Uzorak se nakon toga vaga i suši do stalne mase na 105°C. Vodni kapacitet (WHC) se zatim iizračunava na sljedeći način:

$$WHC\ \%\ suve\ mase\ = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

gdje je: S= supstrat zasićen vodom + masa epruvete + masa filter papira, T=tara (masa epruvete + masa filter papira),D=suva masa supstrata.

Dodatak 3

Određivanje pH vrijednosti zemljišta

Sljedeća metoda određivanja pH vrijednosti zemljišta zasniva se na opisu u standardu ISO DIS 10390: Kvalitet zemljišta – Određivanje pH vrijednosti.

Definisana količina zemljišta suši se na sobnoj temperaturi najmanje 12 sati. Zatim se pravi suspenzija zemljišta (sadrži najmanje 5 grama zemljišta) sa petostruko većom količinom 1 M rastvora kalijum hlorida (Kcl) analitičkog stepena čistoće ili 0,01 M rastvora kalcijum hlorida ($CaCl_2$) analitičkog stepena čistoće. Suspenzija se zatim snažno mućka pet minuta, pa se ostavlja da se taloži najmanje dva sata, ali ne duže od 24 sata. Zatim se mjeri pH vrijednost tečne faze pomoću pH-metra koji se prije svakog mjerenja kalibriše odgovarajućim nizom puferskih rastvora (npr. pH 4,0 i 7,0).

Dodatak 4

Uzgoj vrsta Eisenia fetida/Eisenia andrei

Uzgoj se po mogućnosti vrši u klimatskim komorama na temperaturi od 20 °C ± 2 °C. Na toj temperaturi, i uz dodatak dovoljne količine hrane, gliste sazrijevaju nakon približno dva do tri mjeseca.

Obije vrste mogu se uzgajati u raznim vrstama životinjskog Đubriva. Preporučeni medijumum za uzgajanje je smješa konjskog ili kravljeg Đubriva i treseta u odnosi 50:50. Potrebno je obaviti provjere da bi se osiguralo da krave ili konji od kojih je dobijeno Đubrivo nisu podvrgnuti medikamentoznom liječenju ili tretirani hemikalijama, kao što su stimulatori rasta, nematicidi ili slični veterinarski proizvodi koji bi mogli imati štetan uticaj na gliste za vrijeme ispitivanja. Preporučuje se direktno sakupljanje Đubriva iz „organskih— izvora, budući da je iskustvo pokazalo da komercijalno dostupna Đubriva koja se koriste kao baštenska gnojiva mogu štetno djelovati na gliste. Medijumum treba da ima pH vrijednost od približno 6 do 7 (reguliše se kalcijum-karbonatom), nisku jonsku provodljivost (manje od 6mg ili 0,5% koncentracije soli) i ne smije biti prekodnosno kontaminiran amonijakom ili životinjskim urinom. Kutije za uzgoj koje se mogu koristiti treba da imaju zapreminu od 10 do 50 litara.

Da bi se dobile gliste standardne starosti i veličine (mase), uzgoj je najbolje početi kokonima. Kada se kultura uspostavi, održava se spuštanjem odraslih jedinki glista u kutije za uzgajanje sa svježim supstratom na 14 do 28 dana da bi se omogućilo da se dobiju novi kokoni. Odrasle jedinke se zatim uklanjaju da bi se mlade koje se dobiju iz kokona koristile kao baza za narednu kulturu. Gliste se zatim neprestano prehranjuju životinjskim otpadom i povremeno premještaju u svježi supstrat. Iskustvo je pokazalo da fino izmrvljeno, na vazduhu sušeno kravlje ili konjsko Đubrivo ili ovseno brašno može biti adekvatna hrana. Potrebno je obezbijediti da krave, odnosno konji, od kojih se dobija Đubrivo nisu podvrgnuti medikamentoznom tretiranju hemikalijama, kao što su stimulatori rasta, koji bi mogli imati štetno dejstvo na uzgoj glista u dužem vremenskom periodu. U periodu kada se koriste za ispitivanje, gliste koje se izlegu iz kokona stare su između 2 i 12 mjeseci, kada se i smatraju odraslim jedinkama.

Gliste se mogu smatrati zdravim ako se kreću kroz supstrat, ne pokušavaju da izaĐu iz njega i neprestano se razmnožavaju. Na iscrpljenost supstrata ukazuje veoma sporo kretanje glista, kao i žuta prebojenost zadnjeg kraja tijela. U tom slučaju preporučuje se da se obezbijedi svježi supstrat i/ili smanji broj jedinki po jedinici zapremine.

Dodatak 5

Tehnike prebrojavanja mladih jedinki glista izleglih iz kokona

Ručno izdvajanje glista iz supstrata zahtijeva mnogo vremena. Zato se preporučuju dvije alternativne metode:

Ispitne posude stave se u kupatilo sa tečnošću pri početnoj temperaturi od 40°C koja se kasnije podiže na 60 °C. Poslije približno 20 minuta, mlade jedinke glista pojavljuju se na površini zemljišta sa koje se lako mogu uzeti i prebrojati. Ispitno zemljište može se oprati kroz sito pomoću metode koju su razvili Van Gestel i dr. (1), pod uslovom da su treset i Đubrivo ili ovseno brašno koji su dodati u zemljište fino sprašeni. Dva sita sa mrežnim otvorom veličine 0,5 mm (prečnika 30 cm) stavljaju se jedno na drugo. Sadržaj ispitne posude ispira se kroz sita pod snažnim mlazom vode sa slavine, pri čemu se mlade jedinke glista i kokoni uglavnom zadržavaju na gornjem situ. Važno je da se napomene da površina gornjeg sita mora biti sasvim potopljena u vodi za vrijeme ovog postupka tako da mlade jedinke glista plutaju na sloju vode, što će onemogućiti da pobjegnu kroz otvore u situ. Najbolji rezultati postižu se upotrebom tuša.

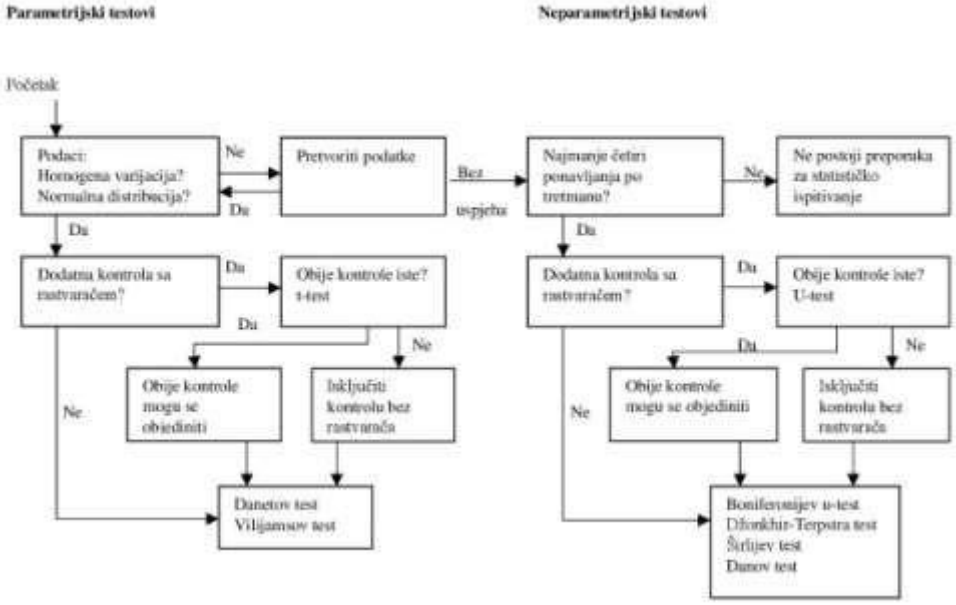
Kada se sav supstrat isprao kroz sito, mlade jedinke glista i kokoni mogu se isprati iz gornjeg sita u zdjelu. Sadržaj zdjele se zatim ostavi da stoji, čime se omogućava da prazni kokoni plutaju na površini vode, a da puni kokoni i mlade jedinke glista potonu na dno. Stajaća voda se zatim može prosuti, a mlade jedinke glista i kokoni mogu se prenijeti u Petrijevu šolju u kojoj se nalazi mala količina vode. Gliste se odatle mogu ukloniti uz pomoć igle ili pincete da bi se prebrojale.

Iskustvo pokazuje da je metoda (a) bolja za ekstrahovanje mladih jedinki glista koje se mogu oprati i kroz sito sa mrežnim otvorom od 0,5 mm.

Uvijek je potrebno utvrditi efikasnost metode koja se koristi za izdvajanje glista (i kokona, po potrebi) iz supstrata. Ako se izdvajanje mladih jedinki vrši ručno, preporučuje se da se postupak obavi dva puta na svim uzorcima.

Dodatak 6

Pregled statističke procjene podataka (utvrĐivanje vrijednosti NOEC)


Parametrijski testovi
Neparametrijski testovi
Početak
Podaci:
Homogena varijacija?
Normalna distribucija?
Ne
Da
Pretvoriti podatke
Bez uspjeha
Najmanje četiri ponavljanja po tretmanu?
Ne
Ne postoji preporuka za statističko ispitivanje
Da
Dodatna kontrola sa rastvaračem?
Da
Obije kontrole iste?
t-test
Da
Ne
Obije kontrole mogu se objediniti
Isključiti kontrolu bez rastvarača
Ne
Dunnetov test
Viljamsov test
Dodatna kontrola sa rastvaračem?
Da
Obije kontrole iste?
U-test
Da
Ne
Obije kontrole mogu se objediniti
Isključiti kontrolu bez rastvarača
Ne
Bonferonijev u-test
Dfonkhir-Terpstra test
Širlijev test
Danov test

C.34. UTVRĐIVANJE INHIBICIJE DEJSTVA ANAEROBNIH BAKTERIJA – SMANJENJE PROIZVODNJE GASA IZ ANAEROBNE RAZGRADNJE (OTPADNIH VODA) MULJA

1. Uvod

Ova metoda ispitivanja odgovara ispitnoj smjernici OECD-a (TG) 224 (2007). Hemikalije koje se ispuštaju u vodenu sredinu prolaze i kroz aerobne i anaerobne zone gdje se mogu ili razgraditi i/ili inhibirati dejstvo bakterija; u nekim slučajevima mogu neporemećene ostati u anaerobnim zonama decenijama ili duže. U preradi otpadnih voda, prva faza, odnosno primarni tretman, aeroban je u tečnosti iznad taloga, a anaeroban u nataloženom mulju. Za tom fazom, u sekundarnom tretmanu, slijedi aerobna zona u aeracionom bazenu sa aktivnim muljem i anaerobna zona u sedimentacionom rezervoaru sa nataloženim muljem. Mulj iz obije faze se uobičajeno podvrgava anaerobnom tretmanu, iz čega nastaju metan i ugljen-dioksid koji se uglavnom koriste za proizvodnju električne energije. U široj sredini, hemikalije koje stižu do sedimenata u zalivima, ušćima i moru vjerovatno će ostati u tim anaerobnim zonama neograničeno vrijeme ako nisu biorazgradljive. Veće količine nekih hemikalija stići će do tih zona zbog svojih fizičkih svojstava kakva su niska rastvorljivost u vodi, visoka adsorpcija na suspendovane čvrste materije, kao i svojstva aerobne bionerazgradljivosti.

Mada je poželjno da su hemikalije koje se ispuštaju u životnu sredinu biorazgradljive i u aerobnim i u anaerobnim uslovima, ključno je da te hemikalije ne inhibiraju djelovanje mikroorganizama ni u jednoj od tih zona. U Velikoj Britaniji bilo je nekoliko slučajeva potpune inhibicije proizvodnje metana koju je uzrokovao, na primjer, pentahlorofenol iz industrijskih ispusta, zbog čega su nastali visoki troškovi transportovanja inhibiranog mulja iz digestora na „bezbjedna— mjesta, kao i troškovi uvoza zdravog digestiranog mulja iz susjednih postrojenja. Dogodio se, međutiim, i veliki broj slučajeva kada je nekoliko drugih hemikalija, meĐu kojima su alifatski halogeni ugljovodonici (hemijsko čišćenje) i detergenti, dalo manje ozbiljna remećenja digestije, ali je dovelo do značajnog slabljenja efikasnosti digestora.

Samo jedna metoda ispitivanja, C.11, bavi se inhibicijom bakterijskog djelovanja (udisanje aktivnog mulja), i ona podrazumijeva procjenu dejstva ispitivanih hemikalija na stepen potrošnje kiseonika u prisustvu supstrata. Ta metoda široko se primjenjuje da blagovremeno upozori na moguće štetno djelovanje hemikalija na postupak aerobnog tretiranja otpadnih voda, kao i da ukaže na neinhibitorne koncentracije ispitivanih hemikalija koje će se koristiti u različitim testovima biorazgradljivosti. Ispitna metoda C.43 (2) pruža ograničenu mogućnost određivanja toksičnosti ispitivane hemikalije na proizvodnju gasa iz anaerobnog mulja, razrijeđenog na jednu desetinu svoje uobičajene koncentracije čvrstih materija, da bi se omogućila potrebna preciznost u procjeni procenta biorazgradljivosti. Zbog činjenice da razblaženi mulj može biti osjetljiviji na inhibitorne hemikalije, grupa ISO odlučila je da pripremi metodu koja podrazumijeva upotrebu nerazrijeđenog mulja. Razmotrena su najmanje tri teksta (iz Danske, Njemačke i Velike Britanije) da bi konačno bila pripremljena dva standarda ISO, jedan koji podrazumijeva upotrebu nerazrijeđenog mulja, MEST ISO 13 641-1 i drugi kod kojega se upotrebljava sto puta razrijeđeni mulj, MEST ISO 13 641-2 koji predstavlja mulj i taloge u kojima postoji niska zastupljenost populacija bakterija. Obije metode bile su podvrgnute uporednom ispitivanju (5); prva je potvrĐena kao prihvatljivi standard, dok je druga bila predmet rasprave. U Velikoj Britaniji su smatrali da je metodu potrebno dodatno ispitivati, zato što je značajan udio učesnika prijavio vrlo malu proizvodnju gasa, odnosno nije ni prijavio proizvodnju gasa, dijelom zbog toga što je procenat gasnog prostora bio previše visok (75%) za optimalnu osjetljivost.

U ranijim radovima u V. Britaniji opisana je manometarska metoda koja podrazumijeva upotrebu nerazrijeđenog mulja sa sirovim kanalizacionim muljem kao supstratom u balonima od 500 ml; aparatura je bila glomazna, a miris sirovog mulja agresivan. Kasnije su kompaktniju i prikladniju aparaturu Šeltona i Titjea (Shelton and Tiedje) koju su razvili Baterzbi i Vilson (Battersby and Wilson) (9) uspješno primijenili Vilson i dr. Kavahara i dr. (11) uspješno su u laboratorijai pripremili mulj koji više odgovara zahtjevima standarda sa ciljem da se koristi u ispitivanjima anaerobne biorazgradljivosti i inhibicije na više hemikalija. Zamijenjen je i sirovi mulj kako bi se testiranje vršilo ili sa sto puta razrijeđenim anaerobnim muljem ili sa blatom, sedimentima, itd. sa niskom aktivnošću bakterija.

Ova metoda može pružiti korisne informacije za predviĐanje vjerovatnog dejstva ispitivane hemikalije na proizvodnju gasa u anaerobnim digestorima. Samo duža ispitivanja, međutiim, koja dostojnije simuliraju rad digestora mogu pokazati da li može doći do adaptacije mikroorganizama na ispitivanu hemikaliju ili da li se hemikalija koja će se apsorbovati ili adsorbovati na mulj može nataložiti do toksične koncentracije u dužem vremenskom periodu nego što je predviĐeno ovim ispitivanjem.

1.1 Princip ispitivanja

Alikvoti smješe anaerobno digestovanog mulja (od 20 g/l do 40 g/l ukupnih čvrstih materija) i rastvora razgradljivog supstrata inkubiraju se posebno i istovremeno sa nizom koncentracija ispitivane hemikalije u zapečaćenim posudama do tri dana. Količina gasa koja se proizvede (metan i ugljen-dioskid) mjeri se porastom pritiska (Pa) u bocama.

Procenti inhibicije proizvodnje gasa do kojih se dolazi različitim koncentracijama ispitivane hemikalije računaju se od količina koje se proizvedu u odgovarajućim ispitnim i kontrolnim bocama. Vrijednosti EC_{50} i drugih koncentracija koje proizvode odgovor računaju se na osnovu dijagrama procenta inhibicije zavisno od koncentracije ispitivanih hemikalija ili, češće, njenog logaritma.

1.2 Informacije o ispitivanoj hemikaliji

Ispitivane hemikalije trebalo bi koristiti uglavnom u najčistijem obliku koji je lako dostupan, zato što nečistoće u pojedinim hemikalijama, npr. hlorofenoli, mogu biti znatno toksičnije od same ispitivane hemikalije. Potrebno je, međutiim, razmotriti i potrebe da se hemikalije ispituju u obliku u kojem se proizvode/stavljaju na tržište. Korišćenje formulisanih proizvoda uobičajeno se ne preporučuje, ali upotreba formulisanog materijala može biti opravdana za slabo rastvorljive ispitivane hemikalije. Svojstva ispitivane hemikalije kojima se mora rapolagati obuhvataju: rastvorljivost u vodi i nekim organskim rastvaračima, napon pare, koeficijent adsorpcije, hidrolizu i biorazgradljivost u anaerobnim uslovima.

1.3 Primjenjivost metode

Ispitivanje je primjenjivo na hemikalije koje su rastvorljive ili nerastvorljvie u vodi, uključujući i isparljive hemikalije. Potreban je, međutiim, poseban oprez sa materijalima koji pokazuju nisku rastvorljivost u vodi i visoku isparljivost. Mogu se koristiti i inokulumi sa drugih anaerobnih mjesta, npr. blata, zasićenih zemljišta, sedimenata. Anaerobni bakterijski sistemi koji su prethodno bili izloženi toksičnim hemikalijama mogu se prilagoditi da održavaju svoje djelovanje u prisustvu ksenobiotskih hemikalija. Inokulumi iz prilagoĐenih

bakterijskih sistema mogu pokazati viši stepen tolerancije na ispitivane hemikalije u poreĐenju sa inokulumima koj se dobijaju iz neprilagoĐenih sistema.

1.4 Referentne hemikalije

Sa ciljem da se postupak provjeri, u sklopu redovnog ispitivanja vrši se paralelno ispitivanje referentne hemikalije u odgovarajućim posudama; 3, 5-dihlorfenol pokazao se kao tipičan inhibitor anaerobne proizvodnje gasa, kao i potrošnje kiseonika aktivnog mulja i drugih biohemijskih reakcija. Pokazalo se da druge dvije hemikalije, metilen bis-tiocijanat i pentahlorofenol, imaju veće inhibitorno dejstvo na proizvodnju metana od 3, 5dihlorofenola, ali rezultati ispitivanja u kojima su korišćene te dvije hemikalije nisu potvrĐeni. Pentahlorofenol se ne preporučuje zbog slabije dostupnosti u čistom obliku.

1.5 Reproduktivnost rezultata

Na meĐunarodnom uporednom ispitivanju (5), postignuta je samo osrednja reproduktivnost vrijednosti EC_{50} za 3, 5-dihlorofenol i 2-bromoetan sulfonsku kiselinu između deset laboratorijaa koje su učestvovale u testiranju. (Oblast za 3,5-dihlorofenol iznosila je od 32 mg/l do 502 mg/l a za 2-bromoetan sulfonsku kiselinu od 220 mg/l do 2 190 mg/l.)

Broj laboratorijaa	Kao mg/l				Kao mg/g mulja	
	srednja vrijednost	s.d.	cv(%)	srednja vrijednost	s.d.	cv(%)
	3, 5-dihlorofenol					
10	153	158	103	5	4,6	92
	2-bromoetan sulfonska kiselina					
10	1 058	896	85	34	26	76

Podaci o vrijednosti EC_{50} iz uporednog testa – nerazrijeđeni mulj

Visoki koeficijent varijacije između laboratorijaa u velikoj mjeri odražava razlike u osjetljivosti mikroorganizama u mulju bilo zbog prethodnog izlaganja ili zbog neizlaganja ispitivanoj hemikaliji ili drugim, u hemijskom smislu srodnim, hemikalijama. Preciznost kojom je utvrĐena vrijednost EC_{50} na osnovu koncentracije mulja bila je neznatno bolja od vrijednosti postignute volumetrijskom metodom analize (mg/l). Kod tri laboratorijae koje

su prijavile preciznost svojih vrijednosti EC_{50} za 3,5 -dihlorofenol, javili su se znatno niži koeficijenti varijacije (22, 9, i 18% za EC_{50} mg/g) u odnosu na srednje vrijednosti svih deset laboratorijaa zajedno. Pojedinačne srednje vrijednosti za te tri laboratorijae iznosile su 3,1, 3,2 i 2,8 mg/g. Činjenica da se u samim laboratorijaama javljaju niži prihvatljivi

koeficijenti varijacije u poreĐenju sa mnogo višim koeficijentima varijacije u vrijednostima između laboratorijaa, i to od 9% do 22% naspram 92%, ukazuje na to da postoje značajne razlike meĐu svojstvima pojedinačnih muljeva.

2. Opis metode

Aparatura

Pored standardne laboratorijaske opreme, potrebna je i sljedeća oprema:

inkubator – da ne proizvodi varnice i da reguliše temperaturu na 35 °C ± 2 °C;

ispitne posude sa staklom otpornim na pritisak odgovarajuće nominalne veličine, opremljeni septumom obloženim gasno nepropusnim filmom, koji podnosi pritisak od približno 2 bara ili 2 × 105 Pa (za oblaganje koristiti npr. PTFE = politetrafluoretilen). Preporučuju se staklene serum-boce nominalne zapremine od 125 ml, stvarne zapremine od 160 ml, zapečaćene septumima za serum-bocei aluminijumskim prstenom sa navojima, ali i boce ukupne zapremine od 0,1 l do 1 l mogu se uspješno koristiti;precizni mjerač pritiska i dodatak s iglama

Ukupna proizvodnja gasa (metana i ugljen dioksida) mjeri se pomoću mjerača pritiska koji je podešen tako da omogući mjerenje i ispuštanje proizvedenog gasa. Primjer instrumenta koji se može koristiti je ručni precizni mjerač pritiska na koji je pričvršćenja injekciona igla; trokraki gasno nepropusni ventil omogućava otpuštanje suvišnog pritiska (Dodatak 1). Unutrašnja zapremina cijevi i ventila pretvarača pritiska mora se održavati što nižom, tako da greške do kojih dolazi zbog zanemarivanja zapremine opreme budu neznatne; izolovane posude, za transport mulja u digestiji;

trokraki ventili za regulaciju pritiska;sito sa mrežnim otvorom veličine 1 mm;

rezervoar za razgradnju mulja, čaša ili boca od polietilena velike gustine, zapremine približno 5 litara, sa mješalicom i opremom za protok gasnog azota kroz parni dio rezervoara;

membranski filteri (0,2 µm) za sterilizaciju supstrata;

mikro špricevi, za gasno nepropusno spajanje pretvarača pritiska (v. stav 12 tačka (c)) sa parnim prostorom u bocama; potrebni su i za dodavanje nerastvorljivih tečnih ispitnih materijala u boce; suva kutija, sa blagim pozitivnim pritiskom azota, preporučuje se ali nije obavezna.

Reagensi

Za vrijeme ispitivanja potrebno je koristiti reagense analitičkog stepena čistoće. Do kraja testa potrebno je koristiti azot visoke čistoće sa sadržajem kiseonika manjim od 5 µl/l.

Voda

Kada je u nekoj od faza potrebno izvršiti razblaživanje, koristi se dejonizovana voda koja je prethodno deaerisana. Nije potrebno vršiti analitičke kontrole takve vode, ali je potrebno obezbijediti redovno održavanje dejonizatora. Dejonizovana voda se upotrebljava i za pripremu osnovnih rastvora. Prije dodavanja anaerobnog inokuluma u bilo koji rastvor i razblaženje ispitnog materijala, mora se osigurati da se u njima ne nalazi kiseonik. To se postiže ili jednosatnim uduvavanjem gasnog azota kroz vodu za razblaživanje (ili kroz razblaženja) prije dodavanja inokuluma ili zagrijavanjem vode za razblaživanje do tačke ključanja i hlađenjem na sobnu temperaturu u atmosferi bez kiseonika.

Digestovani mulj

Mulj usred aktivne digestije sakupi se iz digestora u postrojenju za preradu otpadnih voda u kojem se nalaze pretežno komunalne otpadne vode ili iz laboratorijaskog digestora. U slučaju kada će biti upotrijebljen prilagođeni inokulum, može se razmotriti i upotreba mulja u fazi razgradnje iz postrojenja za preradu industrijskih otpadnih voda. Za sakupljanje mulja koriste se boce sa širokim grlom, napravljene od polietilena velike gustine ili sličnog materijala, koje se mogu širiti. Mulj se dodaje u boce za uzimanje uzoraka do približno 1 cm od vrha, boce se dobro zatvore, po mogućnosti sigurnosnim ventilom), i stave u izolovane posude da bi se umanjio temperaturni šok, gdje ostaju sve dok se ne premjeste u inkubator čija se temperatura održava na 35°C ± 2 °C. Prilikom otvaranja boca, potrebno je povesti računa da se ispusti višak napona pare bilo pažljivim odvrtanjem čepa ili uz pomoć trokrakog ventila za ispuštanje pritiska. Preporučljivo je iskoristiti mulj u roku od nekoliko sati od sakupljanja ili ga držati na 35 °C ± 2 °C pod parnim prostorom sa gasnim azotom do tri dana, kada se obično javlja neznatan gubitak aktivnosti.

Upozorenje – Mulj u fazi razgradnje proizvodi zapaljive gasove koji predstavljaju opasnost od požara i eksplozije: on istovremeno sadrži i potencijalno patogene organizme, pa je potreban odgovarajući oprez pri rukovanju. Iz bezbjednosnih razloga, za sakupljanje mulja ne smiju se koristiti staklene posude.

Inokulum

Neposredno prije upotrebe, mulj se miješa blagim pokretima i sije kroz sito mrežnog otvora od 1 mm^2 (kroz čiji se parni prostor propušta mlaz azota. Izdvaja se uzorak za mjerenje koncentracije ukupnih suvih materija (v. npr. standard MEST ISO 11 923).

Uobičajeno, koristi se nerazrijeđeni mulj. Koncentracija čvrstih materija obično se kreće između 2% i 4% (w/v). Provjerava se pH vrijednost mulja i, po potrebi, reguliše tako da iznosi 7 ± 0,5.

Ispitni supstrat

Rastvara se 10 g hranljivog bujona (npr. Oxoid), 10 g ekstrakta kvasca i 10 g D-glukoze u dejonizovanoj vodi i razblaži do 100 ml. Steriliše se filtriranjem kroz membranski filter od 0,2 µm i odmah iskoristi ili čuva na 4 °C najduže jedan dan.

Ispitivana hemikalija

Pripremi se poseban osnovni rastvor za svaku ispitivanu hemikaliju rastvorljivu u vodi i to tako da rastvor sadrži, na primjer, 10 g/l hemikalije u vodi za razblaživanje u kojoj nema kiseonika. Od odgovarajuće zapremine tih osnovnih rastvora pripremaju se reakcione smješe koje sadrže gradirane koncentracije. Alternativno, priprema se niz razblaženja svakog osnovnog rastvora da bi zapremina koja se dodaje u ispitne boce bila ista za sve potrebne krajnje koncentracije. Po potrebi, reguliše se pH vrijednost osnovnog rastvora tako da iznosi 7 ± 0,2.

Za ispitivane hemikalije koje nisu dovoljno rastvorljive u vodi, primjenjuje se postupak u skladu sa standardom MEST ISO 10 634 (12) ili ekvivalentnim standardom EU. Kada je potrebno koristiti organski rastvarač, izbjegavaju se rastvarači poput hloroforma ili ugljenik tetrahlorida za koje je poznato da snažno inhibiraju proizvodnju metana. Pripremi se rastvor odgovarajuće koncentracije hemikalije nerastvorljive u vodi u odgovarajućem isparljivom rastvaraču, na primjer, acetonu ili dietil-etru. Dodaju se potrebne zapremine rastvora sa rastvaračem u prazne ispitne boce i rastvarač isparava prije dodavanja mulja. Za druge postupke treba se pozvati na MEST ISO 10 634 ili ekvivalentni standard EU, ali je potreban oprez zato što svi surfaktanti koji se koriste za spravljanje emulzija mogu imati inhibitorno dejstvo na anaerobnu proizvodnju gasa. Ako se smatra da prisustvo organskih rastvarača i agenasa za emulzifikaciju urokuje pojavu nusprodukata, ispitivana hemikalija može se dodavati direktno u ispitnu smješu u vidu praška ili tečnosti. Isparljive hemikalije i tečne ispitivane hemikalije koje nisu rastvorljive u vodi mogu se ubrizgavati u inokulirane serum-boce uz pomoć mikrošpriceva.

Ispitivane hemikalije dodaju se u boce da bi se postigao geometrijski niz koncentracija, npr. 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l i 15,6 mg/l. Ako nije poznata oblast toksičnosti za srodne hemikalije, prvo se sprovodi preliminarni test za određivanje oblasti toksičnosti koncentracija sa koncentracijama od 1 000 mg/l, 100 mg/l i 10 mg/l.

Referentna hemikalija

Pripremi se vodeni rastvor od 3,5 dihlorfenola (10 g/l) postepenim dodavanjem minimalne količine od 5 mol/l rastvora natrijum-hidroksida u čvrstu materiju i sve vrijeme se mućka dok se ne rastvori. Zatim se dodaje deoksigenizovana voda za razblaživanje dok se ne dobije potrebna zapremina; ultrazvučna obrada može da pomogne kod rastvaranja. Druge referentne hemikalije mogu da se koriste kada se postigne prosječan niz vrijednosti EC_{50} u najmanje tri testa sa različitim inokulumima (različiti izvori ili drugo vrijeme sakupljanja).

Smetnje/greške

Neki sastojci mulja mogli bi da odreaguju sa potencijalnim inhibitorima čime bi učinili da oni postanu nedostupni za mikroorganizme i dovedu do slabijeg inhibitornog dejstva ili nedostatka tog dejstva. Ako mulj već sadrži hemikaliju koja proizvodi inhibitorno dejstvo, mogao bi se dobiti pogrešan rezultat kada bi se ispitivanje vršilo sa tom hemikalijom. Osim tih mogućnosti, postoji i izvjestan broj prepoznatih činilaca koji mogu dati lažne rezultate. Ti činioci dati su u Dodatku 3, zajedno sa metodama eliminacije, odnosno smanjenja grešaka.

2.2 Postupak ispitivanja

Broj potrebnih ponavljanja zavisi od stepena preciznosti potrebnog za indekse inhibicije. Ako su zaptivci na bocama dovoljno gasno nepropusni do kraja ispitivanja, priprema se samo jedna serija (najmanje tri ponavljanja) ispitnih boca za svaku potrebnu koncentraciju. Pripremi se jedna serija boca sa referentnom hemikalijom i jedna serija kontrola. Međutiim, ako su zaptivci na bocama pouzdani da izdrže samo jedan ili nekoliko uboda, pripremi se serija ispitnih boca (npr. tri ponavljanja) za svaki interval (t) za koji se traže rezultati za sve koncentracije ispitivane hemikalije koje je potrebno ispitati. Slično, pripreme se serije boca „t— i za referentnu hemikaliju i za kontrole.

Preporučuje se upotreba suve kutije (stav 12 tačka (j)). Najmanje 30 minuta prije početka ispitivanja, pusti se mlaz gasnog azota kroz suvu kutiju koja sadrži svu neophodnu opremu. Potrebno je obezbijediti da temperatura mulja za vrijeme rukovanja i pečaćenja boca iznosi 35 °C ± 2 °C.

Preliminarno ispitivanje

Ako je aktivnost mulja nepoznata, preporučuje se da se izvede preliminarno ispitivanje. Pripreme se kontrole sa koncentracijama čvrstih materija od 10 g/l, 20 g/l i 40 g/l i supstratom, ali bez ispitivane hemikalije. Koriste se i različite zapremine reakcione smješe tako da se dobiju tri ili četiri različita odnosa zapremine parnog prostora i zapremine tečnosti. Na osnovu rezultata o zapremini gasa koji se proizvede u različitim vremenskim intervalima, biraju se optimalni uslovi koji omogućavaju dva mjerenja dnevno u kojima se proizvedu značajne zapremine gasa i dnevno ispuštanje gasa pri optimalnoj osjetljivosti (*) bez rizika od eksplozije. To se primjenjuje na postavku i uslove eksperimenta u kojima se zapremina proizvedenog gasa – iz slijepih proba i posuda koje pokazuju inhibiciju od 70 do 80 % – može procijeniti uz prihvatljive granice dozvoljenih grešaka.

Dodavanje ispitivanih hemikalija

Ispitivane hemikalije rastvorljive u vodi dodaju se u prazne ispitne boce u vidu vodenih rastvora. Za svaku koncentraciju iz određene oblasti koncentracija koriste se nizovi boca dovoljni za najmanje tri ponavljanja. Kod nerastvorljivih i slabo rastvorljivih ispitivanih hemikalija, rastvori tih hemikalija u organskim rastvaračima ubrizgavaju se pomoću mikrošprica u prazne boce tako da se dobiju nizovi ponavljanja svih pet koncentracija ispitivane hemikalije. Rastvarač se ispari ispuštanjem mlaza gasnog azota preko površine rastvora u ispitnim bocama. Alternativno, direktno u ispitne boce dodaju se odmjerene količine nerastvorljive čvrste hemikalije.

Ako se dodavanje nerastvorljivih i slabo rastvorljivih u vodi ispitivanih hemikalija ne vrši dodavanjem rastvarača, onda se to čini njihovim direktnim ubrizgavanjem mikrošpricem u ispitne boce nakon što se doda inokulum i ispitni supstrat. Na isti način mogu se dodavati i isparljive hemikalije.

Dodavanje inokuluma i supstrata

Odgovarajuća količina prosijanog mulja koji se digestira promiješa se u boci od 5 litara pri čemu se kroz parni prostor boce ispušta mlaz gasnog azota. Ispitne boce koje sadrže vodeni rastvor ili rastvor ispitivane hemikalije u isparenom rastvaraču ispiraju se mlazom gasnog azota približno dva minuta kako bi iz njih izašao vazduh. Iz dobro izmiješanog mulja

odijele se alikvoti od npr. 100 ml u ispitne boce pomoću pipete sa velikim nastavkom ili menzure. Ključno je da se pipeta iz jednog pokušaja tačno napuni muljem do potrebne zapremine, zato što se čvrste materije iz mulja brzo talože. Ako se zahvati više od potrebne količine, pipeta se isprazni i počne se ponovo.

Zatim se dodaje dovoljna količina rastvora supstrata da se dobije koncentracija koja sadrži po 2 g/l hranljivog bujona, ekstrakta kvasca i D-glukoze u smješi pri čemu se još uvijek vrši ispiranje gasnim azotom. Slijedi primjer ispitnih serija.

Krajnja masena koncentracija ispitivane hemikalije u ispitnim bocama (mg/l)	Zapremina ispitivane hemikalije (ml)		Reagensi i medijumumi (ml)		
	Osnovni rastvor (a)10 g/l	Osnovni rastvor (b)1 g/l	Voda za razblaživanje	Inokulum	Supstrat
0	—	0	1,0	100	2
1	—	0,1	0,9	100	2
3,3	—	0,33	0,67	100	2
10	0,1	—	0,9	100	2
33	0,33	—	0,67	100	2
100	1,0	—	0	100	2

Ukupna zapremina boce = 160 ml. Zapremina tečnosti = 103 ml

Zapremina gasa = 57 ml, ili 35,6 % ukupne zapremine.

Na isti način, gasnim azotom potrebno je isprati dovoljan broj praznih ispitnih boca u slučaju rada sa isparljivim i nerastvorljivim ispitivanim hemikalijama.

Kontrole i referentna hemikalija

Pripreme se nizovi boca za najmanje tri ponavljanja tako da se u bocama nalaze samo mulj i supstrat koji služe za kontrolu. Za naredna ponavljanja pripremaju se boce koje sadrže mulj, supstrat i dovoljnu količinu osnovnog rastvora referentne hemikalije, odnosno 3,5 dihlorfenola (stav 21) da se dobije krajnja koncentracija od 150 mg/l. Ta koncentracija treba da inhibira proizvodnju gasa za približno 50%. Alternativno, pripremi se niz koncentracija referentne hemikalije. Zatim se za mjerenje pH vrijednosti pripreme dodatne četiri boce koje sadrže mulj, deoksigenizovanu vodu i supstrat. U dvije boce doda se ispitivana hemikalija pri najvišim koncentracijama koje se ispituju, a u preostale dvije boce doda se deoksigeniziovana voda.

Potrebno je postarati se da sve boce– sa ispitivanim i referentnim hemikalijama, kao i kontrole – sadrže istu zapreminu (VR) tečnosti; po potrebi se dodaje deoksigenizovana dejonizovana voda da se postigne odgovarajuća zapremina. Parni prostor treba da iznosi između 10% i 40% zapremine boce, a tačna vrijednost bira se na osnovu podataka dobijenih u preliminarnom ispitivanju. Nakon što se u boce dodaju svi sastojci, izvlači se igla kojom se dovodi gas i svaka boca se zapečati gumenim zapušačem i aluminijumskom kapicom pri čemu se zapušač navlaži kapljicom dejonizovane vode da bi ga bilo lakše staviti. Sve boce se promućkaju da bi se sadržaj u njima izmiješao.

Inkubacija boca

Boce se prenose u termostatom regulisani inkubator koji je, po mogućnosti, opremljen aparatom za mućkanje i kome se temperatura održava na 35 °C ± 2 °C. Boce se inkubiraju u mraku. Poslije približno sat vremena, pritisak u bocama ujednači se sa atmosferskim pritiskom uvođenjem injekcione igle koja je jedinjenja na mjerač pritiska kroz zatvarač svake boce, otvori se ventil dok mjerač pritiska ne očita nulu i na kraju se ventil zatvori. Iglu treba uvesti pod uglom od 45° da bi se spriječilo curenje gasa iz boca. Ako se boce inkubiraju bez aparata za mućkanje, potrebno ih je za vrijeme inkubacionog perioda dva puta dnevno ručno mućkati da bi se sistem doveo u ravnotežu. Boce se zatim inkubiraju i izvrću da ne bi došlo do gubitka gasa kroz septum. Izvrtanje ne služi svrsi u slučajevima kada nerastvorljive ispitivane hemikalije mogu da prionu za dno balona.

Mjerenje pritiska

Kada se u bocama dostigne temperatura od 35 °C ± 2 °C, mjeri se i evidentira pH vrijednost sadržaja dvije od četiri pripremljene boce, a njihov sadržaj se prosipa; nastavlja se sa inkubacijom preostalih boca u mraku. Dva puta dnevno tokom narednih 48 do 72 sata mjeri se i evidentira pritisak u bocama uvođenjem igle mjerača pritiska kroz poklopac svake boce, pri čemu se igla osuši između mjerenja. Za vrijeme mjerenja, svi djelovi boce drže se na temperaturi inkubacije, a mjerenje se vrši što je brže moguće. Pusti se da se pritisak stabilizuje i zatim se evidentira. Otvori se ventil za ventilaciju, pa se ponovo zatvori kad mjerač očita nulu. Ispitivanje se obično nastavlja 48 sati od prvog ujednačavanja pritiska, koje se označava kao „nulto vrijeme—. Broj očitavanja i ventilacija za isparljive hemikalije treba da se ograniči na jedan (vrši se na kraju perioda inkubacije) ili dva da bi gubitak ispitivane hemikalije bio minimalan.

Ako je očitani pritisak negativan, ventil se ne smije otvarati. Povremeno se vlaga nakuplja u injekcionoj igli i cijevima, na šta ukazuje očitavanje neznatne negativne vrijednosti pritiska. U tom slučaju, skine se igla, cijev se otrese, osuši papirom, a zatim se postavi nova igla.

Mjerenje pH vrijednosti

Po obavljenom mjerenju pritiska, mjeri se i evidentira pH vrijednost sadržaja svake boce.

3.Podaci i izvještaji

Iskazivanje rezultata

Izračuna se zbir i prosjek vrijednosti pritisaka evidentiranih u svakom vremenskom periodu za svaki niz boca iz ponavljanih mjerenja i izračuna se srednji ukupni bruto pritisak gasa u svakom vremenskom periodu za svaki niz ponavljanja. Krivom se iskaže srednja kumulativna vrijednost proizvodnje gasa (Pa) u zavisnosti od vremena za kontrolne, ispitne i referentne boce. Na linearnom dijelu krive izabere se vrijeme, obično 48 sati, i za svaku koncentraciju sračuna procenat inhibicije na osnovu sljedeće jednačine:

$$I = \left(1 - \frac{P_t}{PC}\right) \times 100$$

gdje je:

I = procenat inhibicije u %;

Pt = pritisak gasa dobijen sa ispitnim materijalom u izabrano vrijeme, u paskalima (Pa);

P = pritisak gasa dobijen u kontroli u isto vrijeme, u paskalima (Pa).

c Preporučuje se da se vrijednosti iskažu u dva dijagrama, tj. jedan dijagram u zavisnosti od koncentracije i drugi u zavisnosti od logaritma koncentracije, da bi se izabrala ona kriva koja je bliža linearnosti. Vrijednost EC_{50} (mg/l) procijeni se vizuelno ili regresionom analizom na osnovu izabrane krive koja je bliža linearnosti. Za potrebe poređenja, može biti korisnije da se koncentracija hemikalije izrazi u vidu mg hemikalije /g ukupnih čvrstih materija. Da bi se postigla ta koncentracija, volumetrijska koncentracija (mg/l) dijeli se volumetrijskom koncentracijom suvih čvrstih materija (g/l).

Računa se ili procenat inhibicije koji se dobija upotrebom jedne koncentracije referentne hemikalije ili vrijednost EC_{50} ako je ispitan dovoljan broj koncentracija.

Srednji pritisak gasa dobijen u kontroli Pc(Pa) pretvori se u zapreminu na osnovu kalibracione krive mjerača pritiska (Dodatak 2) i iz toga se izračuna proizvodnja gasa koja se iskazuje kao zapremina dobijena za 48 sati iz 100 ml nerazblaženog mulja pri koncentraciji čvrstih materija od 2% (20 g/l) do 4% (40 g/l).

Kriterijumi valjanosti

Rezultati međulaboratorijaskog ispitivanja ISO pokazuju da je referentna hemikalija uzrokovala inhibiciju proizvodnje gasa u visini od 50% u oblasti koncentracija od 32 mg/l do 510 mg/l sa srednjom vrijednošću od 153 mg/l. Radi se o jako širokoj oblasti da striktne granice inhibicije nije moguće pouzdano utvrditi i postaviti ih za kriterijume valjanosti; to bi trebalo da postane izvodljivo kada se unaprijedi proizvodnja konzistentnijih inokuluma. Zapremine gasa proizvedenog u kontrolnim bocama za 48 sati iznosile su od 21 ml/g suve materije mulja do 149 ml/g (sa srednjom vrijednošću od 72 ml/g). Nije postojala očigledna povezanost između proizvedenog gasa i odgovarajuće vrijednosti EC_{50}. Krajnja pH vrijednost kretala se između 6,1 i 7,5.

Smatra se da je ispitivanje valjano kada se u referentnoj kontroli koja sadrži 150 mg/l 3,5dihlorfenola dobije inhibicija veća od 20%, u slijepoj probi dobije više od 50 ml gasa po gramu suve materije, a pH vrijednost na kraju ispitivanja bude između 6,2 i 7,5.

Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju mora obuhvatiti sljedeće informacije:

Ispitivana hemikalija

— uobičajeni naziv, hemijski naziv, broj CAS, strukturnu formulu i relevantna fizička i hemijska svojstva;

—čistoću (nečistoće) ispitivane hemikalije.

Uslovi ispitivanja

—zapremine tečnog sadržaja i parnog prostora u ispitnim posudama;

— opis ispitnih posuda i mjernih uređaja za gas (npr. vrsta mjerača pritiska);

— primjenu ispitivane hemikalije i referentne hemikalije na ispitni sistem, korišćene ispitne koncentracije i upotrebu svih rastvarača;

— bliže podatke o korišćenom inokulumu: naziv postrojenja za preradu otpadnih voda, opis izvora tretiranih otpadnih voda (npr. radna temperatura, vrijeme zadržavanja mulja, da li se radi o pretežno komunalnim otpadnim vodama ili industrijskom otpadu itd), koncentraciju čvrstih materija, aktivnost proizvodnje gasa anaerobnog digestora, prethodno izlaganje ili moguću prethodnu adaptaciju na toksične hemikalije ili mjesto sakupljanja mulja, taloga itd;

—temperaturu inkubacije i raspon temperature;

—broj ponavljanja.

Rezultati

—pH vrijednosti na kraju ispitivanja;

— sve podatke dobijene mjerenjem u ispitivanjima, slijepim probama i kontrolnim posudama sa referentnom hemikalijom, u zavisnosti od pojedinačnog slučaja (npr. pritisak u Pa ili milibarima) u tabličnom obliku;

— procenat inhibicije u ispitnim i referentnim bocama i krive iz kojih se vidi odnos inhibicije i koncentracije;

—proračun vrijednosti EC_{50} iskazan u mg/l i mg/g;

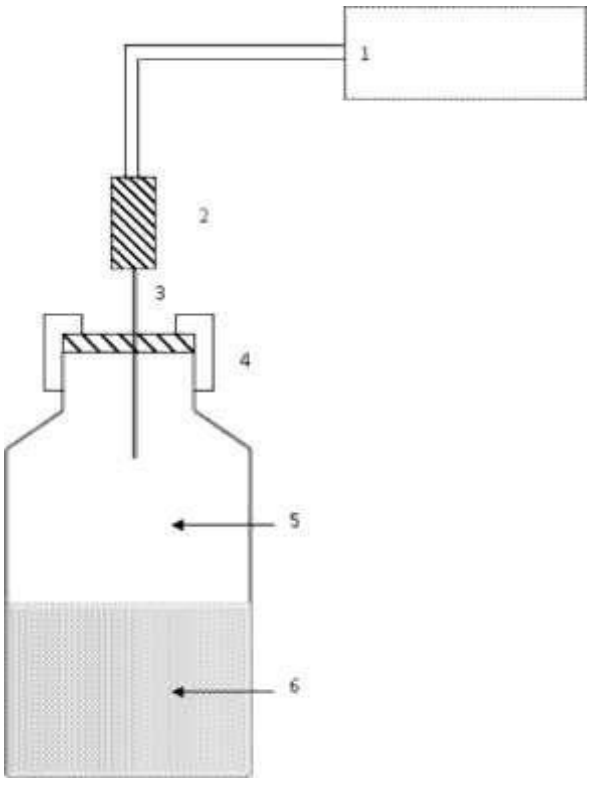
—proizvodnju gasa po gramu mulja za 48 sati;

—razloge za odbacivanje rezultata ispitivanja;

— diskusiju rezultata, sa odstepenima od postupaka koje obuhvata ova ispitna metoda, i diskusiju svih odstepena od očekivanih ispitnih rezultata zbog smetnji i grešaka;

— obrazloženje da li je svrha ispitivanja bila da se izmjeri toksičnost za mikroorganizme koji su prethodno bili izloženi ili one koji prethodno nisu bili izloženi.

Primjer aparature za mjerenje proizvodnje biogasa uz pomoć pritiska gasa



Legenda:

Dodatak 2

1 — mjerač pritiska

2 — trokraki gasno nepropusni ventil

3 — injekciona igla

4 — gasno nepropusni zaptivak (kapica sa navojima i septum)

5 — parni prostor

6 — inokulum od digestovanog mulja

Ispitne posude na temperaturnim uslovima od 35 °C ± 2 °C

Pretvaranje vrijednosti dobijenih mjeračem pritiska

Vrijednosti koje očitava mjerač pritiska mogu se dovesti u vezu sa zapreminama gasa prema standardnoj krivoj na osnovu koje je moguće izračunati i zapreminu gasa dobijenog po gramu suvog mulja za period od 48 sati. Ovaj indeks aktivnosti koristi se kao jedan od kriterijuma na osnovu kojih se vrši procjena valjanosti ispitnih rezultata. Kalibraciona kriva dobija se ubrizgavanjem poznatih zapremina gasa na 35 °C ± 2 °C u serum-boce koje sadrže zapreminu vode koju ima i reakciona smješa, VR; — Alikvotni udjeli vode od VR ml koji se drže na 35 °C ± 2 °C razdijele se u pet serum boca. Boce se zapečate i smješte u kupatilo sa tečnošću na 35 °C ± 2 °C na sat vremena da se postigne ravnoteža;

— Uključi se mjerač pritiska, pusti se da se stabilizuje i podesi na nulu;

— Kroz poklopac jedne od boca uvede se injekciona igla, otvori se ventil dok mjerač pritiska ne očita nulu, pa se zatvori;

—Postupak se ponavlja sa preostalim bocama;

— Ubrizga se 1 ml vazduha na 35 °C ± 2 °C u svaku bocu. Uvede se igla (nalazi se na mjeraču) kroz poklopac jedne od boca i pusti se da se očitavanje pritiska stabilizuje. Evidentira se pritisak, otvori se ventil dok mjerač ne očita nultu vrijednost i zatim se ventil zatvori;

— Postupak se ponavlja sa preostalim bocama;

— Ponavlja se cijeli postupak uz upotrebu zapremine vazduha od 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12, 16 ml, 20 ml i 50 ml;

— Dijagramom se prikaže kriva konverzije pritiska (Pa) u zavisnosti od zapremine ubrizganog gasa (ml). Odgovor instrumenta je linearan iznad oblasti od 0 Pa do 70 000 Pa, i od 0 ml do 50 ml proizvedenog gasa.

Faktori za koje je poznato da mogu uticati na tačnost rezultata

(a) *Kvalitet poklopaca na bocama*

Na tržištu postoje različite vrste septuma za serum-boce; mnoge od njih, a to obuhvata i septume od butilne gume, gube zaptivnu moć kada se probuše iglom shodno uslovima ovog ispitivanja. Povremeno, nakon uvođenja injekcione igle kroz septum, dolazi do veoma sporog pada pritiska. Preporučuje se upotreba gasno nepropusnih septuma kako bi se spriječilo curenje).

(b) *Vlaga u injekcionoj igli*

Vlaga se ponekad nakuplja u injekcionoj igli i cijevima, na što ukazuje pojava male negativne vrijednosti pritiska. Da bi se ta vrijednost korigovala, igla se ukloni i cijev se otrese, osuši papirom, a zatim se postavi nova igla).

(c) *Kontaminacija kiseonikom*

Anaerobne metode podložne su greškama zbog kontaminacije kiseonikom, što može dovesti do slabije proizvodnje gasa. Prilikom primjene ove metode, potrebno je smanjiti mogućnost da do toga dođe upotrebom strogo anaerobnih tehnika, što obuhvata i upotrebu suve kutije.

(d) *Grubi supstrati u mulju*

Na anaerobnu proizvodnju gasa i osjetljivost mulja utiču supstrati koji se sa inokulumom prenose u ispitne boce. Digestovani mulj iz domaćih anaerobnih digestora još uvijek često sadrži prepoznatljive materije kao što su dlake i ostaci celuloze od biljaka koji otežavaju uzimanje reprezentativnih uzoraka. Propuštanjem kroz sito moguće je odstraniti grube nerastvorljive materije, čime se pouzdanije dolazi do reprezentativnih uzoraka.

(e) *Isparljive ispitivane hemikalije*

Isparljive ispitivane hemikalije ispuštaju se u parni prostor ispitnih boca. Kao rezultat toga, može se javiti gubitak izvjesne količine ispitnog materijala iz sistema za vrijeme ventilacije poslije mjerenja pritiska i proizvesti lažno visoke vrijednosti EC_{50}. Mogućnost da dođe do takve greške može se smanjiti izborom odgovarajuće odnose zapremine parnog prostora prema zapremini tečnosti, kao i time što se, poslije mjerenja pritiska, neće vrštiti ventilacija.

(f) *Nelinearnost proizvodnje gasa*

Ako dijagram srednje kumulativne proizvodnje gasa u zavisnosti od vremena inkubacije ne pokazuje približnu linearnost za vrijeme od 48 sati, tačnost ispitivanja može biti smanjena. Za prevazilaženje takve vrste odstepena, savjetuje se upotreba mulja koji se digestira iz različitih izvora i/ili dodavanje povećane koncentracije ispitnog supstrata - hranljivog bujona, ekstrakta kvasca i glukoze.

Primjena na uzorke iz sredine koji imaju nisku koncentraciju biomase – anaerobni mulj, sedimente itd.

Dodatak 4

UVOD

A.1 Specifična mikrobna aktivnost (zapremina proizvedenog gasa po gramu suvih čvrstih materija) anaerobnog blata, sedimenata, zemljišta itd. u prirodno pojavnom obliku uglavnom je mnogo niža od aktivnosti anaerobnog mulja koji je dobijen iz otpadnih voda. Zato je potrebno da se, pri mjerenju inhibitornih efekata hemikalija na te uzorke kod kojih postoji niža aktivnost, pojedini uslovi eksperimenta prilagode. Na dva se načina, u načelu, djeluje na manje aktivne uzorke:

Vrši se izmijenjeno preliminarno ispitivanje sa nerazrijeđenim uzorkom blata, zemljišta itd. na temperaturi od 35 °C ± 2 °C ili na temperaturi mjesta sa kojeg je sakupljen uzorak, zbog tačnije simulacije (kao u dijelu 1 standarda MEST ISO 13 641);

Ili se izvodi ispitivanje sa razrijeđenim (1 u 100) muljem iz digestora kako bi se simulirala niska aktivnost uzorka iz prirodne sredine, ali se zadržava temperatura od 35 °C ± 2 °C (kao u dijelu 2 MEST ISO standarda 13 641).

A.2 Postupak (a) izvodljiv je ako se slijedi metoda opisana ovdje (odgovara dijelu 1 MEST ISO standarda 13 641), ali je ključno da se obavi preliminarno ispitivanje (stav 25) da bi se ustanovili optimalni uslovi, osim u slučaju kada su ti uslovi poznati iz prethodnih ispitivanja. Uzorak blata ili sedimenta potrebno je dobro izmiješati, npr. u blenderu i, ako je potrebno, razrijediti manjom količinom deaerisane vode za razblaživanje (stav 14) tako da bude u dovoljnoj mjeri prenosiv pipetom sa velikim nastavkom ili menzurom. Ako se smatra da nedostaje nutrijenata, uzorak blata može da se centrifugira (u anaerobnim uslovima) i ponovo suspenduje u mineralnom medijumumu koji sadrži ekstrakt kvasca (A.11).

A.3 Postupak (b). Ovaj postupak dosljedno imitira nisku aktivnost uzoraka iz životne sredine, ali nedostaje visoka koncentracija suspendovanih čvrstih materija u uzorcima. Uloga tih čvrstih materija nije poznata, ali postoji mogućnost da reakcija do koje dolazi između ispitivanih hemikalija i sastojaka blata, kao i adsorpcija ispitivanih hemikalija na čvrste materije, snižava toksičnost ispitivane hemikalije.

A.4 Temperatura je još jedan od važnih faktora: za dosljednu simulaciju, ispitivanje treba da se izvodi na temperaturi mjesta na kome je vršeno uzorkovanje, zato što je poznato da različite grupe konzorcijuma bakterija koje proizvode metan djeluju u okviru različitih temperaturnih opsega: termofili (~ 30-35 °C), mezofili (20-25 °C) i psihrofili (< 20 °C), i mogu ipoljiti različite obrasce inhibicije.

A.5 Trajanje. U opštem ispitivanju, u dijelu 1, sa nerazrijeđenim muljem, količina proizvedenog gasa za 2 do 4 dana uvijek je bila dovoljna, dok je u dijelu 2, sa sto puta razrijeđenim muljem, u tom periodu proizvedena nedovoljna količina gasa ili nije ni došlo do proizvodnje gasa u uporednom ispitivanju. Madsen i dr. (1996), u opisu drugog dijela ispitivanja, navode da taj proces zahtijeva najmanje 7 dana.

Ispitivanje s niskom koncentracijom biomase (Opcija (b))

Potrebno je izvršiti sljedeće izmjene kojima se dopunjuju ili zamjenjuju:

A.6 Načelo ispitivanja„Ova se tehnika može primijeniti s anaerobnim muljem razrijeđenim 1: 100 kako bi se djelimično simulirala niska aktivnost blata i sedimenata. Temperatura inkubacije može biti 35 °C ili to može biti temperatura mjesta uzimanja uzorka. Budući da je aktivnost bakterija mnogo manja nego u nerazrijeđenom mulju, period inkubacije potrebno je produžiti na najmanje sedam dana.‖

A.7. Inkubator mora moći raditi na nižim temperaturama sve do 15 °C.

A.8. dodatni reagens:„Fosforna kiselina (H_3PO_4), 85 % masenog udjela u vodi.‖

A.9 U ispitivanju se upotrebljava konačna koncentracija od 0,20 ± 0,05 g/l ukupne suve supstance.

A.10. . Ispitni supstrat Ovaj se supstrat ne upotrebljava, nego se zamjenjuje ekstraktom kvasca.

A.11. Anaerobni mulj mora se razrijediti mineralnim medijumumom koji sadrži i elemente u tragovima, a iz praktičnih razloga tom se medijumumu dodaje organski supstrat, ekstrakt kvasca. Ispitni mineralni mediumj, s ekstraktom kvasca.

Priprema se od deseterostruko koncentrovanog ispitnog medijumuma s rastvorom elemenata u tragovima. Upotrebljava se svježe pripremljeni natrij-sulfid-nonahidrat ili se opere i osuši prije upotrebe kako bi se osiguralo da ima redukcionu sposobnost. Ako se ispitivanje sprovodi bez upotrebe komore za rukovanje s pomoću rukavica koncentraciju natrijum sulfida u radnom rastvoru potrebno je povećati na 2 g/l (s 1 g/l). Natrijum sulfid može se dodati i iz odgovarajuće radne rastvore kroz septum zatvorenih ispitnih boca, čime se smanjuje opasnost od oksidacije, da se dobije konačna koncentracija od 0,2 g/l. Druga je mogućnost upotreba titan(III)-citrata. Doda se kroz septum zatvorenih ispitnih boca da se dobije koncentracija od 0,8 mmol/l do 1,0 mmol/l. Titan(III)-citrat vrlo je djelotvorno redukciono sredstvo niske toksičnosti, a priprema se na sljedeći način: rastvori se 2,94 g trinatrijum citrat dihidrata u 50 ml vode za razrjeĐivanje bez kiseonika čime se dobija rastvor od 200 mmol/l) te se doda 5 ml rastvora titan(III)-hlorida (15 g na 100 ml vode za razrjeĐivanje). Neutrališe se na pH 7 ± 0,5 natrijum karbonatom i ulije u odgovarajuću serum-bocu pod strujom gasovitog azota. Koncentracija titan(III)-citrata u random ratvoru iznosi 164 mmol/l. Ispitni se medijumum upotrijebi odmah ili se čuva na 4 °C najduže jedan dan.

A.12. Šestostruko koncentrisani ispitni medijumum pripremljen od sljededih sastojaka:

bezvodni kalijum dihidrogenfosfat (KH_2PO_4)	2,7 g
dinatrijum hidrogenfosfat (Na_2HPO_4)	4,4 g
(ili 11,2 g dodekahidrata) amonijum hlorid (NH_4Cl)	5,3 g
kalcijum hlorid dihidrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,75 g
magnezijum hlorid heksahidrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
žgvožĐe (II) hlorid tetrahidrat ($FeSO_4 \cdot 4H_2O$)	0,2 g

resazurin (redoks indikator)	0,01 g
natrijum sulfid nonahidrat ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	1,0 g
(ili titan(III)-citrat) konačna koncentracija	0,8 mmol/l do 1,0 mmol/l
rastvor elemenata u tragovima	10,0 ml
ekstrakt kvasca	100 g
rastvoriti u vodi za razrjeĐivanje i nadopuniti do:	1 000 ml

A.13. Rasvor elemenata u tragovima pripremljena od sljedećih sastojaka:

magnezijum(II) hlorid tetrahidrat ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,5 g
ortoborna kiselina (H_3BO_3)	0,05 g
cinkov hlorid ($ZnCl_2$)	0,05 g
bakar(II) hlorid ($CuCl_2$)	0,03 g
natrijum molibdat dihidrat ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,01 g
kobalt(II) hlorid heksahidrat ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
nikl(II) hlorid heksahidrat ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,1 g
dinatrijum selenit (Na_2SeO_3)	0,05 g
Rastvoriti u vodi za razrjeĐivanje i nadopuniti do:	1 000 ml‖

A.14. Preliminarno ispitivanje. Ključno je ssprovesti preliminarno ispitivanje onako kako je opisano, osim što koncentracije čvrste supstance mulja moraju biti jednake stotom dijelu navedenih vrijednosti, to jest iznositi 0,1 g/l, 0,2 g/l i 0,4 g/l. Inkubacija mora trajati najmanje sedam dana. U prstenastom ispitivanju volumen gasnog prostora bio je prevelik i iznosio je 75 % ukupnog volumena; mora biti u preporučenom rasponu od 10 % do 40 %. Relevantan je kriterijum taj da se gasa proizvedenog pri inhibiciji od oko 80 % mora moći izmjeriti s prihvatljivom preciznošću (npr. od ± 5 % do ± 10 %).

A.15. Dodavanje ispitivane hemikalije, inokuluma i supstrata. Dodavanja se sprovode na isti način kao što je opisano, s tim da se rastvor supstrata zamijeni ispitnim medijumumom kojem je dodatn ekstrakt kvasca. Isto tako, konačna koncentracija suve supstance u mulju smanji se s 2 g/l do 4 g/l na 0,2 ± 0,05 g/l (A.9). U tabeli A.1., navedena su dva primjera dodavanja sastojaka u ispitnu smješu.

A.16. Inkubiranje boca. Zbog očekivane manje brzine proizvodnje gasa, inkubacija traje najmanje sedam dana.

A.17. Mjerenja pritiska. Ako je potrebno izmjeriti količine u gasnoj fazi, primjenjuje se isti postupak mjerenja pritiska u gasnom prostoru boca. Ako se mjere ukupne količine CO_2 plus CH_4, pH-vrijednost tečne faze smanji se na pH-vrijednost oko 2 ubrizgavanjem H_3PO_4 u svaku relevantnu bocu i mjerenjem pritiska nakon protresanja u trajanju od 30 minuta na temperaturi ispitivanja. Međutiim, više se informacija o kvalitetu inokuluma može dobiti mjerenjem pritiska u svakoj boci prije i nakon zakiseljavanja. Ako je brzina proizvodnje CO_2 mnogo veća od brzine proizvodnje metana, možda je promijenjena osjetljivost fermentativnih bakterija i/ili ispitivana hemikalija u prvom redu utiče na metanogene bakterije.

A.18. mjerenje pH-vrijednosti. Ako će se upotrebljavati H_3PO_4, mora se pripremiti nekoliko dodatnih boca bez dodatog H_3PO_4, koje će biti posebno namijenjene za mjerenje pHvrijednosti.

Tabela A.1.

Primjeri plana ispitivanja za ispitne serije

Sastojci reakcijske smješe	**Primjer 1.**	**Primjer 2.**	**Uobičajeni redoslijed dodavanja**
Koncentracija pripremljenog inokuluma (g/l)	0,42	2,1	—
Volumen dodatog inokuluma (ml)	45	9	4
Koncentracija inokuluma u ispitnim bocama (g/l)	0,20	0,20	—
Volumen dodatog ispitnog medija (ml)	9	9	2
Volumen dodate vode za razrjeĐivanje (ml)	36	72	3
Koncentracija ekstrakta kvasca u ispitnim bocama (g/l)	9,7	9,7	—

Volumen radnog rastvora ispitivane hemikalije (ml)	3	3	1
Ukupan volumen tečnosti (ml)	93	93	—

Dodatak 5.

Definicije

Za potrebe ove ispitne metode upotrebljavaju se sljedeće definicije:

Ispitivana hemikalija znači svaka supstanca i ili smješa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

1. UVOD

Ova ispitna metoda odgovara ispitnoj smjernici OECD-a (TG) 225 (2007). Endobentične životinje koje se hrane sedimentom pod uticajem su potencijalno visoke izloženosti hemikalijama koje se vezuju za sediment zbog čega im je potrebno posvetiti posebnu pažnju, npr. (1), (2), (3). MeĐu takvim vrstama koje se hrane sedimentom, vodeni oligoheti imaju važnu ulogu u sedimentima vodenih sistema. Time što vrše bioturbaciju sedimenta i služe kao plijen ove životinje mogu imati snažaj uticaj na biorapoloživost tih hemikalija drugim organizmima, npr. bentivornim ribama. Nasuprot epibentičnim organizmima, endobentični vodeni oligoheti (npr. Lumbriculus variegatus) ukopavaju se u sediment i hrane se česticama sedimenta ispod površine sedimenta. Time se obezbjeđuju svi mogući načini izloženosti ispitnih organizama ispitivanoj hemikaliji (npr. dodirom s kontaminiranim česticama sedimenta ili gutanjem takvih čestica, ali i putem porne vode i vode iznad sedimenta).

Ova ispitna metoda osmišljena je za procjenu produžene izloženosti endobentičnog oligoheta Lumbriculus variegatus (Miler) (Müller) hemikalijama vezanim za sediment. Zasnovan je na postojećim protokolima ispitivanja toksičnosti sedimenta i bioakumulacije. Metod je opisan za uslove statičkog ispitivanja. Izlaganje u sklopu ove metode vrši se obogaćivanjem sedimenta ispitivanom hemikalijom u postupku spikinga. Na taj način obogaćeni sediment trebalo bi da simulira kontaminaciju sedimenta ispitivanom hemikalijom.

Hemikalije koje se moraju ispitivati na organizmima koji nastanjuju sedimente obično se zadržavaju u sedimentnim prostorima duže vrijeme. Organizme koji nastanjuju sediment moguće je izložiti na nekoliko načina. Relativna važnost svakog načina izlaganja i vrijeme koje je potrebno da svaki od tih postupaka doprinese ukupnom efektu toksičnosti zavise od fizičkih i hemijskih svojstava date hemikalije i njenog životnog ciklusa u životinji. Za hemikalije sa velikim potencijalom adsorpcije (npr. sa log Kow > 5) ili za hemikalije koje su kovalentnim vezama vezane za sediment, unošenje kontaminirane hrane može biti značajan način izlaganja. Da se ne bi potcijenila toksičnost tih hemikalija, hrana koja je neophodna za reprodukciju i rast ispitnih organizama dodaje se sedimentu prije aplikovanja ispitne hemikalije. Opisana ispitna metoda prikazana je dovoljno detaljno za potrebe vršenja ispitivanja, tako da ostavlja i mogućnost izmjene plana eksperimenta u zavisnosti od uslova u pojedinačnim laboratorijaama i različitim karakteristikama ispitivanih hemikalija.

Ispitna metoda ima za cilj da utvrdi efekte koje ispitivana hemikalija ima na reprodukciju i biomasu ispitnih organizama. Mjerne biološke parametre čine ukupan broj preživjelih glista i biomasa (suva masa) na kraju izlaganja. Ti podaci računaju se ili pomoću regresionog modela da bi se procijenila koncentracija koja proizvodi x% odgovora (npr. EC50, EC25 i EC10) ili statističkim testiranjem hipoteze da bi se utvrdila koncentracija bez vidljivog efekta (NOEC) i najniža koncentracija sa vidljivim efektom (LOEC).

U poglavlju C.27 ovog Aneksa, „Test toksičnosti na biljnim komarcima u sistemu sedimentvoda spajking tehnikom bogaćenja sedimenta—, iznijet je veliki broj važnih i

korisnih podataka za izvoĐenje prikazane metode ispitivanja toksičnosti sedimenta. Zato je taj dokument i

poslužio kao osnov za uvođenje neophodnih izmjena u ispitivanje toksičnosti sedimenta sa vrstom Lumbriculus variegatus. Drugi dokumenti na koje se poziva su npr. ASTM Standard Guide for Determination of the Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants by

Benthic Invertebrates (Standardni vodič ASTM-a za utvrĐivanje bioakumulacije kontaminenata povezanih sa sedimentom kod bentičnih beskičmenjaka), the U.S. EPA Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated

Contaminants with Freshwater Invertebrates (metode Agencije za zaštitu životne sredine SAD-a za mjerenje toksičnosti i bioakumulacije kontaminenata povezanih sa sedimentom kod slatkovodnih beskičmenjaka), the ASTM Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates (Standardni vodič ASTM-a za sakupljanje, čuvanje, karakterizaciju i manipulaciju sedimentima za potrebe toksikoloških ispitivanja i izbor opreme za uzorkovanje bentičnih beskičmenjaka). Važni izvori informacija za sastavljanje ovog dokumenta su i praktično iskustvo stečeno u uporednom ispitivanju ispitne metode, izvještaj o uporednom ispitivanju).

2. OBAVEZNI PODACI I SMJERNICE

Prije početka istraživanja potrebno je prikupiti podatke o ispitivanoj hemikaliji kao što su mjere predostrožnosti, adekvatni uslovi čuvanja i analitičke metode. Smjernice za ispitivanje hemikalija koje su, zbog svojih fizičkih i hemijskih svojstava, zahtjevne za izvoĐenje testova date su u tački.

Prije početka ispitivanja, moraju se znati sljedeći podaci o ispitivanoj hemikaliji:

- naziv, hemijski naziv (po mogućnosti, naziv po nomenklaturi IUPAC), strukturna formula, registarski broj CAS, čistoća;
- napon pare;
- rastvorljivost u vodi.

Prije početka ispitivanja korisno je znati i sljedeće podatke:

- koeficijent raspodjele između oktanola i vode, Kow;
- koeficijent raspodjele između organskog ugljenika i vode, iskazan kao Koc; - hidrolizu;
- fototransformaciju u vodi; - biorazgradljivost;
- površinski napon.

Prije početka ispitivanja potrebno je sakupiti podatke o pojedinim osobinama sedimenta koji će se koristiti.

3. PRINCIP ISPITIVANJA

Crvi sličnog fiziološkog stanja (sinhronizovani na način opisan u Dodatku 5) izlažu se nizu koncentracija toksikanata koje se primjenjuju na sedimentnu fazu sistema sediment-voda. Za medijumum se uzimaju vještački sediment i obraĐena voda. Kao kontrole upotrebljavaju

se ispitne posude u koje nije dodata ispitivana hemikalija. Velikom količinom ispitivane hemikalije obogaćuje se sediment za svaki nivo koncentracije da bi se smanjila varijabilnost među ponavljanjima, a zatim se ispitni organizmi unose u ispitne posude u kojima se nalaze uravnotežene koncentracije sedimenta i vode. Ispitne životinje izlažu se sistemima sediment-voda 28 dana. S obzirom na nizak sadržaj hranljivih sastojaka vještačkog sedimenta, potrebno je da se sediment obogati nekim od izvora hrane da bi se omogućili rast i reprodukcija crva u kontrolnim uslovima. Na taj način obezbjeđuje se izlaganje ispitnih životinja preko vode i sedimenta, ali i preko hrane.

Glavni parametar praćenja u ovom tipu istraživanja je ECx (npr. EC50, EC25 i EC10; koncentracija sa odgovorom kod x% organizama) za reprodukciju i biomasu, u poređenju sa kontrolom. Treba reći da, uzevši u obzir visoku nesigurnost niskih vrijednosti ECx (EC10, EC25) sa ekstremno visokim granicama povjerenja od 95%) i snagu statističkog testa izračunatu tokom testiranja hipoteze, smatra se da vrijednost EC50 predstavlja najpouzdaniji parametar praćenja. Pored toga, moguće je izračunati vrijednost NOEC (koncentracija bez vidljivog odgovora) i LOEC (najniža koncentracija sa vidljivim odgovorom) za biomasu i reprodukciju, pod uslovom da plan ispitivanja i podaci omogućavaju te proračune. Svrha ispitivanja izvođenje ECx, odnosno NOEC vrijednosti odrediće plan ispitivanja.

4. REFERENTNO ISPITIVANJE

Očekuje se da učinak kontrolnih organizama bude dovoljan da se dokaže kapacitet laboratorijae za izvođenje ispitivanja i pod uslovom da su poznati podaci iz prethodnih ispitivanja, ponovljivost tog ispitivanja. Pored toga, referentna ispitivanja toksičnosti sa referentnim toksikantom mogu se sprovoditi u redovnim vremenskim intervalima da bi se procijenila osjetljivost ispitnih organizama. Referentno ispitivanje toksičnosti isključivo u vodi u trajanju od 96 sati može uspješno da pokaže osjetljivost i stanje ispitnih životinja (4)(7). Podaci o toksičnosti pentahlorfenola (PCP) iz testiranja u punom trajanju (izlaganje obogaćenom sedimentu u trajanju od 28 dana) obuhvaćeni su Dodatkom 6 i izvještajem o uporednom testiranju ispitne metode. Ti podaci mogu se koristiti za poređenje osjetljivosti ispitnih organizama u referentnim ispitivanjima sa PCP kao referentnim toksikantom. Kao referentni toksikanti preporučuju se kalijum-hlorid (KCl) ili bakar-sulfat (CuSO4) sa L.variegatus. Zbog nedostatka podataka o L. variegatus u literaturi, još uvijek je teško utvrditi kriterijume kvaliteta na osnovu podataka o toksičnosti KCl.

5. VALJANOST ISPITIVANJA

Da bi ispitivanje bilo valjano, moraju se ispuniti sljedeći uslovi:

- uporedni test (13) pokazao je da kod Lumbriculus variegatus prosječan broj živih crva po ponavljanju u kontrolama treba da bude veći za faktor od najmanje 1,8 na kraju izlaganja u poređenju sa brojem crva po ponavljanju na početku izlaganja
- pH vrijednost vode iznad sedimenta treba da iznosi između 6 i 9 za vrijeme ispitivanja
- koncentracija kiseonika u vodi iznad sedimenta ne smije da padne ispod 30% vrijednosti zasićenja vazduha (ASV) na ispitnoj temperaturi za vrijeme ispitivanja.

6. OPIS ISPITNE METODE

6.1. Sistem ispitivanja

Preporučuju se statički sistemi bez obnavaljanja vode iznad sedimenta. Ako je odnos sedimenta i vode zadovoljavajući, uglavnom je dovoljna blaga aeracija da se kvalitet vode za ispitne organizme održi na prihvatljivom nivou (npr. da se nivo rastvorenog kiseonika što je moguće više poveća, a nakupljanje proizvoda izlučivanja koliko god je moguće smanji). Polustatičke ili protočne sisteme sa neprestanim ili kontinuiranim obnavljanjem vode iznad sedimenta trebalo bi koristiti samo izuzetno, zato što se očekuje da će redovno obnavljanje vode iznad sedimenta poremetiti ravnotežu hemikalija (npr. dovesti do gubitaka ispitivane hemikalije iz ispitnog sistema).

6.2. Ispitne posude i aparatura

Izlaganje se vrši u staklenim laboratorijaskim čašama zapremine npr. 250 ml prečnika 6 cm.

Mogu se koristiti i druge odgovarajuće posude, ali njihovom upotrebom mora biti zagarantovana adekvatna dubina vode iznad sedimenta i samog sedimenta. U svaku ispitnu posudu mora da stane sloj od približno 1,5 do 3 cm formulisanog sedimenta. Odnos dubine sloja sedimenta i dubine vode iznad sedimenta treba da iznosi 1:4. Posude treba da imaju odgovarajuću zapreminu koja je u skladu sa brzinom njihovog punjenja, odnosno brojem ispitnih crva dodatih po jedinici mase sedimenta.

Ispitne posude i ostala aparatura koja dolazi u dodir sa ispitivanom hemikalijom treba da budu napravljeni isključivo od stakla ili drugog hemijski inertnog materijala. Potrebno je povesti računa da se na svim djelovima opreme ne upotrebljava materijal koji se može rastvoriti, apsorbovati ispitivanu hemikaliju ili propustiti druge hemikalije i imati štetno dejstvo na ispitne životinje. Za svu opremu koja dolazi u dodir sa ispitnim medijumumom trebalo bi koristiti politetrafluoretilen (PTFE), nerĐajući čelik i/ili staklo. Za organske hemikalije za koje je poznato da adsorbuju staklo, može biti potrebno upotrijebiti silanizovano staklo. U tom slučaju, oprema se poslije upotrebe baca.

6.3. Ispitne vrste

Ispitna vrsta koja se koristi u ovom tipu istraživanja je slatkovodni oligohet Lumbriculus variegatus (Miler). Ova vrsta podnosi široki dijapazon sedimenata i naširoko se upotrebljava za ispitivanje toksičnosti sedimenta i bioakumulacije. U izvještaju je potrebno navesti porijeklo ispitnih životinja, potvrdu identiteta vrste kao i uslove uzgoja. Nije potrebno vršiti identifikaciju vrste prije svakog ispitivanja ako organizmi dolaze iz laboratorijaski uzgojenih kultura.

6.4. Uzgoj ispitnih organizama

Da bi za izvoĐenje testa toksičnosti sedimenta postojao dovoljan broj crva, korisno je držati stalnu kulturu crva u laboratorijai. Smjernice za metode uzgoja laboratorijaske kulture za vrstu Lumbriculus variegatus i izvori početnih kultura dati su u Dodatku 5.

Da bi se obezbijedilo da se testovi izvode samo na životinjama iste vrste, izričito se preporučuje da se uspostavljaju kulture svake vrste pojedinačno. Potrebno je obezijediti da kod kultura, a posebno crva koji se koriste u ispitivanjima, ne postoje vidljive bolesti i abnormalnosti.

6.5. Voda

Preporučuje se da se, za potrebe testiranja, za vodu iznad sedimenta koristi obrađena voda prema poglavlju C.1 ovog Aneksa; ona se može koristiti i kod laboratorisjkih kultura crva. Po potrebi, može se koristiti prirodna voda. Voda koja se izabere mora biti takvog kvaliteta da omogući rast i reprodukciju ispitnih vrsta i za vrijeme perioda aklimatizacije i ispitnog perioda, a da se kod ispitnih vrsta ne ipolje abnormalnosti u izgledu ili ponašanju. Pokazalo se da Lumbriculus variegatus preživljava, raste i razmnožava se u tipu vode datom u pri čemu je omogućena maksimalna standardizacija ispitnih uslova i uslova uzgoja. Ako se koristi obrađena voda, u izvještaj je potrebno unijeti njen sastav i osobine prije upotrebe, odnosno najmanje pH vrijednost, sadržaj kiseonika i tvrdoću (iskazanu u mg CaCO3/l). Do korisnih informacija može se doći analizom vode na mikropolutante prije upotrebe.

pH vrijednost vode iznad sedimenta treba da iznosi između 6,0 i 9,0. Ako se očekuje povišen nivo amonijaka, korisno je da se pH vrijednost održava između 6,0 i 8,0. Za testiranje npr. slabih organskih kiselina, preporučuje se da se pH vrijednost reguliše puferisanjem vode koja će se koristiti u testu. Ukupna tvrdoća vode za potrebe testiranja mora biti između 90 i 300 mg CaCO3 po litru za prirodnu vodu. U Dodatku 3 ukratko su izloženi dodatni kriterijumi za prihvatljivu vodu za razblaživanje prema smjernici OECD-a br. 210.

6.6. Sediment

Budući da nekontaminirani prirodni sedimenti iz određenog izvora mogu biti nedostupni tokom cijele godine, a na rezultate ispitivanja utiču i autohtoni organizmi kao i prisustvo mikropolutanata, poželjno je koristiti formulisani sediment (drugačije nazvan i rekonstituisani, vještački ili sintetički sediment). Upotreba formulisanog sedimenta u najvećoj mjeri smanjuje varijabilnost ispitnih uslova i unošenje autohtone faune.

a) 4 do 5 % (suve mase) treseta od mahovine roda Sphagnum; važno je da se treset koristi sprašen, u „srednjem— stepenu raspadanja, fino usitnjen (veličina čestica ≤ 0,5 mm) i sušen samo na vazduhu
b) 20 ± 1 % (suve mase) kaolinitske gline (sadržaj kaolinita po mogućnosti iznad 30 %)
c) 75-76 % (suve mase) kvarcnog pijeska (sitni pijesak, veličina zrna: ≤ 2 mm, ali > 50 % čestica mora iznositi između 50 i 200 µm)
d) dejonizovana voda, 30–50 % suve mase sedimenta, pored suvih sastojaka sedimenta;
e) kalcijum-karbonat hemijski čistog kvaliteta (CaCO3) koji se dodaje da bi se regulisala pH vrijednost krajnje smješe sedimenta
f) ukupni sadržaj organskog ugljenika (TOC) krajnje smješe mora iznositi 2 % (± 0,5 %) suve mase sedimenta i potrebno ga je regulisati upotrebom odgovarajućih količina treseta i pijeska, u skladu sa (a) i (c)
g) hrana, npr. sprašeno lišće obične koprive (Urtica sp, u skladu sa farmaceutskim standardima, za ishranu ljudi), ili smješa od sprašenog lišća obične koprive sa alfacelulozom (1:1) pri količini od 0,4 - 0,5 % suve mase sedimenta, uz suve sastojke sedimenta; bliži podaci dati su u Dodatku 4.

Izvor treseta, kaolinitske gline, materijala za hranu i pijeska mora biti poznat. Pored materijala iz tačke g), u poglavlju C.27 ovog Aneksa navode se i alternativni biljni materijali koji se mogu koristiti kao izvor hrane: dehidrirano lišće duda (Morus alba), bijele djeteline (Trifolium repens), spanaća (Spinacia oleracea) ili žitne trave.

Izvor hrane koji se izabere potrebno je dodati prije ili za vrijeme obogaćivanja sedimenta ispitivanom hemikalijom. Izabrani izvor hrane mora omogućiti najmanje prihvatljivu reprodukciju u kontrolama. Do korisnih informacija može se doći analizom vještačkog sedimenta ili njegovih sastojaka na mikropolutante prije upotrebe. U Dodatku 4 opisan je primjer pripreme formulisanog sedimenta. Prihvata se i miješanje suvih sastojaka ako se pokaže da poslije dodavanja vode iznad sedimenta ne dolazi do razdvajanja sastojaka sedimenta (plutanje čestica treseta), i da je treset odnosno sediment dovoljno kondicioniran. Vještački sediment mora biti određen makar porijeklom sastojaka, distribucijom veličine zrna (procenat pijeska, mulja i gline), ukupnim sadržajem ugljenika (TOC), sadržajem vode i pH vrijednošću.

Po potrebi, npr. u svrhu izvođenja specifičnih testova, kao ispitni sediment, odnosno kao sediment za uzgoj kultura uzimaju se i prirodni sedimenti sa nezagađenih mjesta. Da bi se koristio prirodni sediment, on mora biti određen makar porijeklom (mjestom sakupljanja), pH vrijednošću i nivoom amonijaka u pornoj vodi, ukupnim sadržajem organskog ugljenika (TOC) i sadržajem azota, raspodjelom veličine čestica (procenat pijeska, mulja i gline), procentom sadržaja vode i mora biti oslobođen od svih kontaminenata i drugih organizama koji bi mogli takmičarski da se ponašaju prema ispitnim organizmima ili ih iskoriste kao plijen. Mjerenje redoks potencijala i kapaciteta katjonske razmjene nije obavezno. Preporučuje se i da se, prije obogaćivanja sedimenta ispitivanom hemikalijom, prirodni sediment sedam dana kondicionira u uslovima koji preovladavaju u samom ispitivanju. Po završenom kondicioniranju, vodu iznad sedimenta potrebno je ukloniti i baciti.

Sediment koji će se koristiti mora biti takvog kvaliteta da omogući preživljavanje i reprodukciju kontrolnih organizama za vrijeme izlaganja, a da se kod tih organizama ne ipolje abnormalni izgled ili ponašanje. Kontrolni crvi treba da prokopavaju sediment i da ga jedu.. Potrebno je evidentirati prisustvo ili odsustvo fekalnih peleta na površini sedimenta koji ukazuju na to da crvi jedu sediment, i ti podaci mogu biti od koristi za tumačenje ispitnih rezultata u pogledu načina izloženosti.

Postupci rukovanja prirodnim sedimentom prije upotrebe u laboratorijai opisani su u (3), (7) i (12). Priprema i čuvanje vještačkog sedimenta čija se upotreba preporučuje u ispitivanju na vrsti Lumbriculus opisani su u Dodatku 4.

6.7. Primjena ispitivane hemikalije

Sediment treba da se obogati ispitivanom hemikalijom. Kako se očekuje da će većina hemikalija biti slabo rastvorljiva u vodi, potrebno ih je rastvoriti u odgovarajućem organskom rastvaraču (npr. aceton, n-heksan, cikloheksan) u minimalnoj zapremini da bi se dobio osnovni rastvor. Osnovni rastvor potrebno je razrijediti istim rastvaračem da se dobiju ispitni rastvori. Prilikom izbora odgovarajućeg sredstva za rastvaranje, glavni kriterijumi treba da budu toksičnost i isparljivost rastvarača i rastvorljivost ispitivane hemikalije u odabranom rastvaraču. Za svaki nivo koncentracije mora se koristiti ista zapremina odgovarajućeg rastvora. Sediment je potrebno obogatiti velikom količinom ispitivane hemikalije za svaki nivo koncentracije da bi se smanjila varijabilnost koncentracije ispitivane hemikalije među ponavljanjima. Zatim se svi ispitni rastvori miješaju sa kvarcnim pijeskom na način koji je opisan u stavu 22 (npr. 10 g kvarcnog pijeska po ispitnoj posudi). Pokazalo se da je zapremina od 0,20 - 0,25 ml po gramu pijeska dovoljna da bi se kvarcni pijesak sasvim natopio. Rastvarač zatim mora ispariti tako da pijesak ostane suv. Da bi se gubici ispitivane hemikalije sveli na najmanju moguću mjeru putem saisparavanja (npr. u zavisnosti od napona pare hemikalije), obloženi pijesak mora biti iskorišćen neposredno poslije sušenja. Suvi pijesak miješa se sa odgovarajućom količinom formulisanog sedimenta odgovarajućeg nivoa koncentracije. Količina pijeska koja se dobije miješanjem ispitivane hemikalije i pijeska

mora se uzeti u obzir prilikom pripreme sedimenta (tj. sediment je potrebno pripremiti sa manje pijeska). Najvažnija prednost ovog postupka je u tome što se nijedan rastvarač ne unosi u sediment. Postoji i mogućnost kod, npr. prirodnog sedimenta, da se ispitivana hemikalija doda obogaćivanjem osušenog i fino usitnjenog jednog dijela sedimenta na način koji je već objašnjen za kvarcni pijesak ili tako što će se ispitivana hemikalija umiješati u vlažni sediment, poslije čega slijedi isparavanje svih korišćenih sredstava za rastvaranje. Pri tome se vodi računa da se ispitivana hemikalija temeljno umiješa u sediment i u njemu ravnodnosno rasporedi. Po potrebi, mogu se analizirati i poduzorci da se potvrde ciljane koncentracije u sedimentu i ustanovi stepen homogenosti. Da bi se potvrdile ciljane koncentracije u sedimentu, može biti korisna i analiza poduzoraka ispitnih rastvora. Pošto se za oblaganje kvarcnog pijeska ispitivanom hemikalijom koristi rastvarač, priprema se i kontrola sa rastvaračem sa istom količinom rastvarača kao kod ispitnih sedimenata. U izvještaj se mora unijeti metoda koja je primijenjena za obogaćivanje, kao i razlozi za izbor postupaka obogaćivanja koji nisu navedeni. Metoda obogaćivanja može se prilagoditi fizičkim i hemijskim svojstvima ispitivane hemikalije, npr. da bi se izbjegli gubici usljed isparavanja za vrijeme procesa obogaćivanja, odnosno postizanja ravnoteže. Dodatne smjernice o pokolonama obogaćivanja date su u Environment Canada (1995).

Pošto se obogaćeni sediment pripremi, rasporedi u ispitne posude koje će služiti kao ponavljanja i prekrije ispitnom vodom, poželjno je pustiti da se ispitivana hemikalija izdvoji iz sedimenta do tečne faze. To se po mogućnosti obavlja u temperaturnim uslovima i uslovima aeracije koji se koriste u samom ispitivanju. Vrijeme koje je potrebno da se postigne ravnoteža zavisi od specifičnog sedimenta i hemikalija, i može iznositi od nekoliko sati do nekoliko dana, a u rijetkim slučajevima i do nekoliko sedmica (4 do 5 sedmica). U tom ispitivanju, ne čeka se da se postigne ravnoteža, već se za to preporučuje vrijeme od 48 sati do 7 dana. Na taj način se vrijeme potrebno za razgradnju ispitivane hemikalije što je moguće više skraćuje. U zavisnosti od svrhe ispitivanja, npr. kada je potrebno imitirati uslove koji postoje u životnoj sredini, na postizanje ravnoteže, odnosno starenje sedimenta može se čekati i duže.

Na kraju perioda postizanja ravnoteže, za analizu koncentracije ispitivane hemikalije uzimaju se najmanje uzorci vode iznad sedimenta i samog sedimenta i to u najvišoj koncentraciji i jednoj od nižih koncentracija. Ta analitička određivanja ispitivane hemikalije omogućiće da se izračuna bilans mase i rezultati iskažu na osnovu izmjerenih početnih koncentracija. U načelu, uzorkovanje remeti ili uništava sistem sediment-voda. Zato, uglavnom, nije moguće koristiti ista ponavljanja za uzorkovanje sedimenta i crva. Moraju se pripremiti dodatne „analitičke— posude odgovarajućih dimenzija sa kojima se postupa na isti način (što uključuje i prisustvo ispitnih organizama), ali koji se ne koriste za biološka posmatranja. Potrebno je izabrati dimenzije posuda koje omogućavaju da se uzorkovanje vrši u onim količinama koje se zahtijevaju datom analitičkom metodom.

7. IZVOĐENJE TESTA

7.1. Preliminarno ispitivanje

Ako nisu dostupni podaci o toksičnosti ispitivane hemikalije za vrstu Lumbriculus variegatus, može biti korisno izvesti preliminarni eksperiment da bi se utvrdila oblast koncentracija koje će se ispitivati u glavnom ispitivanju i utvrdili optimalni ispitni uslovi za potrebe glavnog ispitivanja. U tu svrhu koristi se niz vrlo različitih koncentracija ispitivane hemikalije. Crvi se izlažu svakoj koncentraciji ispitivane hemikalije u izvjesnom vremenskom periodu (npr. 28 dana kao kod glavnog ispitivanja), čime se omogućava procjena odgovarajućih ispitnih koncentracija; ponavljanja nisu potrebna. U preliminarnom ispitivanju potrebno je posmatrati

ponašanje crva, kao što je izbjegavanje sedimenta, što može biti uzrokovano ispitivanom hemikalijom i/ili sedimentom, a zatim i evidentirati to ponašanje. U preliminarnom ispitivanju nije potrebno ispitivati koncentracije više od 1 000 mg/kg suve mase sedimenta.

7.2. Glavno ispitivanje

U glavnom ispitivanju, potrebno je upotrijebiti i izabrati najmanje pet koncentracija, npr. na osnovu rezultata dobijenih u preliminarnom ispitivanju za određivanje oblasti koncentracija.

Pored ispitnog niza, sporovodi se i kontrola koja sadrži sve sastojke, osim ispitivane hemikalije. Ako se za primjenu ispitivane hemikalije koristi neki od agenasa za rastvaranje, on ne smije imati značajno dejstvo na ispitne organizme, o čemu svedoči dodatna kontrola u kojoj se koristi samo rastvarač.

7.3. Plan ispitivanja

Plan ispitivanja odnosi se na izbor broja ispitnih koncentracija i intervale između koncentracija, broj posuda za svaku koncentraciju i broj crva koji su u te posude dodati. Plan za procjenu vrijednosti ECx, vrijednosti NOEC i izvođenje testa opisan je niže

Koncentracije koje su dio ispitivanja treba da obuhvate koncentraciju sa efektom (npr. EC50, EC25, EC10) i oblast koncentracija u kojoj je dejstvo ispitivane hemikalije od interesa.
Potrebno je izbjegavati esktrapolaciju mnogo ispod najniže koncentracije koja ima dejstvo na ispitne organizme ili iznad najviše ispitne koncentracije. Ako se - samo izuzetno - ribjegne takvoj ekstrapolaciji, u izvještaj se mora unijeti puno obrazloženje tog postupka.

Prilikom procjene vrijednosti ECx, ispituju se najmanje pet koncentracija i najmanje tri ponavljanja za svaku koncentraciju; za kontrolu se preporučuje šest ponavljanja ili – ako se koristi rastvarač – kontrola sa rastvaračem da bi se poboljšala procjena varijabilnosti između kontrola. U svakom slučaju, preporučljivo je da se primijeni dovoljan broj ispitnih koncentracija da bi se izvršila temeljna procjena modela. Faktor između koncentracija ne smije biti veći od dva (može se napraviti izuzetak u slučajevima kada kriva odgovora na koncentraciju pokazuje plitak nagib). Broj ponavljanja po tretmanu može da se smanji ako se poveća broj ispitnih koncentracija sa odgovorom koji se kreće između 5 i 95%. Povećanje broja ponavljanja ili smanjenje intervala između ispitnih koncentracija daće uže intervale povjerenja za ispitivanje.

Prilikom procjene vrijednosti LOEC/NOEC, potrebno je primijeniti najmanje pet ispitnih koncentracija sa najmanje četiri ponavljanja (šest ponavljanja preporučuje se za kontrolu ili - ako se koristi rastvarač - za kontrolu samo sa rastvaračem da bi se poboljšala procjena varijabilnosti između kontrola), a faktor između koncentracija ne bi smio da bude veći od dva. Neki podaci o statističkoj snazi testa do kojih se došlo za vrijeme testiranja hipoteze dati su u Dodatku 6.

Može se ssprovesti granično ispitivanje (uz primjenu jedne ispitne koncentracije i kontrola) ako se odgovor ne očekuje do 1000 mg/kg suve mase sedimenta (npr. iz preliminarnog ispitivanja za određivanje oblasti koncentracija), ili ako će ispitivanje sa jednom koncentracijom biti dovoljno da potvrdi relevantnu vrijednost NOEC. U tom drugom slučaju, u izvještaj o ispitivanju potrebno je unijeti detaljno obrazloženje izbora granične koncentracije. Svrha graničnog ispitivanja je izvesti test sa dovoljno visokom koncentracijom da se donosiocima odluka omogući da isključe moguće toksične efekte hemikalije, a granica se postavlja na nivo koncentracije za koji se ne očekuje da se javi u bilo kojoj situaciji. Preporučuje se 1 000 mg/kg (suve mase). Uobičajeno je potrebno najmanje šest ponavljanja

i za tretman i za kontrolu. U Dodatku 6 mogu se naći neke informacije o statističkoj snazi do kojih se došlo tokom testiranja hipoteze u uporednom testiranju ispitne metode.

7.4. Uslovi izlaganja

7.4.1. Ispitni organizmi

Ispitivanje se izvodi sa najmanje 10 crva po svakom ponavljanju koje se koristi za utvrĐivanje bioloških parametara. Broj crva približno odgovara količini od 50 do 100 mg mokre biomase. Pod pretpostavkom da sadržaj suve mase iznosi 17,1% (48), to daje približno 9 do 17 mg suve biomase po ispitnoj posudi. Agencija za zaštitu životne sredine SAD-a (2000 (7)) preporučuje da odnos količina materija u posudama iznosi najviše 1:50 (suva masa: TOC). Za formulisani sediment koji je opisan u stavu 22, to odgovara količini od približno 43 g sedimenta (suve mase) na deset crva pri TOC od 2,0% suvog sedimenta. U slučajevima kada se koristi više od deset crva po ispitnoj posudi, količina sedimenta i vode iznad njega mora se prilagoditi shodno tome.

Svi crvi koji se koriste u ispitivanju moraju dolaziti od istog izvora i moraju biti u sličnom fiziološkom stanju. Treba da se odaberu crvi slične veličine. Preporučuje se da se prije ispitivanja izvaga poduzorak serije ili zalihe crva da bi se izvršila procjena prosječne mase.

Crvi koji će se koristiti u ispitivanju uzimaju se iz kulture. Velike (odrasle) jedinke životinja koje ne pokazuju znake nedavne fragmentacije prenose se u staklene zdjele (Petrijeve šolje) sa čistom vodom. Zatim se sinhronizuju na način opisan u Dodatku 5. Poslije perioda regeneracije koji traje 10 do 14 dana, koriste se nepovrijeĐeni cijeli crvi, slični po veličini, koji aktivno plivaju ili puze na blagi mehanički podsticaj. Ako se uslovi ispitivanja razlikuju od uslova uzgoja (npr. razlike u temperaturi, režimu svjetlosti i vodi iznad sedimenta), trebalo bi da faza aklimatizacije od npr. 24 sata pri temperaturi, režimu svjetlosti i sa istom vodom iznad sedimenta kao na samom ispitivanju bude dovoljna da se crvi prilagode ispitnim uslovima. PrilagoĐene oligohete potrebno je nasumično rasporediti po ispitnim posudama.

7.4.2. Davanje hrane

Budući da se hrana u sediment dodaje prije (ili za vrijeme) primjene ispitivane hemikalije, crvima se tokom ispitivanja hrana više ne dodaje.

7.4.3. Svjetlo i temperatura

Za vrijeme uzgoja i ispitivanja, fotoperiod uglavnom iznosi 16 sati. Osvijetljenost treba da bude niska (npr. od 100 do 500 luksa) da bi se imitirali prirodni uslovi na površini sedimenta, i potrebno je izmjeriti je najmanje jednom za vrijeme perioda izlaganja. Temperatura treba da iznosi 20 °C ± 2 °C do kraja ispitivanja. Na dan mjerenja temperaturna razlika meĐu ispitnim posudama ne smije biti veća od ± 1 °C. Ispitne posude potrebno je nasumično smještiti u ispitni inkubator ili na ispitno mjesto, npr. da povoljniji položaj pojedinih ispitnih posuda ne bi imao značajnijeg uticaja na razmnožavanje.

7.4.4. Aeracija

Potrebno je vršiti blagu aeraciju vode iznad sedimenta (npr. 2 do 4 klobuka po sekundi) pomoću Pasterove pipete koja se postavi 2 cm iznad površine sedimenta kako bi se što je moguće više smanjilo remećenje sedimenta. Potrebno je povesti računa da koncentracija rastvorenog kiseonika ne padne ispod 30% vrijednosti zasićenosti vazduha (ASV). Dovod

vazduha mora se kontrolisati i – po potrebi – prilagoĐavati najmanje jednom dnevno radnim danima.

7.5. Mjerenje kvaliteta vode

U vodi iznad sedimenta mjere se sljedeći parametri kvaliteta vode:

Temperatura:	U najmanje jednoj ispitnoj posudi kod svakog nivoa koncentracije i jednoj kontrolnoj posudi jednom sedmično i na početku i na kraju perioda izlaganja; po mogućnosti, temperatura u okolnom medijumumu (okolni vazduh ili kupatilo sa tečnošću) može se dodatno evidentirati npr. u intervalima od sat vremena;
Sadržaj rastvorenog kiseonika:	U najmanje jednoj ispitnoj posudi kod svakog nivoa koncentracije i jednoj kontrolnoj posudi jednom sedmično i na početku i na kraju perioda izlaganja; iskazan kao mg/l i % ASV (vrijednost zasićenosti vazduha);
Dovod vazduha:	Potrebno ga je kontrolisati najmanje jednom dnevno radnim danima i – po potrebi – prilagoĐavati;
pH vrijednost:	U najmanje jednoj ispitnoj posudi na svakom nivou koncentracije i jednoj kontrolnoj posudi jednom sedmično na početku i na kraju perioda izlaganja;
Ukupna tvrdoća vode:	U najmanje jednom kontrolnom ponavljanju i jednoj ispitnoj posudi kod najvišeg nivoa koncentracije na početku i na kraju perioda izlaganja; iskazana kao mg/l CaCO3;
Ukupni sadržaj amonijaka:	U najmanje jednom kontrolnom ponavljanju i jednoj ispitnoj posudi kod svakog nivoa koncentracije na početku vremena izlaganja, a zatim 3 puta sedmično; iskazan kao mg/l NH4 + ili NH3 ili ukupnog amonijaka N.

Ako mjerenje parametara kvaliteta vode zahtijeva odlivanje značajnijih količina vode iz posuda, savjetuje se da se pripreme posebne posude za mjerenje kvaliteta vode, kako se ne bi mijenjao odnos vode i sedimenta.

7.6. Biološka posmatranja

Za vrijeme izlaganja, potrebno je posmatrati ispitne posude da bi se vizuelno procijenile razlike u ponašanju meĐu crvima (npr. izbjegavanje sedimenta, fekalne pelete koje se vide na površini sedimenta) u poreĐenju sa kontrolama. Zapažanja treba da se evidentiraju.

Na kraju ispitivanja, pregleda se svaka ispitna posuda (dodatne posude namijenjene hemijskim analizama mogu da se isključe iz ispitivanja). Potrebno je primijeniti odgovarajuću metodu da bi se svi crvi izdvojili iz ispitnih posuda. Ovdje je potreban oprez kako bi se svi crvi izdvojili nepovrijeĐeni. Jedna od metoda je izdvajanje crva iz sedimenta upotrebom sita. Može se upotrijebiti mreža od nerĐajućeg čelika sa odgovarajućim mrežnim otvorima. Najveći dio vode iznad sedimenta se pažljivo ocijedi, a preostali sediment i voda se mućkaju dok se ne dobije kašasta materija koja se može provući kroz sito. Pri upotrebi sita sa otvorom reda veličine 500 µm većina čestica sedimenta proći će kroz sito vrlo brzo; mada sijanje i treba da se obavi brzo da bi se spriječilo da crvi uĐu kroz otvore ili izaĐu iz njih.

Upotrebom sita sa otvorom reda veličine 250 μm crvi će biti spriječeni da uĐu u mrežu ili odu iz nje; i tu je potrebno paziti da se što je moguće manje čestica sedimenta zadrži na mreži sita. Prosijana kašasta masa iz svake posude može se provući kroz sito i drugi put da bi se osiguralo da su time izdvojeni svi crvi. Druga metoda može biti zagrijavanje sedimenta stavljanjem ispitnih posuda u kupatilo sa tečnošću pri temperaturi od 50 – 60 °C; crvi će se izdvojiti iz sedimenta, pa se sa njegove površine mogu sakupiti pipetom širokog otvora koja je polirana na plamenu. Može se primijeniti još jedna metoda pri kojoj je potrebno postići kašastu konzistenciju sedimenta koji se u takvom stanju sipa na plitki tanjir odgovarajuće veličine. Iz tankog kašastog sloja crve je moguće izdvojiti čeličnom iglom ili finom časovničarskom pincetom (koja se ovdje koristi kao viljuška, a ne kao kliješta, da bi se izbjeglo povreĐivanje crva), a zatim ih prenijeti u čistu vodu. Nakon izdvajanja crva iz kašastog sedimenta, crvi se ispiraju u ispitnom medijumumu i prebrojavaju. Nezavisno od metode koja se primijeni, laboratorijae moraju pokazati da su u stanju da izvrše izdvajanje u prosjeku najmanje 90% organizama iz cijelog sedimenta. Na primjer, određeni broj ispitnih organizama može se dodati u kontrolni sediment ili ispitne sedimente, a rezultati izdvajanja mogu se utvrditi poslije jednog sata.

Evidentira se i procjenjuje ukupan broj živih i uginulih jedinki po posudi. Za sljedeće grupe crva smatra se da nisu žive:

a) ne reaguju na blagi mehanički podsticaj
b) pokazuju znake raspadanja (uz tačku (a))
c) crvi koji nedostaju

I živi crvi mogu se svrstati u jednu od sljedeće tri grupe:

a) veliki cijeli crvi (odrasle jedinke) bez regenerisanih djelova tijela
b) cijeli crvi sa regenerisanim, slabije prebojenim djelovima tijela (npr. sa novim zadnjim dijelom tijela, novim prednjim dijelom tijela ili sa novim i prednjim i zadnjim dijelom tijela)
c) crvi kojima nedostaje dio tijela (npr. nedavno fragmentisani crvi sa neregenerisanim djelovima tijela)

Nije obavezno vršiti takva dodatna zapažanja, ali se mogu koristiti za dodatno tumačenje bioloških rezultata (na primjer, veliki broj crva koji se mogu svrstati u grupu c može biti znak zakašnjele reprodukcije ili regeneracije u određenom tretmanu). Osim toga, ako se uoče bilo kakve razlike u izgledu (npr. lezije na integumentu, edematozni djelovi tijela) između tretiranih i kontrolnih crva, potrebno ih je evidentirati.

Odmah nakon prebrojavanja/izvršene procjene, živi crvi koji se naĐu u svakoj posudi prenose se na osušena, unaprijed izvagana i označena korita za vaganje (po jedno za svaku posudu) i usmrćuju jednom kapi etanola po ispitnom koritu. Korita za vaganje stavljaju se u peć za sušenje pri temperaturi od 100 ± 5 °C da se suše tokom noći, a zatim se hlade u desikatoru, pa vagaju, poslije čega se određuje suva masa crva (po mogućnosti u gramima, na najmanje 4 decimalna mjesta).

Osim ukupne suve mase, može se odrediti i suva masa bez pepela kako bi se uzele u obzir neorganske komponente koje potiču iz progutanog sedimenta a prisutne su u digestivnom traktu crva.

Biomasa se utvrđuje kao ukupna biomasa po ponavljanju, uključujući i odrasle i mlade jedinke crva. Neživi crvi ne uzimaju se u obzir prilikom utvrĐivanja biomase po ponavljanju.

7.7. Provjera koncentracije ispitivane hemikalije

7.7.1. Uzorkovanje

Uzorkovanje ispitivane hemikalije za potrebe hemijske analize vrši se tako da se uzimaju najmanje uzorci koji sadrže najvišu koncentraciju i jednu od nižih koncentracija ispitivane hemikalije i to najmanje na kraju faze postizanja ravnoteže (prije dodavanja ispitnih organizama) i na kraju ispitivanja. Potrebno je uzeti najmanje uzorak samog sedimenta i vode iznad njega. Na svaki dan uzorkovanja potrebno je uzeti najmanje dva uzorka po matrici i tretmanu. Jedan od duplih uzoraka može se čuvati kao rezervni uzorak (koji će se analizirati npr. u slučaju da u prvobitnoj analizi dođe do odstepena većeg od ± 20 % od nominalne koncentracije). U slučaju hemikalije sa specifičnim hemijskim svojstvima, npr. kada se očekuje brza razgradnja ispitivane hemikalije, može se izmijeniti raspored vršenja analiza (npr. može se vršiti češće uzorkovanje ili analiza većeg broja nivoa koncentracija) na osnovu stručnog mišljenja. Uzorci se nakon toga mogu uzimati i u vremenu između planiranih uzorkovanja (npr. sedmog dana od početka izlaganja).

Uzorke vode iznad sedimenta potrebno je uzimati pažljivim odlivanjem ili isisavanjem kako bi se remećenje sedimenta svelo na najmanju moguću mjeru. Evidentiraju se zapremine uzoraka.

Nakon što se voda iznad sedimenta odvede, sediment je potrebno homogenizovati i prenijeti u odgovarajuću posudu. Evidentira se masa uzorka mokrog sedimenta.

Ako je potrebno izvršiti i dodatnu analizu ispitivane hemikalije u pornoj vodi, centrifugiraju se prethodno homogenizovani i izvagani uzorci sedimenta da bi se dobila porna voda. Na primjer, približno 200 ml mokrog sedimenta stane u epruvete za centrifugiranje od 250 ml. Zatim je potrebno centrifugirati uzorke bez filtriranja da bi se izdvojila porna voda, npr. na 10 000 ± 600 × g u trajanju od 30 do 60 minuta na temperaturi koja nije viša od temperature koja se koristi u ispitivanju. Poslije centrifuge, tečnost iznad taloga se cijedi ili isisava pipetom uz oprez da se ne unesu čestice sedimenta, a zatim se evidentira zapremina.

Evidentira se i masa peleta preostalog sedimenta. Da bi se olakšala procjena bilansa mase ili iskorišćenje ispitivane hemikalije, utvrđuje se suva masa sedimenta prilikom svakog uzorkovanja. Zbog premalih uzoraka, u pojedinim slučajevima neće biti moguće izvršiti analizu koncentracija u pornoj vodi.

Ako se analiza ne izvrši odmah, sve uzorke potrebno je čuvati odgovarajućom metodom, npr. u uslovima u kojima je razgradnja specifične ispitne hemikalije minimalna (npr. uzorci iz životne sredine se uglavnom čuvaju na-18 °C u mraku). Prije početka istraživanja, mora se rapolagati podacima o adekvatnim uslovima skladištenja za određenu ispitnu hemikaliju – na primjer, vrijeme I 115emperature skladištenja, postupci ekstrahovanja, itd.

7.7.2. Metoda analize

Budući da se cijeli postupak zasniva na tačnosti, preciznosti i osjetljivosti primijenjene metode analize ispitivane hemikalije, potrebno je u eksperimentalnim uslovima ustanoviti da li preciznost i reproduktivnost hemijske analize i modus izdvajanja ispitivane hemikalije iz vode i sedimenta odgovaraju određenoj metodi, barem pri najnižim i najvišim ispitnim koncentracijama. Provjerava se i da li se prisustvo ispitivane hemikalije u kontrolnim posudama može utvrditi u koncentracijama višim od granica kvantifikacije. Po potrebi, nominalne koncentracije se koriguju tako da obuhvate iskorišćenje količina unijetih zbog kontrole kvaliteta (npr. kada iskorišćenje nije u opsegu od 80 do 120 % unijete količine). Sa svim uzorcima tokom ispitivanja mora se postupati tako da mogućnost kontaminacije i gubici

(npr. oni koji potiču od adsorpcije ispitivane hemikalije na uređaj za uzorkovanje) budu što je moguće manji.

Iskorišćenje ispitivane hemikalije, granice mjerenja i granice otkrivanja prisustva u sedimentu i vodi treba da se evidentiraju i unesu u izvještaj.

8. PODACI I IZVJEŠTAJI

8.1. Obrada rezultata

Glavne obavezne varijable odgovora u ispitivanju koje je potrebno statistički ocijeniti jesu biomasa i ukupni broj crva po ponavljanju. Po izboru, mogu se ocjenjivati i reprodukcija (u smislu porasta broja crva) i rast (u smislu porasta suve biomase). U tom slučaju, potrebno je procjeniti suvu masu crva na početku izlaganja npr. mjerenjem suve mase reprezentativnog poduzorka serije sinhronizovanih crva koji će se koristiti u ispitivanju.

Mada smrtnost ne predstavlja parametar praćenja u ovom ispitivanju, ocjenjivanje smrtnosti vrši se koliko god je to moguće. Za potrebe procjene smrtnosti, mrtvim se smatraju crvi koji ne reaguju na blagi mehanički podsticaj ili pokazuju znake raspadanja, kao i crvi koji nedostaju. Smrtnost bi makar trebalo da se evidentira prilikom tumačenja rezultata ispitivanja.

Koncentracije koje proizvode odgovor trebalo bi da se iskazuju u mg/kg suve mase sedimenta. Ako iskorišćenost ispitne hemikalije izmjerena u sedimentu ili u sedimentu i vodi iznad njega na početku perioda izlaganja iznosi između 80 i 120% nominalnih koncentracija, koncentracije koje proizvode odgovor (ECx, NOEC, LOEC) mogu se iskazati na osnovu nominalnih koncentracija. Ako iskorišćenje odstupa od nominalnih koncentracija za više od ± 20 %, koncentracije koje proizvode odgovor (ECx, NOEC, LOEC) treba zasnovati na prvobitno izmjerenim koncentracijama na početku izlaganja, npr. uzimajući u obzir bilans mase ispitivane hemikalije u ispitnom sistemu (v. stav 30). U tim slučajevima, dodatne informacije mogu se dobiti analizom osnovnih rastvora ili rastvora za primjenu da bi se potvrdilo da su ispitni sedimenti ispravno pripremljeni.

8.2. Vrijednost ECx

Vrijednosti ECx za parametre iz stava 60 iizračunavaju se primjenom odgovarajućih statističkih metoda (probit analizom, logističkom ili Vejbulovom funkcijom, modifikovanom Spirman-Karber metodom ili prostom interpolacijom). Smjernice za statističko ocjenjivanje date su u (15) i (59). ECx se dobija tako što se vrijednost koja odgovara postotku x kontrolne srednje vrijednosti unosi u dobijenu jednačinu. Za iizračunavanje EC50 ili bilo koje druge vrijednosti ECx, na srednje vrijednosti primjenjuje se regresiona analiza.

8.3. NOEC/LOEC

Ako se statističkom analizom vrši određivanje vrijednosti NOEC/LOEC, potrebno je dobiti statističke podatke po svakoj posudi (pojedinačne posude smatraju se ponavljanjima). Potrebno je primijeniti odgovarajuće statističke metode. Uopšteno govoreći, štetna dejstva ispitne hemikalije u poreĐenju sa kontrolom istražuju se jednosmjernim testiranjem hipoteze za $p \leq 0,05$. Primjeri su dati u sljedećem stavu.

Normalna raspodjela podataka može se ispitivati npr. testom ponašanja po distribuciji Kolmogorova-Smirnova, testiranjem odnosa opsega i standardne devijacije (R/s test), Šapiro-Vilkovim testom (Shapiro-Wilk) (dvosmjerni, $p \leq 0,05$). Za utvrĐivanje homogenosti varijanse mogu se primijeniti Kohranov test (Cochran), Levenov test (Levene), Bartletov test

(Bartlett) (dvosmjerni, p ≤ 0,05). Ako su ispunjeni preduslovi parametrijskih ispitnih metoda (normalnost, homogenost varijanse), mogu se izvoditi testovi jednosmjerne analize varijanse (ANOVA) i zatim testovi višestrukog poređenja. Da bi se izračunalo da li postoje značajne razlike (p ≤ 0,05) između kontrola i različitih koncentracija hemikalija, pristupa se poređenju parova (npr. Danetov t-test) ili testiranju hipoteze za trend opadanja (Vilijamsov test). U ostalim slučajevima, za utvrđivanje vrijednosti NOEC i LOEC, potrebno je primjenjivati neparametrijske metode (Bonferonijev U-test prema Holmu ili Džonkhir-Terpstrin test trenda).

8.4. Granično ispitivanje

Ako je obavljeno granično ispitivanje (poređenje kontrole i samo jednog tretmana) i ako su ispunjeni preduslovi parametrijskih ispitnih metoda, (normalnost, homogenost), metrički odgovori (ukupan broj crva, biomasa kao suva masa crva) mogu se procijeniti Studentovim testom (t-testom). Ako ti preduslovi nisu ispunjeni, mogu se primijeniti T-test nejednakih varijansi (Velčov t-test) ili neparametrijski test kao što je Man-Vitnijev U-test. U Dodatku 6 date su neke informacije o statističkoj moći do kojih se došlo za vrijeme testiranja hipoteze u uporednom ispitivanju metode.

Za određivanje značajnih razlika između kontrola (kontrola i kontrola sa rastvaračem), ponavljanja svake kontrole mogu se ispitivati na način koji je opisan kod graničnog ispitivanja. Ako se ovim testovima ne otkriju značajne razlike, sva ponavljanja iz kontrole i kontrole sa rastvaračem mogu da se objedine. U protivnom, potrebno je da se svi tretmani uporede sa kontrolom sa rastvaračem.

8.5. Tumačenje rezultata

Rezultati se moraju pažljivo tumačiti ako je došlo do odstepena od ove ispitne metode, kao i onda kada se izmjerene ispitne koncentracije kreću oko granice detekcije primijenjene analitičke metode.

8.6. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju mora obuhvatiti najmanje sljedeće informacije:

8.6.1. Ispitivana hemikalija:

- podatke za identifikaciju hemikalije (opšti naziv, hemijski naziv, strukturnu formulu, broj CAS, itd.) zajedno sa čistoćom i analitičkom metodom za kvantifikaciju ispitivane hemikalije; izvor ispitivane hemikalije, identitet i koncentraciju svakog rastvarača koji se koristi;
- sve dostupne podatke o fizičkom stanju i fizičkim i hemijskim svojstvima do kojih se došlo prije početka ispitivanja (npr. rastvorljivost u vodi, napon pare, koeficijent raspodjele u zemljištu (odnosno u sedimentu), log Kow, stabilnost u vodi, itd.);

8.6.2. Ispitna vrsta:

- naučni naziv, izvor, sve prethodne obrade, aklimatizaciju, uslove uzgoja, itd.

8.6.3. Uslovi ispitivanja:

- primijenjeni ispitni postupak (npr. statički, polustatički ili protočni);

- plan ispitivanja (npr. broj, materijal i veličinu ispitnih posuda, zapreminu vode po posudi, masu i zapreminu sedimenta po posudi, (za protočne ili polustatičke postupke: brzinu zamjene vode), sve aeracije izvršene prije i za vrijeme ispitivanja, broj ponavljanja, broj crva po ponavljanju na početku izlaganja, broj ispitnih koncentracija, trajanje perioda kondicioniranja, postizanja ravnoteže i izlaganja, učestalost uzorkovanja);
- dubinu sedimenta i vode nad sedimentom;
- metodu prethodne obrade ispitivane hemikalije i metodu uvođenja hemikalije radi obogaćivanja, odnosno metodu primjene ispitivane hemikalije;
- nominalne ispitne koncentracije, detalje o uzorkovanju za potrebe hemijske analize, i analitičke metode pomoću kojih su dobijene koncentracije ispitivane hemikalije;
- svojstva sedimenta na način opisan u stavu 24-25, i sva druga izvršena mjerenja; pripremu formulisanog sedimenta;
- pripremu ispitne vode (kada se koristi obrađena voda) i njena svojstva prije početka ispitivanja (koncentracija kiseonika, pH vrijednost, provodljivost, tvrdoća i sva druga izvršena mjerenja);
- detaljne podatke o davanju hrane uključujući vrstu hrane, pripremu, količinu i režim hranjenja;
- intenzitet svjetlosti i fotoperiod(e);
- metode primijenjene za određivanje svih bioloških parametara (npr. uzorkovanje, pregled, vaganje ispitnih organizama) i svih abiotičkih parametara (npr. kvalitet vode i sedimenta);
- zapremine i/ili mase svih uzoraka za hemijsku analizu;
- detaljne podatke o obradi svih uzoraka za hemijsku analizu, uključujući i detalje o pripremi, skladištenju, pokolonama obogaćivanja, ekstrahovanja i analitičkim pokolonama (i preciznosti) za ispitivanu hemikaliju, i iskorišćenje ispitivane hemikalije.

8.6.4. Rezultati:

- kvalitet vode u ispitnim posudama (pH vrijednost, temperatura, koncentracija rastvorenog kiseonika, tvrdoća, koncentracija amonijaka i sva druga izvršena mjerenja);
- ukupni sadržaj organskog ugljenika (TOC), odnos suve mase i mokre mase, pH vrijednost sedimenta i sva druga izvršena mjerenja;
- ukupan broj, i ako se određuje, broj cijelih crva i crva kojima nedostaju djelovi tijela u svakoj ispitnoj posudi na kraju ispitivanja;
- suvu masu crva u svakoj ispitnoj posudi na kraju ispitivanja, i, ukoliko se mjeri, suvu masu poduzorka crva na početku ispitivanja;
- svako uočeno abnormalno ponašanje u odnosu na kontrole (npr. izbjegavanje sedimenta, prisustvo ili odsustvo fekalnih peleta);
- uočene smrtnosti;
- procjenu toksičnih parametara praćenja (npr. ECx, NOEC i/ili LOEC) i statističke metode koje su primijenjene za njihovo određivanje;
- nominalne ispitne koncentracije, izmjerene ispitne koncentracije i rezultate svih analiza kojima se utvrđuje koncentracija ispitivane hemikalije u ispitnim posudama; - sva odstepena od kriterijuma valjanosti.

8.6.5. Vrednovanje rezultata:

- usaglašenost rezultata sa kriterijumima valjanosti iz stava 13;
- diskusiju rezultata, uključujući i sve uticaje koje na rezultate ispitivanja imaju odstepena od ove ispitne metode.

Dodatak 1

Značenje izraza

Za potrebe ove ispitne metode podrazumijeva se da je:

- **hemikalija** – supstanca ili smješa,
- **period kondicioniranja** - primjenjuje se za stabilizovanje mikrobnih sastojaka sedimenta i za uklanjanje npr. amonijaka koji nastaje od sastojaka sedimenta; vrši se prije obogaćivanja sedimenta ispitivanom hemikalijom. Obično se voda nad sedimentom baca prije nego što će se obaviti kondicioniranje,
- **ECx** – koncentracija ispitivane hemikalije u sedimentu koja proizvodi X% odgovora (npr. 50%) kod biološkog parametra tokom određenog vremena izlaganja,
- **period postizanja ravnoteže** – primjenjuje se da bi se omogućila raspodjela ispitivane hemikalije između čvrste faze, porne vode i vode nad sedimentom; odvija se poslije bogaćenja sedimenta ispitivanom hemikalijom, a prije dodavanja ispitnih organizama,
- **faza izlaganja** – vrijeme tokom kojega se ispitni organizmi izlažu ispitivanoj hemikaliji,
- **formulisani sediment ili obrađeni, vještački ili sintetički sediment** – smješa materijala koji se koriste da imitiraju fizičke sastojke prirodnog sedimenta,
- **najniža koncentracija sa vidljivim efektom (LOEC)** – najniža ispitana koncentracija ispitivane hemikalije pri kojoj se posmatra ispitivana hemikalija, a koja, u poređenju sa kontrolom, proizvodi značajan toksični odgovor (pri $p \leq 0,05$). Sve ispitne koncentracije iznad vrijednosti LOEC moraju proizvoditi odgovore koji su jednaki ili veći od vrijednosti LOEC. Ako se ta dva uslova ne mogu ispuniti, mora se dati detaljno objašnjenje o tome kako je izabrana vrijednost LOEC (a time i NOEC),
- **koncentracija bez vidljivog efekta (NOEC)** – ispitna koncentracija odmah ispod vrijednosti LOEC koja, kada se uporedi sa kontrolom, ne proizvodi statistički značajan odgovor ($p \leq 0,05$) u datom vremenu izloženosti,
- **koeficijent raspodjele oktanola i vode (Kow; označava se i sa Pow)** - odnos rastvorljivosti hemikalije u n-oktanolu i vodi u ravnoteži koji istovremeno predstavlja lipofilnost hemikalije (poglavlje A.24 ovog Aneksa). Kow ili logaritam Kow (log Kow) koristi se da ukaže na potencijal bioakumulacije hemikalije koji imaju vodeni organizmi,
- **koeficijent raspodjele organskog ugljenika i vode (Koc)** - odnos koncentracije hemikalije u/na dijelu sedimenta sa organskim ugljenikom i koncentracije hemikalije u vodi u ravnoteži,
- **voda nad sedimentom** – voda koja prekriva sediment u ispitnoj posudi,
- **porna voda ili međuprostorna voda** – voda koja zauzima prostor između sedimenta i čestica zemlje,
- **obogaćeni sediment** – sediment kome je dodata ispitivana hemikalija,

- **ispitivana hemikalija** – svaka supstanca ili smješa čije se ispitivanje vrši ovom ispitnom metodom.

Dodatak 2

Sastav preporučene obrađene vode

a) Rastvor kalcijum-hlorida

Rastvoriti 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ u dejonizovanoj vodi; dodavati dejonizovanu vodu dok se ne dobije zapremina od 1 litra

b) Rastvor magnezijum-sulfata

Rastvoriti 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ u dejonizovanoj vodi; dodavati dejonizovanu vodu do zapremine od 1 litra

c) Rastvor natrijum-bikarbonata

Rastvoriti 2,59 g $NaHCO_3$ u dejonizovanoj vodi; dodavati dejonizovanu vodu dok se ne dobije zapremina od 1 litra

d) Rastvor kalijum-hlorida

Rastvoriti 0,23 g KCl u dejonizovanoj vodi; dodavati dejonizovanu vodu do zapremine od 1 litra.

Sve hemikalije moraju imati analitički stepen čistoće.

Provodljivost destilovane ili dejonizovane vode ne smije biti veća od 10 μScm^{-1}.

25 ml od svih rastvora (a) do (d) miješa se i dodaje se dejonizovana voda dok se ne dobije zapremina od 1 litra. Zbir jona kalcijuma i magnezijuma u rastvorima iznosi 2,5 mmol/l. Odnos Ca:Mg jona iznosi 4:1, a Na:K jona 10:1. Kapacitet kiselosti $K_S4.3$ tog rastvora iznosi 0,8 mmol/l.

Vrši se aeracija vode za razblaživanje dok se ne dostigne zasićenost kiseonikom, a zatim se, prije upotrebe, čuva približno dva dana bez dalje aeracije.

Dodatak 3

Fizička i hemijska svojstva prihvatljive vode za razblaživanje

Sastojak	Koncentracije
Suspendovane čestice	< 20 mg/l
Ukupni organski ugljenik	< 2 µg/l
Nejonizovani amonijak	< 1 µg/l
Rezidualni hlor	< 10 µg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
Ukupni organofosforni pesticidi plus polihlorisani bifenili	< 50 ng/l

Ukupni organski hlor	< 25 ng/l

Preuzeto od OECD-a (1992) (1))

Dodatak 4

Preporučeni vještački sediment — smjernice za pripremu i skladištenje

1. Sastojci sedimenta

Sastojak	Svojstva	% suve mase sedimenta
Treset	Treset od mahovine roda Sphagnum, stepen razgradnje: „srednji—, sušen na vazduhu, bez vidljivih biljnih ostataka, fino usitnjen (veličina čestice ≤ 0,5 mm)	5 ± 0,5
Kvarcni pijesak	Veličina zrna: ≤ 2 mm, ali > 50 % čestica mora u opsegu od 50 do 200 μm	75 - 76
Kaolinitska glina	Sadržaj kaolinita ≥ 30 %	20 ± 1
Izvor hrane	Npr. sprašena kopriva (Folia urticae), listovi obične koprive (Urtica dioica), fino usitnjeni (veličina čestice ≤ 0,5 mm); u skladu sa farmaceutskim standardima, za ishranu ljudi; koja se dodaje suvom sedimentu	0,4 - 0,5 %
Organski ugljenik	PrilagoĐen dodavanjem treseta i pijeska	2 ± 0,5
Kalcijum- karbonat	CaCO3, sprašen, hemijskog stepena čistoće, koji se dodaje suvom sedimentu	0,05 - 1
Dejonizovana voda	Provodljivost ≤ 10 μS/cm, dodaje se suvom sedimentu	30 - 50

Napomena: Ako se očekuju povišene koncentracije amonijaka, npr. ako se zna da ispitivana hemikalija inhibira nitrifikaciju, može biti korisno da se celulozom zamijeni 50% sprašene koprive bogate azotom (npr. sprašenom α-celulozom hemijskog stepena čistoće, veličina čestice ≤ 0,5 mm; (1) (2)).

2. Priprema

Treset se suši na vazduhu i fino spraši. Pripremi se suspenzija od potrebne količine sprašenog treseta u dejonizovanoj vodi uz pomoć homogenizatora visokih performansi. pH vrijednost suspenzije reguliše se na 5,5 ± 0,5 pomoću CaCO3. Suspenzija se kondicionira najmanje dva dana blagim miješanjem na 20 ± 2 °C dok se ne stabilizuje pH vrijednost i ne uspostavi stabilna mikrobna komponenta. Ponovo se mjeri pH vrijednost koja treba da iznosi 6,0 ± 0,5. Zatim se miješa suspenzija od treseta sa drugim sastojcima (pijeskom i

kaolinitskom glinom) i dejonizovanom vodom dok se ne dobije homogeni sediment sa sadržajem vode u opsegu od 30 do 50 procenata suve mase sedimenta. pH vrijednost krajnje smješe sedimenta mjeri se ponovo i, ako je potrebno, reguliše pomoću CaCO3 tako da iznosi od 6,5 do 7,5. Ako se očekuje da dođe do pojave amonijaka, može biti korisno da se pH vrijednost sedimenta održava ispod 7,0 (npr. između 6,0 i 6,5). Uzimaju se uzorci sedimenta da bi se odredila suva masa i sadržaj organskog ugljenika. Ako se očekuje da dođe do pojave amonijaka, formulisani sediment može se kondicionirati sedam dana u istim uslovima koji će preovladavati u samom ispitivanju (npr. odnosa sedimenta i vode 1 : 4, visina sloja sedimenta kao u ispitnim posudama) prije nego što se pristupi njegovom bogaćenju ispitivanom hemikalijom, tj. potrebno ga je prekriti prethodno aerisanom vodom. Na kraju perioda kondicioniranja, voda nad sedimentom treba da se ukloni i baci. Obogaćeni kvarcni pijesak zatim se miješa sa sedimentom za svaki nivo tretmana, sediment se raspoređuje u ispitne posude i prekriva ispitnom vodom. Ispitne posude se zatim inkubiraju u istim uslovima koji preovladavaju u samom ispitivanju. Tu počinje period postizanja ravnoteže. Mora se vršiti aeracija vode nad sedimentom.

Izvor hrane koji je izabran treba da se doda prije ili za vrijeme obogaćivanja sedimenta ispitivanom hemikalijom. Može da se umiješa na početku sa suspenzijom treseta (na način opisan u nastavku). Prekodnosna razgradnja izvora hrane prije dodavanja ispitnih organizama – npr. kada je potrebno duže vrijeme da se postigne ravnoteža – može da se izbjegne time što će se vrijeme koje protekne između dodavanja hrane i početka izlaganja skratiti koliko god je to moguće.

3. Skladištenje

Suvi sastojci vještačkog sedimenta mogu se čuvati na suvom i hladnom mjestu ili na sobnoj temperaturi. Pripremljeni sediment obogaćen ispitivanom hemikalijom mora se odmah upotrijebiti u ispitivanju. Uzorci obogaćenog sedimenta mogu se do vršenja analize skladištiti u uslovima koji se preporučuju za određenu ispitivanu hemikaliju.

Dodatak 5

Metode uzgoja za vrstu Lumbriculus variegatus

Lumbriculus variegatus (MÜLLER) Lumbriculidae, Oligochaeta naseljava slatkovodne sedimente i u širokoj je upotrebi u ekotoksikološkim ispitivanjima. Vrsta se može lako uzgajati u laboratorijaskim uslovima. Metode uzgoja ukratko su opisane u nastavku dodatka.

1. Metode uzgoja

Detaljan pregled uslova uzgoja za vrstu Lumbriculus variegatus daju Fips i dr. (1993) (Phipps), Branson i dr. (Brunson) (1998), ASTM (2000), Agencija za zaštitu životne sredine SAD (2000) (4). Sažetak tih uslova dat je u nastavku dodatka. Najvažniju prednost vrste L. variegatus čini njena brza reprodukcija, čime se u kratkom vremenskom periodu značajno povećava biomasa laboratorijaski uzgojenih populacija.

Crvi se mogu uzgajati u velikim akvarijumima (57 -80 l) na temperaturi od 23 °C sa fotoperiodom koji podrazumijeva 16 sati svjetlosti pa 8 sati mraka (100 – 1 000 lx), u prirodnoj vodi koja se mijenja na dnevnoj bazi (45 -50 l po akvarijumu). Supstrat se priprema tako što se neizbjeljivani smeđi papirni ubrusi isijeku na trake koje se zatim nekoliko sekundi miješaju sa vodom za uzgoj da bi se dobili mali komadi papirnog supstrata. Takav supstrat može se zatim direktno koristiti u bazenima u kojima se vrši uzgoj vrste Lumbriculus tako što

će se njime prekriti dno bazena ili se može zamrznut čuvati u dejonizovanoj vodi da bi se kasnije upotrijebio. Novi supstrat u bazenu obično može trajati približno dva mjeseca.

Svaka kultura crva isprva broji od 500 do 1 000 crva i 3 puta sedmično hrani se sa 10 ml suspenzije koja sadrži 6 g prve hrane za pastrmku u protočnim uslovima i uslovima koji podrazumijevaju obnavljanje vode. Statičke ili polustatičke kulture potrebno je hraniti sporijom dinamikom da bi se spriječio razvoj bakterija i gljivica.

U tim uslovima broj jedinki u kulturi obično se udvostruči za približno 10 do 14 dana.

Alternativno, vrsta Lumbriculus variegatus može se uzgajati u sistemu koji čine sloj kvarcnog pijeska koji se koristi kao vještački sediment (1-2 cm dubine) i obrađena voda. Kao ispitne posude mogu se upotrijebiti staklene zdjele ili zdjele od nerđajućeg čelika visine od 12 do 20 cm. Vrši se blaga aeracija vodene mase (npr. 2 klobuka po sekundi) Pasterovom pipetom koja se drži na odstojanju od približno 2 cm iznad površine sedimenta. Da bi se izbjegla akumulacija npr. amonijaka, zamjena vode nad sedimentom vrši se uz pomoć protočnog sistema ili ručno najmanje jednom sedmično. Oligohete se mogu držati na sobnoj temperaturi sa fotoperiodom koji podrazumijeva 16 sati svjetlosti (intenziteta od 100 do 1 000lx) pa 8 sati mraka. Kod polustatičkih kultura (gdje se voda obnavlja jednom sedmično), crvi se hrane hranom TetraMin dva puta sedmično (npr. 0,6 – 0,8 mg po cm2 površine sedimenta) koji se može dati u vidu suspenzije od 50 mg TetraMina po ml dejonizovane vode.

Vrsta Lumbriculus variegatus može se izdvojiti iz kulture npr. prenošenjem supstrata pomoću fine mreže ili prenošenjem organizama pomoću staklene pipete polirane na plamenu sa širokim otvorom (prečnik približno 5 mm) u posebnu laboratorijasku čašu. Ako se i supstrat prenosi u tu čašu, čaša u kojoj se nalaze crvi zajedno sa supstratom ostavlja se preko noći u protočnim uslovima, čime će se supstrat ukloniti iz čaše, dok će crvi ostati na dnu posude. Crvi se zatim mogu unijeti u nove bazene za uzgoj ili se mogu dalje obrađivati za potrebe ispitivanja na način koji je utvrđen u (3) i (4) ili onako kako slijedi.

U ispitivanjima sa sedimentom koji podrazumijevaju vrstu L. variegatus, naročito je važno uzeti u obzir način razmnožavanja vrste. Rezultat takve bepolne reprodukcije je pojava dva fragmenta koji se izvjestan period ne hrane dok se glava ili repni dio ne regenerišu. To znači da se kod vrste L. variegatus izlaganje putem gutanja kontaminiranog sedimenta ne odvija kontinuirano.

Zato je potrebno izvršiti sinhronizaciju kako bi se nekontrolisana reprodukcija i regeneracija smanjile koliko god je to moguće, i time uticale i na smanjenje znatnih kolebanja u rezultatima ispitivanja koja se javljaju kao posljedica tih procesa. Ta kolebanja mogu nastati kada su neke jedinke koje su fragmentisane i ne uzimaju hranu izvjesno vrijeme manje izložene ispitivanoj hemikaliji od drugih kod kojih ne dođe do fragmentacije za vrijeme ispitivanja. 10 do 14 dana prije početka izlaganja potrebno je vještački fragmentisati crve (sinhronizovati). Za sinhronizaciju je potrebno odabrati velike (odrasle) jedinke koje, po mogućnosti, ne pokazuju znake nedavne morfalakse. Ti crvi mogu se smještiti na predmetno staklo u kapljicu vode za uzgoj kulture i skalpelom secirati u središnjem dijelu tijela. Mora se voditi računa da im zadnji djelovi budu slične veličine. Zadnji djelovi zatim treba da se ostave do početka izlaganja da regenerišu prednje djelove u posudi za uzgoj kulture u kome se nalazi isti supstrat koji se koristi za uzgoj kulture i obrađena voda. Da je došlo do regeneracije glava vidi se po tome što se sinhronizovani crvi ukopavaju u supstrat (prisustvo regenerisanih glava može se potvrditi posmatranjem reprezentativnog poduzorka pod binokularnim mikroskopom). Od tog trenutka smatra se da su ispitni organizmi sličnog fiziološkog stanja. To znači da se očekuje da, kada dođe do reprodukcije morfalaksom kod

sinhronizovanih crva za vrijeme ispitivanja, praktično sve životinje budu jednako izložene obogaćenom sedimentu. Sinhronizovane crve je potrebno hraniti čim počnu da se ukopavaju u supstrat, odnosno 7 dana nakon seciranja. Režim hranjenja treba da je sličan kao kod uobičajenih kultura, ali se savjetuje da se sinhronizovani crvi hrane istim izvorom hrane koji će se koristiti u ispitivanju. Crve je potrebno držati na ispitnoj temperaturi, odnosno na 20 ± 2

°C. U ispitivanju se, poslije regeneracije, koriste nepovrijeĐeni cijeli crvi koji aktivno plivaju ili puze na blagi mehanički podsticaj. Povredu ili autotomiju kod crva potrebno je prevenirati npr. upotrebom pipete čiji su zidovi polirani na plamenu ili stomatološke kirete od nerĐajućeg čelika.

Dodatak 6

Kratak pregled rezultata uporednog ispitivanja

„Test toksičnosti sedimenta na vrsti Lumbriculus variegatus— *Tabela 1:*

Pojedinačni rezultati uporednog ispitivanja: srednji broj crva u kontrolama i kontrolama sa rastvaračem; SD= standardna devijacija; CV=koeficijent varijacije:

	Srednji broj crva u kontrolama	SD	CV (%)	n	Srednji broj crva u kontrolama sa rastvaračem	SD	CV (%)	n
	32,3	7,37	22,80	3	**39,0**	3,61	9,25	3
	40,8	6,55	16,05	6	**36,0**	5,29	14,70	3
	41,5	3,54	8,52	2	**38,5**	7,05	18,31	4
	16,3	5,99	36,67	6	**30,8**	6,70	21,80	4
	24,3	10,69	43,94	3	**26,3**	3,06	11,60	3
	28,5	8,29	29,08	4	**30,7**	1,15	3,77	3
	28,3	3,72	13,14	6	**28,8**	2,56	8,89	6
	25,3	5,51	21,74	3	**27,7**	1,53	5,52	3
	23,8	2,99	12,57	4	**21,3**	1,71	8,04	4
	36,8	8,80	23,88	6	**35,0**	4,20	11,99	6
	33,0	3,58	10,84	6	**33,5**	1,73	5,17	4
	20,7	2,73	13,22	6	**15,0**	6,68	44,56	4
	42,0	7,07	16,84	6	**43,7**	0,58	1,32	3

	18,2	3,60	19,82	6	**21,7**	4,04	18,65	3
	32,0	3,95	12,34	6	**31,3**	4,79	15,32	4
MeĐulaboratorijaska srednja vrijednost	**29,59**		**20,10**		**30,61**		**13,26**	
SD	**8,32**		**10,03**		**7,57**		**10,48**	
n	**15**				**15**			
min	**16,3**				**15,0**			
max	**42,0**				**43,7**			
CV (%)	**28,1**				**24,7**			

Tabela 2: Pojedinačni rezultati uporednog ispitivanja: Ukupna srednja suva masa crva po ponavljanju u kontrolama i kontrolama sa rastvaračem na kraju testa; SD=standardna devijacija; CV=koeficijent varijacije:

	ukupna suva masa crva po ponavljanju (u kontrolama)	SD	CV (%)	n	ukupna suva masa crva pponavljanju (u kontrolama sa rastvaračem)	SD	CV (%)	n
	24,72	6,31	25,51	3	27,35	4,08	14,93	3
	30,17	2,04	6,75	6	33,83	10,40	30,73	3
	23,65	3,61	15,25	2	28,78	4,68	16,28	4
	12,92	6,83	52,91	6	24,90	6,84	27,47	4
	21,31	4,17	19,57	3	25,87	5,30	20,49	3
	22,99	4,86	21,16	4	24,64	5,09	20,67	3
	18,91	1,91	10,09	6	19,89	1,77	8,89	6
	24,13	1,63	6,75	3	25,83	2,17	8,41	3
	22,15	3,18	14,34	4	22,80	2,60	11,40	4
	35,20	8,12	23,07	6	31,42	8,45	26,90	6

	41,28	5,79	14,02	6	41,42	4,37	10,55	4
	15,17	5,78	38,09	6	10,50	3,42	32,53	4
	35,69	8,55	23,94	6	38,22	1,23	3,21	3
	19,57	5,21	26,65	6	28,58	6,23	21,81	3
	29,40	2,16	7,34	6	31,15	2,70	8,67	4
MeĐulaboratorijaska srednja vrijednost	**25,15**		**20,36**		**27,68**		**17,53**	
SD	**7,87**		**12,56**		**7,41**		**9,10**	
n	**15**				**15**			
min	**12,9**				**10,5**			
max	**41,3**				**41,4**			
CV (%)	**31,3**				**26,8**			

Tabela 3:Toksičnost PCP-a: pregled parametara praćenja u uporednom testu; međulaboratorijaske srednje vrijednosti za EC50, NOEC i LOEC; SD = standardna devijacija; CV = keficijent varijacije

biološki parametar		međulaboratorijaska srednja vrijednost (mg/kg)	min	max	međulaboratorijaski faktor	SD	CV (%)	geometrijska srednja vrijednost (mg/kg)
ukupni broj crva	**EC_{50}**	**23,0**	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	NOEC	**9,9**	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	LOEC	**27,9**	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	MDD (%)	**22,5**	7,1	39,1				
ukupna suva masa crva	**EC_{50}**	**20,4**	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	NOEC	**9,3**	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	LOEC	**25,7**	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	MDD (%)	**24,8**	10,9	44,7				
smrtnost/ preživljavanj	**LC_{50}**	**25,3**	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	NOE	**16,5**	2,1		18,8	10,		12,8

e	**C** **LOEC**	 **39,1**	 4,7	40,0 66,7	 14,2	3 18,1	62,4 46,2	 32,6
reprodukcija (povećanje broja crva po ponavljanju)	**EC_{50}** **NOEC** **LOEC** **MDD (%)**	**20,0** **7,9** **22,5** **29,7**	6,7 2,1 2,1 13,9	28,9 20,0 50,0 47,9	4,3 9,4 23,5	7,6 5,2 15,4	37,9 66,0 68,6	18,3 6,4 16,0
rast (uvećanje biomase po ponavljanju)	**EC_{50}** **NOEC** **LOEC** **MDD (%)**	**15,3** **8,7** **24,0** **32,2**	5,7 2,1 2,1 13,6	29,9 20,0 50,0 65,2	5,2 9,4 23,5	7,1 6,0 15,7	46,5 68,1 65,5	13,7 6,9 17,3

MDD: minimalne uočene razlike u odnosu na kontrolne vrijednosti za vrijeme testiranja hipoteze; uzima se kao mjera za statističu snagu

1. UVOD

Ova ispitna metoda ekvivalentna je smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 226 (2008).

Namijenjena je za potrebe procjene dejstva hemikalija u zemljištu na reproduktivni uspjeh grinje u zemljištu vrste Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer Canestrini (Acari: Laelapidae) i omogućava procjenu inhibicije specifične stope rasta populacije. Reproduktivni uspjeh ovdje podrazumijeva broj mladih jedinki na kraju ispitnog perioda. H.aculeifer predstavlja dodatni trofički nivo za vrste za koje su već dostupne ispitne metode. Za potrebe ove ispitne metode, smatra se da je test reproduktivne toksičnosti dovoljan i ako se ne pravi razlika između različitih faza reproduktivnog ciklusa i ne vrši njihova kvantifikacija. Pojedini drugi pristupi mogu više odgovarati za one supstance kojima se organizmi ne izlažu putem zemljišta.

Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer smatra se relevantnim predstavnikom faune u zemljištu, a naročito predatorskih grinja. Rasprostranjena je širom svijeta i može se lako sakupljati i uzgajati u laboratorijai. Sumarni pregled biologije vrste H. aculeifer dat je u Dodatku 7.

2. PRINCIP ISPITIVANJA

Odrasle ženke izlažu se nizu koncentracija ispitivane hemikalije koja je umiješana u zemljište. Test se počinje sa deset odraslih ženski po ispitnoj posudi. Mužjaci se ne uključuju u ispitivanje, zato što je iskustvo pokazalo da se, ako su mužjaci prisutni, ženke pare odmah ili nedugo poslije izlaska iz razvojnog stadijuma deutonimfe. Osim toga, uvrštavanje mužjaka produžilo bi ispitivanje zato što bi postalo neophodno ustanoviti razlike u razvojnim stadijumima. Time je parenje samo po sebi isključeno iz ispitivanja. Ženke se uključuju u test 28 do 35 dana nakon početka lijeganja jajašaca u sinhronizaciji (v. Dodatak 4), jer se time može smatrati da su ženke već završile parenje i da su prošle kroz stadijum prije polaganja jajašaca. Na temperaturi od 20 °C, test se završava četrnaestog dana od uvođenja ženki (dan 0), što je period koji omogućava prvoj kontrolnoj mladoj jedinki da dospije do razvojnog stadijuma deutonimfe (v. Dodatak 4). Glavnu mjerenu varijablu čini broj mladih jedinki utvrđen po ispitnoj posudi i, uz to, broj preživjelih ženki. Reproduktivni uspjeh grinja izloženih ispitnoj hemikaliji poredi se sa reproduktivnim uspjehom u kontrolama kako bi se odredila vrijednost ECx (npr. EC10, EC50) ili koncentracija bez vidljivog efekta (NOEC) (za značenje pojedinih izraza v. Dodatak 1), u zavisnosti od plana eksperimenta (v. stav 29). Pregled rasporeda po kojem se vrši ispitivanje navodi se u Dodatku 8.

3. PODACI O ISPITIVANOJ HEMIKALIJI

Rastvorljivost u vodi, log Kow, koeficijent raspodjele zemljišta i vode i napon pare ispitivane hemikalije treba da budu poznati. Poželjno je znati i dodatne informacije o životnom ciklusu ispitivane hemikalije u zemljištu, kao što su brzina biotičke i abiotičke razgradnje.

Ova ispitna metoda može se primjenjivati za hemikalije koje su rastvorljive u vodi ili nisu rastvorljive u vodi. U zavisnosti od tog svojstva, razlikuje se i način primjene ispitivane hemikalije. Ova ispitna metoda ne primjenjuje se na isparljive hemikalije, odnosno hemikalije za koje je Henrijeva konstanta ili koeficijent raspodjele između vazduha i vode veći od jedan ili na hemikalije čiji napon pare prelazi 0,0133 Pa na temperaturi od 25°C.

4. VALJANOST ISPITIVANJA

Da bi se rezultat ispitivanja smatrao valjanim, u kontrolama kod kojih se ne vrši tretiranje moraju biti zadovoljeni sljedeći kriterijumi:

- srednja vrijednost smrtnosti odraslih ženki ne smije biti veća od 20% na kraju ispitivanja;
- srednji broj mladih jedinki po ponavljanju (na 10 uvedenih ženki) mora da iznosi na manje 50 na kraju ispitivanja;
- koeficijent varijacije dobijen za broj mladih grinja po ponavljanju ne smije biti viši od 30% na kraju glavnog ispitivanja.

5. REFERENTNA HEMIKALIJA

Moraju se odrediti vrijednosti ECx i/ili NOEC referentne hemikalije da bi se osigurali zadovoljavajući uslovi laboratorijaskog ispitivanja i utvrdilo da se odgovor ispitnih organizama nije promijenio tokom vremena. Dimetoat (CAS 60-51-5) predstavlja odgovarajuću referentnu hemikaliju za koju se pokazalo da ima uticaja na veličinu populacije. Borna kiselina (CAS 10043-35-3) može se koristiti kao alternativna referentna hemikalija. Nije stečeno značajnije iskustvo u radu sa njom. Moguća su dva plana eksperimenta:

- Referentna hemikalija može se ispitivati paralelno sa utvrĐivanjem toksičnosti svake ispitivane hemikalije pri jednoj koncentraciji, pri čemu se toksičnost mora prethodno dokazati u ispitivanju doze i responsa u kojem treba da se dobije efekat smanjenja potomstva > 50 %. U tom slučaju, broj ponavljanja treba da bude isti kao u kontrolama.
- Alternativno, referentna hemikalija ispituje se jednom do dva puta godišnje u testu doze i odgovora. U zavisnosti od izabranog plana eksperimenta, razlikuju se i broj koncentracija i ponavljanja i faktor razmaka, ali je potrebno postići odgovor sa efektom od 10 - 90% (faktor razmaka od 1,8%). Vrijednost EC50 za dimetoat, koja se dobija na osnovu broja mladih jedinki, mora biti u opsegu od 3,0 do 7,0 mg a.t./kg zemljišta (suve mase). Na osnovu dosadašnjih rezulatata dobijenih sa bornom kiselinom, vrijednost EC50 koja se dobija na osnovu broja mladih jedinki mora biti u opsegu između 100 i 500 mg/kg suve mase zemljišta.

6. OPIS ISPITIVANJA

6.1. Ispitne posude i oprema

Potrebno je koristiti ispitne posude prečnika od 3 do 5 cm (dubina zemljišta ≥ 1,5 cm), napravljene od stakla ili nekog drugog hemijski inertnog materijala sa poklopcem koji čvrsto prianja. Poželjna je upotreba poklopaca s navojem, tako da se može vršiti aeracija posuda dva puta sedmično. Pored toga, mogu se koristiti i poklopci koji omogućavaju direktnu razmjenu gasova između supstrata i atmosfere (npr. od gaze). Budući da se sadržaj vlage mora održavati na dovoljno visokom nivou za vrijeme ispitivanja, izuzetno je važno

kontrolisati masu svake eksperimentalne posude tokom ispitivanja i po potrebi nadoknaĐivati vodu. To može biti od posebne važnosti ako nisu dostupni poklopci na navoj. Ako se upotrebljava neprovidna ispitna posuda, poklopac mora biti od materijala koji omogućava da svjetlost dopire (npr. perforisani providni poklopac), a koji istovremeno sprječava da grinje pobjegnu. Veličina i vrsta ispitne posude zavisi od metode ekstrahovanja (za bliže podatke v.

Dodatak 5). Ako se ekstrahovanje izlaganjem toploti sprovodi direktno u ispitnoj posudi, na dno se može dodati mreža odgovarajuće veličine otvora (ostaje pričvršćenja do početka ekstrahovanja), a zemljište mora biti dovoljno duboko da se omogući da se uspostavi gradijent temperature i vlage.

Zahtijeva se standardna laboratorijaska oprema, a naročito sljedeća oprema:

- poželjne su staklene posude sa poklopcem na navoj;
- sušara;
- stereomikroskop;
- četkice za prenošenje grinja; - pH-metar i luksometar;
- odgovarajuća precizna vaga;
- odgovarajuća oprema za kontrolu temperature;
- odgovarajuća oprema za kontrolu vlažnosti vazduha (nije potrebna ako posude koje se izlažu imaju poklopce);
- inkubator ili mala komora sa regulisanom temperaturom;
- oprema za ekstrahovanje (u skladu sa Dodatkom 5) (13);
- viseća panel-lampa sa regulatorom jačine svjetlosti; - tegle za sakupljanje ekstrahovanih grinja.

6.2. Priprema vještačkog zemljišta

Za potrebe ovog ispitivanja koristi se vještačko zemljište. Ono se sastoji od sljedećih sastojaka (sve vrijednosti zasnovane su na suvoj masi):

- 5 % treseta od mahovine roda Sphagnum, sušenog na vazduhu i fino usitnjenog (prihvata se veličina čestice 2 ± 1 mm);
- 20 % kaolinitske gline (poželjno da je sadržaj kaolinita iznad 30 %);
- približno 74 % na vazduhu sušenog industrijskog pijeska (u zavisnosti od potrebne količine $CaCO_3$), pretežno sitnog pijeska sa više od 50 % čestica između 50 i 200 mikrona. Tačna količina pijeska zavisi od količine $CaCO_3$, zajedno treba da čine do 75%.
- < 1,0 % kalcijum-karbonata ($CaCO_3$, sprašenog, analitičkog stepena čistoće) da se dobije pH vrijednost od 6,0 ± 0,5; količina kalcijum-karbonata koja treba da se doda prije svega može da zavisi od kvaliteta/prirode treseta.

Napomena 1: Količina potrebnog $CaCO_3$ zavisi od sastojaka supstrata i mora se odrediti mjerenjem pH vrijednosti poduzoraka zemljišta neposredno prije ispitivanja.

Napomena 2: Sadržaj treseta u takvom vještačkom zemljištu odstupa od drugih ispitnih metoda koje se primjenjuju u ispitivanjima na organizmima u zemljištu, gdje se, u većini slučajeva, koristi 10% treseta. Međutiim, prema EPPO, tipično poljoprivredno zemljište ne

sadrži više od 5% organske materije, pa smanjenje sadržaja treseta otuda odražava smanjene mogućnosti prirodnog zemljišta da vrši sorpciju ispitivane hemikalije na organski ugljenik.

Napomena 3: Po potrebi, npr. radi vršenja specifičnih ispitivanja, kao ispitni supstrat, odnosno supstrat za uzgoj kultura mogu poslužiti i prirodna zemljišta sa nezagađenih mjesta. Međutiim, kada se koristi prirodno zemljište, moraju biti poznati najmanje sljedeći podaci: porijeklo zemljišta (mjesto sakupljanja), pH vrijednost, sastav zemljišta (raspodjela veličine čestica) i sadržaj organskih materija u njemu. Ako je moguće, potrebno je obuhvatiti i vrstu i naziv zemljišta prema klasifikaciji zemljišta, a zemljište ne smije sadržati nečistoće. Ako je ispitivana hemikalija metal ili organo-metal, potrebno je odrediti i kapacitet katjonske razmjene (CEC) prirodnog zemljišta. Posebno je potrebno obratiti pažnju na to da se ispune kriterijumi valjanosti, jer su podaci o prirodnom zemljištu uglavnom rijetko poznati.

Dobro se izmiješaju suvi sastojci zemljišta (npr. u velikom laboratorijaskom mikseru). Za određivanje pH vrijednosti, koristi se smješa zemljišta i rastvora od 1 M kalijum-hlorida (KCl) ili 0,01 M kalcijum-hlorida ($CaCl_2$) u odnosi 1:5. Ako se kiselost zemljišta ne kreće u predviđenom opsegu, može se regulisati dodavanjem odgovarajuće količine $CaCO_3$. Ako je zemljište suviše bazno, može se regulisati dodavanjem veće količine smješe koju čine prva tri sastojka opisana u stavu 10, ali bez $CaCO_3$.

Maksimalni vodni kapacitet (WHC) vještačkog zemljišta određuje se u skladu sa pokolonama utvrđenim u Dodatku 2. Dva do sedam dana prije početka ispitivanja, suvo vještačko zemljište kvasi se dodavanjem dovoljne količine destilovane ili dejonizovane vode da bi se dobila približno polovina konačnog sadržaja vode, što čini 40 do 60 % maksimalnog vodnog kapaciteta. Sadržaj vlage reguliše se na 40 do 60% maksimalnog vodnog kapaciteta dodavanjem rastvora ispitivane hemikalije i/ili dodavanjem destilovane ili dejonizovane vode. Vrši se još jedna, gruba, provjera sadržaja vlage u zemljištu laganim stiskanjem zemljišta rukom, pri čemu na ispravan sadržaj vlage ukazuje pojava sitnih kapi vode među prstima.

Sadržaj vlage u zemljištu određuje se na početku i na kraju ispitivanja sušenjem do konstantne mase na temperaturi od 105°C u skladu sa Dodatkom 3 ili standardom ISO 11465 (17), a pH vrijednost zemljišta u skladu sa Dodatkom 3 ili standardom ISO 10390. Mjerenja je potrebno vršiti na dodatnim uzorcima u kojima nema grinja, koji su uzeti iz kontrolnog zemljišta i zemljišta sa svakom ispitnom koncentracijom. pH vrijednost zemljišta ne mora se regulisati kada se ispituju kisele ili bazne hemikalije. Sadržaj vlage za vrijeme ispitivanja mora se pratiti periodičnim vaganjem posuda.

6.3. Izbor i priprema ispitnih životinja

Vrsta koja se koristi u ispitivanju je Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer (Canestrini, 1883). Za početak ispitivanja potrebne su odrasle ženke grinja dobijene iz sinhronizovanih grupa.

Grinje je potrebno uvesti približno 7 do 14 dana nakon što postanu odrasle jedinke, 28 do 35 dana nakon što počnu da liježu jajašca u procesu sinhronizacije. Potrebno je evidentirati izvor grinja ili dobavljača i održavanje kulture u laboratorijai. Ako se kultivacija nastavlja u laboratorijai, preporučuje se da se najmanje jednom godišnje obavi potvrda identiteta vrste.

6.4. Priprema ispitnih koncentracija

Ispitivana hemikalija umiješa se u zemljište. Organski rastvarači koji se koriste da pomognu kod tretiranja zemljišta ispitivanom hemikalijom biraju se na osnovu niske toksičnosti za grinje, a u plan ispitivanja potrebno je uključiti i odgovarajuću kontrolu sa rastvaračem.

6.4.1. Ispitivana hemikalija rastvorljiva u vodi

Rastvor ispitivane hemikalije priprema se u dejonizovanoj vodi i to u dovoljnoj količini za sva ponavljanja jedne ispitne koncentracije. Preporučuje se upotreba odgovarajuće količine vode da bi se dostigao potrebni sadržaj vlage, tj. 40 do 60% maksimalnog vodnog kapaciteta (v. stav 12). Svaki rastvor ispitivane hemikaliije dobro se izmiješa sa jednom šaržom prethodno nakvašenog zemljišta prije nego što se unese u ispitne posude.

6.4.2. Ispitivana hemikalija nerastvorljiva u vodi

Kod hemikalija nerastvorljivih u vodi, ali rastvorljivih u organskim rastvaračima, ispitivana hemikalija može se rastvoriti u najmanjoj mogućoj zapremini odgovarajućeg vehikuluma (npr. aceton). Trebalo bi da se koriste samo isparljivi rastvarači. Kod upotrebe takvih vehikuluma, sve ispitne koncentracije i kontrole moraju sadržati istu najmanju količinu vehikuluma. Vehikulum se poprska po maloj količini sitnog kvarcnog pijeska, na primjer 10 g, ili se umiješa u nju. Ukupni sadržaj pijeska u supstratu mora se korigovati za tu količinu. Vehikulum se uklanja tako što pod digestorom isparava najmanje sat vremena. Ta mješavina kvarcnog pijeska i ispitivane hemikalije dodaje se prethodno nakvašenom zemljištu i dobro izmiješa uz dodavanje odgovarajuće količine dejonizovane vode da bi se dobio potrebni nivo vlage. Krajnja smješa sipa se u ispitne posude. Potrebno je uzeti u obzir da neki rastvarači mogu biti toksični za grinje. Stoga se, u slučaju kada nije poznata toksičnost rastvarača za grinje, preporučuje upotreba kontrole sa dodatnom količinom vode bez vehikuluma. Ako postoji dovoljan broj dokaza da rastvarač (u koncentracijama koje će se primjenjivati) ne proizvodi odgovor, kontrola sa vodom može da se isključi.

6.4.3. Ispitivane hemikalije koje su slabo rastvorljive u vodi i organskim rastvaračima

Za hemikalije koje su slabo rastvorljive u vodi i organskim rastvaračima, miješa se 2,5 g fino usitnjenog kvarcnog pijeska po ispitnoj posudi (na primjer 10 g fino usitnjenog kvarcnog pijeska za četiri ponavljanja) sa količinom ispitivane hemikalije koja je potrebna da se dobije željena ispitna koncentracija. Ukupni sadržaj pijeska u supstratu potrebno je korigovati za tu količinu. Ta smješa kvarcnog pijeska i ispitivane hemikalije dodaje se prethodno nakvašenom zemljištu i dobro izmiješa nakon dodavanja odgovarajuće količine dejonizovane vode da se dobije traženi sadržaj vlage. Postupak se ponavlja za svaku ispitnu koncentraciju, a priprema se i odgovarajuća kontrola.

7. POSTUPAK

7.1. Ispitne grupe i kotrole

Preporučuje se upotreba deset odraslih ženki u 20 g suve mase vještačkog zemljišta po svakoj kontrolnoj i ispitnoj posudi. Ispitni organizmi dodaju se u roku od dva sata od pripreme konačnog ispitnog supstrata (tj. poslije primjene ispitne hemikalije). U posebnim slučajevima (npr. kada se odležavanje smatra odlučujućim faktorom), vrijeme između pripreme konačnog ispitnog supstrata i dodavanja grinja može se produžiti. Međutiim, takav postupak mora se naučno obrazložiti.

Poslije dodavanja grinja u zemljište, grinjama se daje hrana, poslije čega je potrebno izvagati početnu masu svake ispitne posude koja će se koristiti kao referentna vrijednost za

praćenje sadržaja vlage u zemljištu tokom ispitivanja, na način opisan u stavu 24. Ispitne posude se zatim pokrivaju kako je opisano u stavu 8 i stavljaju u ispitnu komoru.

Za svaku metodu primjene ispitivane hemikalije koja je opisana u st. 15 do 18, pripremaju se odgovarajuće kontrole. Kontrole se pripremaju u skladu sa utvrĐenim pokolonama, ali se ispitivana hemikalija ne dodaje. Tako se, po potrebi, u kontrolama primjenjuju organski rastvarači, kvarcni pijesak ili drugi vehikulumi u koncentracijama/količinama istim kao i u tretmanima. Kada se koristi rastvarač ili neki drugi vehikulum za dodavanje ispitivane hemikalije, istovremeno se priprema i kontrola bez vehikuluma ili ispitivane hemikalije koja se zatim i testira u slučaju da nije poznata toksičnost tog rastvarača.

7.2. Uslovi ispitivanja

Ispitna temperatura treba da iznosi 20 ± 2 °C. Temperatura se mora evidentirati najmanje na dnevnoj bazi i regulisati po potrebi. Ispitivanje se izvodi u kontrolisanim ciklusima svjetlosti i mraka (po mogućnosti 16 sati svjetlosti i 8 sati mraka) uz osvijetljenost od 400 do 800 luksa u blizini ispitnih posuda. PoreĐenja radi, ti uslovi su isti kao u drugim ekotoksikološkim ispitivanjima).

Mora se omogućiti razmjena gasova aeracijom ispitnih posuda najmanje dva puta sedmično ako se koriste poklopci sa navojem. Ako se posude prekrivaju gazom, posebna pažnja mora se posvetiti održavanju sadržaja vlage u zemljištu.

Tokom ispitivanja, sadržaj vode u zemljištu koje se nalazi u ispitnim posudama održava se vaganjem i, po potrebi, periodičnim dodavanjem vode u ispitne posude (npr. jednom sedmično). Gubici se, po potrebi, nadoknaĐuju dejonizovanom vodom. Sadržaj vlage za vrijeme ispitivanja ne smije odstupati od početnih vrijednosti za više od 10%.

7.3. Davanje hrane

Pokazalo se da grinje sira (Tyrophagus putrescentiae (Schrank, 1781)) predstavljaju adekvatan izvor hrane. Osim njih, dobar izbor hrane su i mali skokuni (npr. mlade jedinke Folsomia candida Willem, 1902 ili Onychiurus fimatus (19), enhitreje (npr. Enchytraeus crypticus Vesthajd & Gref, 1992) ili nematode (npr. Turbatrix silusiae de Man, 1913)). Vrsta i količina hrane moraju osigurati dovoljan broj mladih jedinki da bi bili zadovoljeni kriterijumi valjanosti. Kod izbora plijena, potrebno je razmotriti način djelovanja ispitivane hemikalije.

Hranu je potrebno davati ad libitum (malu količinu pri svakom davanju (na vrhu spatule)). U tu svrhu može da se koristi i digestor blage usisne moći kakav se preporučuje u ispitivanju na skokunima ili fina četkica. Uglavnom je dovoljno dati hranu na početku ispitivanja, pa dva do tri puta sedmično. Ako se čini da je ispitivana hemikalija toksična za plijen, potrebno je razmotriti češće davanje hrane i/ili alternativni izvor hrane.

7.4. Izbor ispitnih koncentracija

Pri izboru odgovarajućih ispitnih koncentracija potrebno je prethodno poznavanje toksičnosti ispitivane hemikalije, odnosno iskustvo stečeno za vrijeme ispitivanja za određivanje oblasti koncentracija. Po potrebi, vrši se test za određivanje oblasti koncentracija sa pet koncentracija ispitivane hemikalije u rasponu od 0,1 – 1 000mg/kg suvog zemljišta i najmanje jednim ponavljanjem po tretmanima i kontroli. Test za određivanje oblasti koncentracija traje 14 dana, nakon čega se utvrđuje smrtnost odraslih i broj mladih jedinki grinja. Oblast koncentracija u glavnom ispitivanju treba da bude ustanovljena tako da obuhvati koncentracije pri kojima se javlja odgovor na mladim jedinkama, ali ne i na prethodnoj generaciji. To, međutiim, nije moguće uraditi za hemikalije koje proizvode letalne

i subletalne odgovore pri gotovo sličnim koncentracijama. Koncentracije koje su dio ispitivanja moraju obuhvatiti koncentraciju koja proizvodi odgovor (npr. EC50, EC25, EC10) i oblast koncentracija ispitivane hemikalije u kojoj dolazi do odgovora od interesa. Ekstrapolacija mnogo ispod najniže koncentracije koja proizvodi odgovor na ispitnim organizmima ili iznad najviše ispitane koncentracije treba da se vrši samo u izuzetnim slučajevima, a takav postupak mora se i detaljno obrazložiti u izvještaju.

7.5. Plan eksperimenta

7.5.1. Testovi odnosa između doze i odgovora

Na osnovu preporuka do kojih se došlo iz drugog uporednog ispitivanja (test reprodukcije za enhitreje), predlažu se tri plana. Opšta prihvatljivost sva tri plana potvrĐena je u postupku validacije na vrsti H. aculeifer.

Prilikom određivanja oblasti koncentracija, potrebno je uzeti u obzir sljedeće kriterijume:

- Za utvrĐivanje vrijednosti ECx (npr. EC10, EC50), potrebno je ispitati dvanaest koncentracija. Preporučuju se najmanje dva ponavljanja za svaku ispitnu koncentraciju i šest kontrolnih ponavljanja. Faktor razmaka može da varira, tj. da bude 1,8 ili manji u oblasti koncentracija za koju se očekuje da će proizvesti odgovor, odnosno veći od 1,8 kod viših i nižih koncentracija.
- Za utvrĐivanje vrijednosti NOEC, potrebno je testirati najmanje pet koncentracija u geometrijskom nizu. Preporučuju se četiri ponavljanja za svaku ispitnu koncentraciju i osam kontrola. MeĐu koncentracijama mora postojati faktor razmaka koji nije veći od 2,0.
- Kombinovani pristup predviĐa utvrĐivanje i vrijednosti NOEC i ECx. Potrebno je primijeniti osam ispitnih koncentracija u tretmanima u geometrijskom nizu. Preporučuju se četiri ponavljanja za svaki tretman i osam kontrola. Koncentracije moraju biti odvojene za faktor razmaka koji nije veći od 1,8.

7.6. Granično ispitivanje

Ako pri najvišoj koncentraciji ne doĐe do odgovora u testu za određivanje oblasti koncentracija (tj. 1 000 mg/kg suve mase zemljišta), glavni test reprodukcije može se izvesti kao granično ispitivanje sa ispitnom koncentracijom od 1 000mg/kg suve mase zemljišta. Graničnim ispitivanjem pruža se mogućnost da se dokaže da je vrijednost NOEC ili EC10 za reprodukciju viša od granične koncentracije, a broj grinja koje se koriste u ispitivanju će se smanjiti. Potrebno je koristiti osam ponavljanja i za tretirano zemljište i za kontrolu.

7.7. Trajanje testa i mjerenja

Sve uočene razlike između ponašanja i morfologije grinja u kontroli i u tretiranim posudama moraju se evidentirati.

Četrnaestog dana preživjele grinje se ekstrahuju iz zemljišta izlaganjem toploti/svjetlošću ili drugom odgovarajućom metodom. Posebno se prebrojava broj mladih (npr. larvi, protonimfi i deutonimfi) i odraslih jedinki. Sve odrasle grinje koje u tom trenutku nedostaju treba evidentirati kao mrtve i poći od pretpostavke da su uginule i raspale se prije procjenjivanja. Efikasnost ekstrahovanja mora se potvrditi jednom ili dva puta godišnje u kontrolama sa poznatim brojem odraslih i mladih jedinki. Efikasnost mora iznositi u prosjeku iznad 90% za sve faze razvoja. Broj odraslih i mladih jedinki ne koriguje se za razliku u efikasnosti.

8. PODACI I IZVJEŠTAJI

8.1. Obrada rezultata

Podaci o statističkim metodama koje se mogu primijeniti za potrebe analize rezultata ispitivanja navode se u st. 36 do 41. Pored toga, potrebno je razmotriti i Dokument 54 OECD-a pod nazivom —Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application‖ („Aktuelni pristupi u statističkoj analizi podataka o ekotoksičnosti: smjernice za primjenu—).

Glavni parametar praćenja ispitivanja je reproduktivni uspjeh, odnosno broj izleglih mladih jedinki po ispitnoj posudi (na uvedenih deset odraslih ženki). Statistička analiza zahtijeva iizračunavanje aritmetičke sredine (X) i varijanse (s2) za reproduktivni uspjeh po tretmanu i po kontroli. X i s2 k koriste se za postupke ANOVA kao što su Studentov t-test, Danetov test ili Vilijamsov test, kao i za iizračunavanje intervala povjerenja od 95%.

Napomena: Glavni parametar praćenja odgovara fekunditetu koji se iizračunava kao broj živih mladih jedinki izleglih za vrijeme ispitivanja podijeljen brojem ženki koje su ih izlegle uvedenih na početku testa.

Broj preživjelih ženki u netretiranim kontrolama predstavlja glavni kriterijum valjanosti i mora se evidentirati. Kao i kod testa za određivanje oblasti koncentracija, u završni izvještaj moraju se unijeti i svi drugi znaci negativnih uticaja.

8.2. Vrijednost ECx

Vrijednosti ECx i njihove niže i više granice povjerenja od 95 % za parametar opisan u stavu 34 iizračunavaju se pomoću odgovarajućih statističkih metoda (npr. probit analiza, logistička ili Vejbul funkcija, modifikovana Spirman-Karber metoda ili prosta interpolacija). Vrijednost ECx dobija se unošenjem vrijednosti koja odgovara x-procentnoj kontrolnoj srednjoj vrijednosti u dobijenu jednačinu. Da bi se izračunala vrijednost EC50 ili bilo koja druga vrijednost ECx, na srednju vrijednost po tretmanu (X) mora se primijeniti regresiona analiza.

8.3. Vrijednost NOEC/LOEC

Ako se vrši statistička analiza da se utvrdi vrijednost NOEC/LOEC, neophodni su statistički podaci za svaku posudu (pojedinačne posude smatraju se ponavljanjima). Potrebno je primijeniti odgovarajuće statističke metode (u skladu sa Dokumentom 54 OECD-a o aktuelnim pristupima u statističkoj analizi podataka o ekotoksičnosti: smjernice za primjenu). Uopšteno, negativni efekti ispitivane hemikalije u poređenju sa kontrolom istražuju se pomoću jednosmjernog testiranja hipoteze pri $p \leq 0,05$. Primjeri se navode u narednim stavovima.

Normalna distribucija podataka može se testirati npr. testom ponašanja po distribuciji Kolmogorov-Smirnova, testom odnosa opsega i standardne devijacije (R/s test), ŠapiroVilkovim testom, (dvosmjerni, $p \leq 0,05$). Za utvrđivanje homogenosti varijanse mogu se primijeniti Kohranov test, Levenov test, Bartletov test (dvosmjerni, $p \leq 0,05$). Ako su ispunjeni preduslovi parametrijskih ispitnih metoda (normalnost, homogenost varijanse), mogu se izvoditi testovi jednosmjerne analize varijanse (ANOVA), a zatim i testovi višestrukog poređenja. Da bi se izračunalo da li postoje značajne razlike ($p \leq 0,05$) između kontrola i različitih koncentracija hemikalija (izbor preporučenog testa u skladu sa Dokumentom 54 OECD-a pod nazivom „Aktuelni pristupi u statističkoj analizi podataka o

ekotoksičnosti: smjernice za primjenu), pristupa se poređenju parova (npr. Danetov t-test) ili testiranju hipoteze za trend opadanja (Vilijamsov test). U ostalim slučajevima, za utvrđivanje vrijednosti NOEC i LOEC, potrebno je primjenjivati neparametrijske metode (Bonferonijev Utest prema Holmu ili Džonkhir-Terpstrin test trenda.

8.4. Granično ispitivanje

Ako je izvedeno granično ispitivanje (poređenje kontrole i samo jednog tretmana) i ako su ispunjeni preduslovi parametrijskih ispitnih metoda, (normalnost, homogenost), metrički odgovori (ukupan broj crva, biomasa kao suva masa crva) mogu se procijeniti Studentovim testom (t-testom). Ako ti preduslovi nisu ispunjeni, mogu se primijeniti T-test nejednakih varijansi (Velčov t-test) ili neparametrijski test kao što je Man-Vitnijev U-test.

Za određivanje značajnih razlika između kontrola (kontrola i kontrola sa rastvaračem), ponavljanja svake kontrole mogu se ispitivati na način koji je opisan kod graničnog ispitivanja. Ako se ovim testovima ne otkriju značajne razlike, sva ponavljanja iz kontrole i kontrole sa rastvaračem mogu da se objedine. U protivnom, svi tretmani treba da se uporede sa kontrolom sa rastvaračem.

8.5. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o izvršenom ispitivanju mora obuhvatiti najmanje sljedeće informacije:

8.5.1. Ispitivana hemikalija

- identitet ispitivane hemikalije, naziv, šaržu, seriju i broj CAS, čistoću;
- fizička i hemijska svojstva ispitivane hemikalije (npr. log Kow, rastvorljivost u vodi, napon pare, Henrijeva konstanta (H) i podaci o životnom ciklusu ispitivane hemikalije u zemljištu).

8.5.2. Ispitni organizmi

- identifikaciju i dobavljača ispitnih organizama, opis uslova uzgoja; - sve razvojne stadijume ispitnih organizama.

8.5.3. Uslovi ispitivanja

- opis plana eksperimenta i eksperimentalnih postupaka; description of the experimental design and procedure;
- bliže podatke o pripremi ispitnog zemljišta; detaljnu specifikaciju ako se koristi prirodno zemljište (porijeklo, istorija, distribucija veličine čestica, pH vrijednost, sadržaj organske materije i klasifikacija zemljišta, ako postoji);
- maksimalni vodni kapacitet zemljišta;
- opis tehnike koja je korišćena za primjenu ispitivane hemikalije na zemljište;
- bliže podatke o pomoćnim hemikalijama korišćenim za primjenu ispitivane hemikalije;
- veličinu ispitnih posuda i suvu masu ispitnog zemljišta po posudi;
- uslove ispitivanja: intenzitet svjetlosti, trajanje ciklusa svjetlosti i mraka, temperaturu;
- opis režima davanja hrane, vrstu i količinu hrane koja se koristi u ispitivanju, datume davanja hrane;
- pH vrijednost i sadržaj vode u zemljištu na početku i tokom ispitivanja (kontrola i svaki tretman);
- detaljan opis metode ekstrahovanja i efikasnost ekstrahovanja.

8.5.4. Rezultati ispitivanja

- utvrđeni broj mladih jedinki u svakoj ispitnoj posudi na kraju ispitivanja;
- broj odraslih ženki i smrtnost odraslih jedniki (%) u svakoj ispitnoj posudi na kraju ispitivanja;

- opis očiglednih simptoma ili vidljivih promjena u ponašanju;
- rezultate dobijene u radu sa referentnom ispitivanom hemikalijom;
- rezime statističkih podataka (vrijednost ECx i/ili NOEC) sa granicama povjerenja od 95 % i opisom metode izračunavanja;
- dijagram odnosa između doze i odgovora;
- odstepena od postupaka opisanih u ovoj ispitnoj metodi i sve neuobičajene pojave za vrijeme ispitivanja.

Dodatak 1

Značenje izraza

Za potrebe ove ispitne metode pojedini izrazi imaju sljedeće značenje (u ovom ispitivanju sve koncentracije koje proizvode odgovor izražene su kao masa ispitivane hemikalije po suvoj masi ispitnog zemljišta):

- **hemikalija** – supstanca ili smješa,
- **NOEC (koncentracija bez vidljivog efekta)** – najviša koncentracija ispitivane hemikalije bez vidljivog efekta. U ovom ispitivanju, koncentracija koja odgovara NOEC-u nema statistički značajan efekat ($p < 0,05$) u toku datog vremena izlaganja u poređenju sa kontrolom,
- **LOEC (najniža koncentacija sa vidljivim efektom)** – najniža koncentracija ispitivane hemikalije sa statistički značajnim efektom ($p < 0,05$) u datom periodu izlaganja u poređenju sa kontrolom,
- **ECx (koncentracija povezana sa x% odgovora)** je koncentracija koja uzrokuje x% efekta na oglednim organizmima u toku datog vremena izlaganja u poređenju sa kontrolom. Na primjer, EC50 je koncentracija za koju se procjenjuje da će proizvesti odgovor na ispitivani parametar praćenja kod 50% izložene populacije tokom definisanog perioda izlaganja,
- **ispitivana hemikalija** – svaka supstanca ili smješa koja se ispituje pomoću ove ispitne metode.

Dodatak 2

Utvrđivanje maksimalnog vodnog kapaciteta zemljišta

Sljedeća metoda smatra se podesnom za utvrđivanje maksimalnog vodnog kapaciteta zemljišta. Opisana je u Aneksu C standarda ISO DIS 11268-2 (Kvalitet zemljišta – dejstvo zagađivača na kišne gliste (Eisenia fetida). Dio 2: Utvrđivanje efekata na reprodukciju). Zahvati se utvrđena količina (npr. 5 gr) zemljišta, odnosno ispitnog supstrata odgovarajućim instrumentom (uzorkivačem sa epruvetom itd.). Prekrije se dno epruvete komadom filter papira, epruveta se napuni vodom, pa se smješti na rešetku u kupatilo s tečnošću. Epruveta se postepeno prastvara sve dok nivo vode ne bude iznad površine zemljišta. Zatim se ostavlja u vodi na tri sata. Budući da se u zemljištu ne može zadržati sva voda koju upiju kapilari, uzorak zemljišta teba da se ostavi da se cijedi dva sata tako što se epruveta stavi na podlogu od veoma mokrog fino usitnjenog kvarcnog pijeska u zatvorenoj posudi (da bi se

spriječilo sušenje). Uzorak se nakon toga vaga i suši do stalne mase na 105°C. Vodni kapacitet (WHC) se zatim iizračunava na sljedeći način:

$$\mathrm{WHC\,(in\,\%\,of\,dry\,mass)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$ gdje je:

S= supstrat zasićen vodom + masa epruvete + masa filter papira, T=tara (masaepruvete + masa filter papira), D=suva masa supstrata.

Dodatak 3

Određivanje pH vrijednosti zemljišta Sljedeća metoda za određivanje pH vrijednosti zemljišta bazira se na opisu koji je dat u standardu ISO DIS 10390: kvalitet zemljišta – određivanje pH vrijednosti.

Definisana količina zemljišta suši se na sobnoj temperaturi najmanje 12 sati. Zatim se pravi suspenzija zemljišta (sadrži najmanje 5 grama zemljišta) sa petostruko većom količinom 1 M rastvora kalijum hlorida (Kcl) analitičkog stepena čistoće ili 0,01 M rastvora kalcijum hlorida ($CaCl_2$) analitičkog stepena čistoće. Suspenzija se zatim snažno mućka pet minuta. Kad se završi mućkanje, suspenzija se ostavlja da se taloži najmanje dva sata, ali ne duže od 24 sata. Zatim se mjeri pH vrijednost tečne faze pomoću pH-metra koji se prije svakog mjerenja kalibriše odgovarajućim nizom puferskih rastvora (npr. pH 4,0 i 7,0).

Dodatak 4

Uzgoj vrste Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer, grinja za hranu i sinhronizacija kulture

Uzgoj vrste Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer:

Kulture se mogu održavati u plastičnim posudama ili staklenim teglama u kojima se nalazi smješa modelarskog gipsa i sprašenog drvenog uglja (9:1). Modelarski gips može se, po potrebi, vlažiti dodavanjem nekoliko kapi destilovane ili dejonizovane vode. Optimalne temperature za uzgoj kreću se između 20 ± 2 °C, a režim svjetlosti i mraka nije od važnosti za ovu vrstu. Plijen može biti Typrophagus putrescentiae ili Caloglyphus sp. mites (sa grinjama za hranu potrebno je pažljivo postupati budući da mogu biti uzročnici alergija kod ljudi), ali svrsi služe i nematode, enhitreje i skokuni. Potrebno je evidentirati njihov izvor. Razvoj populacije može se početi jednom jedinom ženkom budući da se mužjaci razvijaju u neoploĐenim jajašcima. Generacije se umnogome preklapaju. Ženka može da živi najkraće 100 dana i da položi približno 100 jajašaca za vrijeme života. Najveća ovipozicija postiže se između 10-og i 40-og dana (od momenta kada postanu odrasle jedinke) i iznosi 2,2 jajašca po jednoj ženki po jednom danu. Razvojni period od faze jajeta do faze odrasle jedinke iznosi približno 20 dana na temperaturi od 20 °C. Potrebno je da se prethodno uzgoji i održava više od jedne kulture.

Uzgoj vrste Typrophagus putrescentiae:

Grinje se drže u staklenoj posudi u kojoj se nalazi sprašeni pivski kvasac koja se zatim stavlja u plastično vedro sa rastvorom KNO_3 kako bi se spriječilo da organizmi pobjegnu.

Grinje za hranu spuštaju se na prah. Nakon toga, pažljivo se izmiješaju sa prahom (koji se mora mijenjati dva puta sedmično) uz pomoć spatule.

Sinhronizacija kulture:

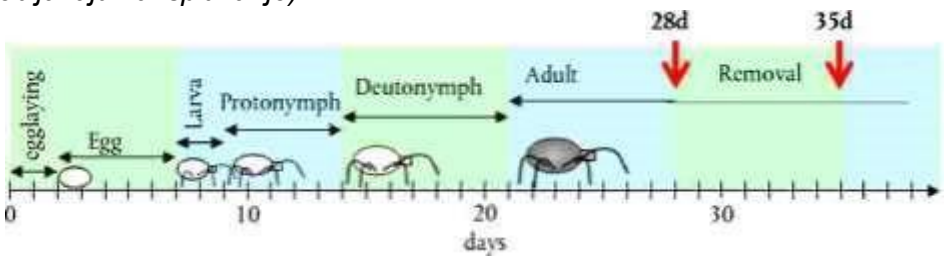
Jedinke koje se podvrgavaju ispitivanju moraju se nalaziti u istom razvojnom stadijumu (približno 7 dana od momenta dostizanja odrasle faze). Pri temperaturi uzgoja od 20 °C, to se postiže na sljedeći način:

Ženke se prenesu u čistu posudu za uzgoj i doda se dovoljna količina hrane.

- Ostavi se dva do tri dana za lijeganje jajašaca, uklone se ženke
- Za ispitivanje se uzmu odrasle ženke između 28. i 35. dana od spuštanja ženki u čiste posude za uzgoj.

Odrasle ženke mogu se lako razlikovati od mužjaka i drugih razvojnih faza po značajnijoj veličini, nabubrelom obliku i smeđem dorzalnom štitu (mužjaci su tanji i pljosnatiji), nedozrele jedinke su bijele do krem boje. Razvoj grinja odvija se prema šemi koja je opisana u nastavku na temperaturi od 20 °C (slika): faza jaja traje 5 dana, faza larve 2 dana, faza protonimfe 5 dana, deutonimfe 7 dana, faza predovipozicije ženki 2 dana. Zatim slijedi razvojni period odrasle jedinke.

Slika: Razvoj vrste Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer pri temperaturi od 20 °C (uklanjanje = ženke koje se upotrebljavaju za ispitivanje)



Odrasle ispitne životinje uklanjaju se iz sinhronizovane kulture i uvode u ispitne posude između 28. i 35. dana od momenta kada su ženke roditelji počele da polažu jaja (tj. 7 do 14 dana od početka faze odrasle jedinke). Cilj takvog postupka je da obezbijedi da ispitne životinje prethodno prođu kroz period predovipozicije i da se pare sa mužjacima koji se takođe nalaze u ispitnoj posudi. Laboratorijaska posmatranja pokazuju da se ženke u prisustvu mužjaka pare neposredno ili nedugo pošto postanu odrasle jedinke (Ruf, Veninen, lična zapažanja) (Ruf, Vanninen). Izabran je vremenski period od 7 dana da bi se olakšao ulazak u laboratorijasku rutinu i da bi se ublažile pojedinačne razlike u razvoju među grinjama. Ovipoziciju je potrebno početi sa najmanje istim brojem ženki koje su potrebne za početak ispitivanja (ako je, na primjer, 400 ženki potrebno za ispitivanje, onda je potrebno ostaviti najmanje 400 ženki da polažu jaja dva do tri dana. Najmanje 1 200 jajašaca treba da posluži kao polazna tačka za sinhronizovanu populaciju (odnos polova pribižno 0,5, smrtnost približno 0,2). Da bi se spriječilo da dođe do kanibalizma, praktičnije je da se u jednoj posudi ne drži više od 20 do 30 ženki koje polažu jaja.

Dodatak 5

Metode ekstrahovanja

Kod mikroartropoda, predviđena metoda izdvajanja jedinki iz zemljišta/supstrata je ekstrahovanje izlaganjem toploti. Metoda se zasniva na aktivnosti organizama, tako da će samo pokretne jedinke moći da se evidentiraju. Princip ekstrahovanja izlaganjem toploti je stvoriti organizmima u uzorku uslove koji postepeno postaju sve nepovoljniji, sve dok oni ne počnu da napuštaju supstrat i upadnu u tečnost za fiksiranje (etanol). Glavni parametri praćenja su trajanje procesa ekstrakcije i uspostavljanje postepeno nepovoljnijih uslova za životinje od dobrih preko srednjih do loših. Ekstrahovanje za potrebe ekotoksikoloških ispitivanja mora trajati što kraće, zato što bi svaki rast populacije za vrijeme procesa ekstrahovanja uslovio lažne rezultate ispitivanja. Sa druge strane, temperatura i vlažnost uzorka moraju uvijek biti u opsegu koji omogućava da se grinje kreću. Zagrijavanje uzorka zemljišta vodi sušenju supstrata. Ako prebrzo dođe do sušenja, može se dogoditi da se i neke od grinja osuše prije nego što uspiju da pobjegnu.

U skladu sa tim, predlaže se sljedeći postupak (24) (25):

Aparatura: Tulgrenov aparat ili naporedne metode kao što su Mekfejdenova (zagrijavanje odozgo, uzorak se smješti na aparat)

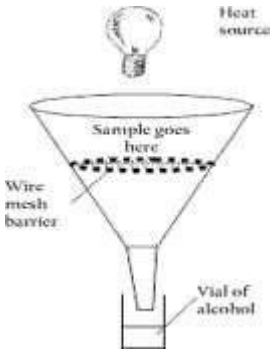
Režim zagrijavanja: 25 °C 12 sati, 35 °C za 12 sati, 45 °C za 24 sata (ukupno 48 sati). Temperatura treba da se mjeri u supstratu.

Tečnost za fiksiranje: 70-procentni etanol

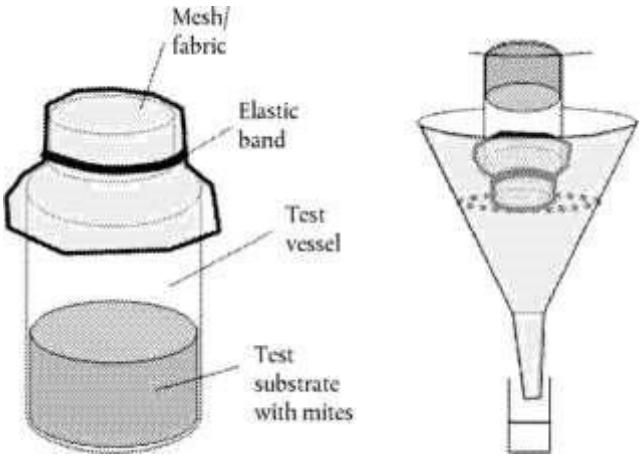
Bliži opis: Uzme se staklena bočica koja je korišćena u ispitivanju. Skine se poklopac i oko otvora omota komad mreže ili tkanine. Veličina otvora tkanine treba da iznosi od 1,0 do 1,5 mm. Tkanina se fiksira elastičnom gumicom. Bočica se pažljivo okrene naopačke i spusti u aparat za ekstrahovanje. Tkanina sprječava da supstrat kapa u tečnost za fiksiranje, ali dopušta grinjama da izađu iz uzorka. Pošto su unijete sve bočice, počne se režim zagrijavanja. Sklone se bočice za fiksiranje i prebroje grinje pod mikroskopom za disekciju.

Efikasnost ekstrahovanja putem izabrane metode mora se potvrditi jednom ili dva puta godišnje uz pomoć posuda koje sadrže poznat broj mladih jedinki i odraslih grinja u netretiranom ispitnom supstratu. Efikasnost treba da u prosjeku bude ≥ 90% za sve razvojne faze zajedno.

Aparat za ekstrahovanje tipa Tulgren



Način pripreme ispitne bočice po završetku ispitivanja, a prije ekstrakcije



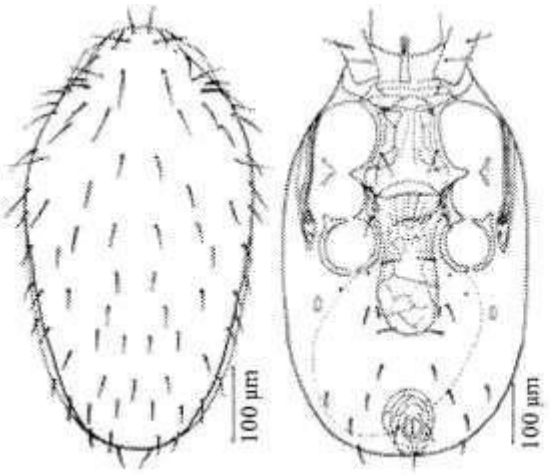
Dodatak 6

Identifikacija vrste Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer

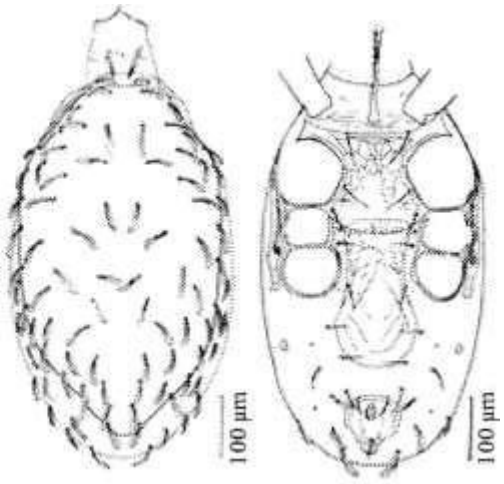
Podklasa/red/podred:	Porodica:	Rod/podrod/vrsta:
Acari/Parasitiformes/Gamasida	Laelapidae	Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer
Autor i datum:	Dr F. Faradži (Faraji) (MITOX), 23 January 2007	

Korišćena literatura:	Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, 2nd revised edition: 1-523. Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: 400pp. Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 pp.

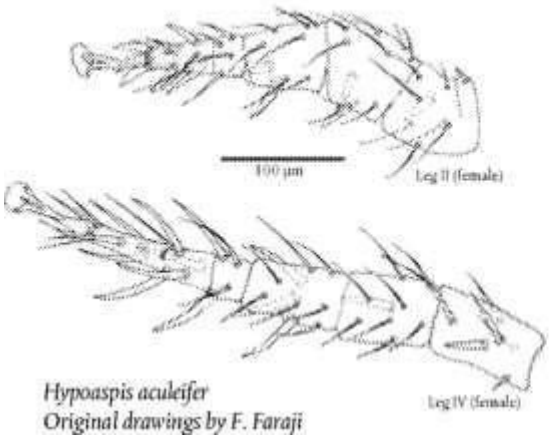
Odredbena svojstva:	Tektum sa zaobljenom nazubljenom ivicom, hipostomske brazde sa više od 6 zuba; kaudalne dorzalne čekinje Z4 ne previše duge; čekinjaste leĐne dlake; genitalni štit normalan, ne previše uvećan da ne doseže do analnog štita; zadnja polovina dorzalnog štita bez neparnih dlaka; noge II i IV sa nekoliko debljih makrodlaka; dorzalne dlake Z5 približno dvostruko duže od J5; fiksni članak kliješta (helicera) sa 12 do 14 zuba i pokretni članak sa dva zuba; grudno-abdominalni region (idiosoma) dužine od 520 do 685 µm. Vrsta Hypoaspis miles takoĐe se koristi za biološko suzbijanje štetočina i može se greškom zamijeniti za H. aculeifer. Najznačajnija razlika meĐu njima je: H. miles pripada podrodu Cosmolaelaps sa dorzalnim dlakama u obliku noža dok H. aculeifer pripada podrodu Geolaelaps i ima čekinjaste dorzalne dlake.



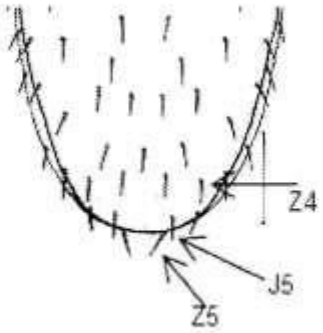
Hypoaspis aculeifer After Hughes, 1976



Hypoaspis miles After Hughes, 1976



Hypoaspis aculeifer
Original drawings by F. Faraji



Hypoaspis aculeifer,
dorsal shield with characteristic setae

Dodatak 7

Osnovne informacije o biologiji Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer

Hypoaspis aculeifer pripada porodici Lealapidae, redu Acari (grinje), klasi Arachnida, plemenu Arthropoda. Nastanjuje sve vrste zemljišta i hrani se drugim grinjama, nematodama, enhitrejama i skokunima. U nedostatku hrane okreću se kanibalizmu. Tijelo predatorske grinje segmentisano je na idiosomu i gnatosomu. Nedostaje jasna diferencijacija idiosome na prosomu (glavu) i opistosomu (abdomen). Gnatosoma (vratni štit) sadrži strukture za uzimanje hrane kao što su palpi i kliješta. Helicere se granaju u tri segmenta koji sadrže zube različitih oblika. Pored unošenja hrane, mužjaci koriste kliješta i za prenošenje spermatofora ženkama. Dorzalni štit pokriva gotovo cijelu idiosomu. Veliki dio idiosome ženke zauzimaju reproduktivni organi koji su naročito istaknuti nedugo prije lijeganja jajašaca. Sa trbušne strane mogu se naći dva štita, grudni i genitalni. Na svakoj nozi nalaze se čekinje i bodlje. Čekinje se koriste da se pričvrste kada se kreću kroz zemljište ili po njegovoj površini. Prvi par nogu uglavnom služi kao antene. Drugi par nogu se, osim za kretanje, koristi i za hvatanje plijena. Bodlje na četvrtom paru nogu mogu se koristiti za zaštitu i kao —pogon pri kretanju‖ . Mužjaci su dugi od 0,55 do 0,65 mm i teže od 10 do 15 µg.

Ženke su duge od 0,8 do 0,9 mm i teže od 50 do 60 µg (8) (28) (Slika 1).

Slika 1

Ženka, mužjak, protonimfa i larve H. aculeifer.

Na temperaturi od 23 °C, grinje dostižu polnu zrelost nakon 16 dana (za ženke) i 18 dana (za mužjake) (6). Ženke primaju spermatozoide putem polnog otvora (selenostoma) odakle će zatim biti prenešeni do jajnika. U jajniku spermatozoidi sazrijevaju i u njemu se čuvaju. Do oplodnje dolazi tek nakon sazrijevanja spermatozoida u jajniku. OploĐena ili neoploĐena jajašca ženke polažu u gomilama ili odvojeno, po mogućnosti u pukotine ili rupe. Ženke koje su kopulirale mogu nositi mlade jedinke oba pola, dok se iz jaja ženki koje nisu kopulirale mogu izleći samo mladi mužjaci. Tokom razvoja u odraslu jedinku, prolaze kroz četiri razvojne faze (jaje -larva, larva-protonimfa, protonimfa-deutonimfa, deutonimfa-odrasla jedinka).

Jajašce je mliječno bijelo, bezbojno, eliptično i dugo približno 0,37 mm sa čvrstom ljuskom. Prema (8), veličina larvi iznosi između 0,42 i 0,45 mm. Rapolažu samo sa tri para nogu. U regionu glave obrazuju se palpi i kliješta. Kliješta, relativno blago nazubljena, koriste se za izlijeganje iz jajeta. Poslije prvog presvlačenja, 1 do 2 dana od izlijeganja, razvijaju se protonimfe. I one su bijele, veličine od 0,45 do 0,62 mm i imaju četiri para nogu. Zubi na kliještima su sasvim razvijeni. Počev od te faze, grinje počinju da traže hranu. Da bi došle do hrane, kutikulu plijena probijaju kliještima i izlučevinu za ekstraintenstinalno varenje ispuštaju u plijen. Grinje zatim mogu posisati dobijenu kašastu hranu. Kliješta se takoĐe mogu koristiti za otkidanje većih komadića od grudvica hrane. Poslije još jednog presvlačenja, razvijaju se deutonimfe. Deutonimfe su veličine od 0,60 do 0,80 mm i žute do svijetlo braon boje. Počev od te faze, mogu se klasifikovati na mužjake i ženke. Nakon što se ponovo presvuku, za vrijeme čega životinje nisu aktivne i još uvijek im se formira smeĐi štit (približno nakon 14 dana), grinje postaju odrasle jedinke. Njihov životni vijek iznosi između 48 i 100 dana na temperaturi od 25°C.

Dodatak 8

Kratak pregled i raspored glavnih aktivnosti neophodnih za izvođenje testa sa Hypoaspis

Vrijeme (dani) početak ispitivanja = dan 0	Aktivnost / zadatak

Dan – 35. do – 28.	Prenijeti ženke iz osnovne kulture u čiste posude da bi se počeo proces sinhronizacije 2 dana kasnije: ukloniti ženke Dva ili tri puta sedmično: dati dovoljnu količinu hrane
Dan – 5 (+/- 2)	Pripremiti vještačko zemljište
Dan – 4 (+/- 2)	Utvrditi WHC vještačkog zemljišta Sušiti preko noći Sljedećeg dana: izvagati uzorke i izračunati WHC
Dan – 4 (+/– 2)	Unaprijed nakvasiti vještačko zemljište da se dobije 20 - 30 % WHC-a
Dan 0	Početak ispitivanja: dodati ispitivanu hemikaliju u vještačko zemljište Uvesti 10 ženki u svaku posudu Izvagati svaku posudu Pripremiti abiotičke kontrole za mjerenje sadržaja vlage i pH vrijednosti, dva ponavljanja za svaki tretman Sušiti kontrole za mjerenje vlage preko noći Naredni dan: izvagati kontrole za mjerenje vlage Naredni dan: izmjeriti pH vrijednost osušenih abiotičkih kontrola
Dan 3, 6, 9, 12 (približno.)	U svaku posudu unijeti dovoljne količine plijena Izvagati svaku posudu i, ako je potrebno, dodati evaporisanu vodu
Dan 14	Završiti ispitivanje, početi ekstrahovanje iz svih posuda i pripremiti kontrole za utvrĐivanje efikasnosti procesa ekstrakcije Preko noći osušiti kontrole za mjerenje sadržaja vode Naredni dan: izvagati kontrole za mjerenje sadržaja vode Naredni dan: izmjeriti pH vrijednost osušenih kontrola
Dan 16	Obustaviti ekstrahovanje
Dan 16 +	Evidentirati broj odraslih i mladih jedinki u ekstrahovanom materijalu Rezultate unijeti u tabele Ispitni postupak unijeti u obrasce protokola ispitivanja

C.37. 21-DNEVNI TEST NA RIBAMA: KRATKOROČNI TEST PRETRAŽIVANJA NA ESTROGENSKU I ANDROGENSKU AKTIVNOST I INHIBICIJU AROMATAZE

1. UVOD

Ova ispitna metoda ekvivalentna je smjernici za ispitivanje OECD-a (TG) 230 (2009). Potreba da se razvije i potvrdi testiranje na ribama kojim se mogu otkriti pojedine hormonski aktivne supstance nastala je iz zabrinutosti da nivoi hemikalija u životnoj sredini mogu imati štetne efekte i na ljude i na životinje zbog interakcije tih istih hemikalija sa endokrinim sistemom. 1998. godine OECD je pokrenula prioritetne radnje u pravcu revidiranja postojećih i razvoja novih smjernica za pretraživanje i ispitivanje potencijalnih endokrinih disruptora. Jedan od elemenata radnji bio je razvoj Smjernice za test pretraživanja endokrino aktivnih hemikalija za riblje vrste. 21-dnevni test pretraživanja hormonski aktivnih supstanci podvrgnut je opsežnom programu validacije koji se sastoji od međulaboratorijaskih studija sa odabranim hemikalijama kojima se potvrđuju relevantnost i pouzdanost testa za otkrivanje hemikalija sa inhibitornim efektom na nivoe aromataze i estrogena kod tri ispitivane vrste riba (velikoglavi klijen, japanska medaka i zebrica); otkrivanje androgenskih aktivnosti moguće je kod velikoglavog klijena i medake, ali ne i kod zebrice. Ova metoda ispitivanja ne predviđa detekciju antiandrogenskih hemikalija. Procjenu postupka validacije izvršila je stručna grupa koju su imenovali nacionalni koordinatori programa Smjernice za ispitivanje.

Test nije namijenjen za prepoznavanje specifičnih mehanizama hormonskih poremećaja zato što ispitivane životinje imaju netaknutu hipotalamusno-hipofizno-gonadalnu (HPG) osovinu koja može reagovati na hemikalije koje na nju utiču na različitim nivoima. Kratkoročni test reprodukcije na ribama (OECD TG 229) obuhvata ispitivanje fekunditeta i, po potrebi, gonadalnu histopatologiju za velikoglavog klijena, kao i parametre praćenja koje uključuje ta ispitna metoda. OECD TG 229 predviđa pretraživanje hemikalija koje utiču na reprodukciju putem različitih mehanizama, uključujući endokrine modalitete. To je potrebno uzeti u obzir prije izbora odgovarajuće ispitne metode.

Ova ispitna metoda opisuje test pretraživanja in vivo u kome se polno zreli mužjaci i ženka koja se mrijesti drže zajedno i izlažu hemikaliji tokom ograničenog dijela životng ciklusa (21 dan). Po isteku perioda izlaganja od 21 dan, u zavisnosti od vrste koja se koristi, kod mužjaka i ženki mjere se jedan ili dva parametra praćenja biomarkera kao indikatori inhibicije estrogena i aromataze ili androgenske aktivnosti kod ispitnih životinja; te parametre praćenja čine vitelogenin i sekundarne polne karakteristike. Vitelogenin se mjeri kod velikglavog klijena, japanske medake i zebrice, dok se sekundarne polne karakteristike mjere samo kod velikoglavog klijena i japanske medake.

Ovaj biotest služi kao test pretraživanja in vivo na određene hormonske načine djelovanja i njegovu primjenu potrebno je sagledati u kontekstu „Konceptualnog okvira OECD-a za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih hemikalija—.

2. POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

Vitelogenin uobičajeno nastaje u jetri ženki oviparnih kičmenjaka kao odgovor na cirkulaciju endogenog estrogena. On je preteča proteina iz žumanceta i, kada nastane u jetri, krvotokom putuje do jajnika, gdje ga upijaju i modifikuju jaja koja se razvijaju. Vitelogenin je gotovo nemoguće otkriti u plazmi nedozrele ženke i mužjaka riba zato što nemaju dovoljnu količinu estrogena u krvotoku; međutiim, jetra je u stanju da sintetiše i luči vitelogenin kao odgovor na egzogenu stimulaciju estrogena.

Mjerenje vitelogenina služi za otkrivanje hemikalija koje imaju različite estrogenske moduse djelovanja. Otkrivanje estrogenskih hemikalija može se vršiti mjerenjem indukcije vitelogenina kod mužjaka riba i opsežno je dokumentovano u stručno recenzovanoj naučnoj

literaturi. Indukcija vitelogenina dokazana je i nakon postupka izlaganja aromatizujućim androgenima. Smanjenje nivoa estrogena u cirkulaciji kod ženki, na primjer inhibicijom aromataze koja pretvara endogeni androgen u prirodni estrogen 17β-estradiol, dovodi do smanjenja nivoa vitelogenina koji se koristi za otkrivanje hemikalija koje imaju inhibitorna svojstva na aromatazu. Utvrđen je i opsežno dokumentovan biološki značaj vitelogeninskog odgovora nakon inhibicije estrogena/aromataze. Međutiim, moguće je da na proizvodnju VTG kod ženki utiču i opšta toksičnost i nehormonski toksični modusi djelovanja, kao što je hepatotoksičnost. Za rutinsku upotrebu uspješno je razvijeno i standardizovano nekoliko metoda mjerenja. Radi se o metodama enzimskog imunoadsorpcionog testa (ELISA) koje koriste imunohemiju za kvantifikaciju vitelogenina nastalog u malim uzorcima krvi ili jetre uzetih od pojedinačnih riba. Za potrebe mjerenja vitelogenina (VTG), vršeno je uzorkovanje krvi velikoglavog klijena, krvi zebrice ili homogenata glave ili repa i jetre medake. U Dodatku 6 navode se preporučeni postupci za uzorkovanje vitelogenina za analizu. Pribori za mjerenje vitelogenina široko su dostupni; ti pribori moraju biti zasnovani na potvrđenoj metodi ELISA specifičnoj za pojedinu vrstu.

Sekundarne polne karakteristike kod mužjaka određenih vrsta riba vidljive su polja, moguće je izvršiti njihovu kvantifikaciju i zavisne su od nivoa endogenih androgena u krvotoku; to važi za velikoglavog klijena i medaku – ali ne i za zebricu koja ne posjeduje sekundarne polne karakteristike koje se mogu kvantifikovati. Ženke zadržavaju sposobnost da razviju muške polne karakteristike pri izlaganju androgenim hemikalijama u vodi. Na rapolaganju je nekoliko naučnih studija u kojima je dokumentovana ta vrsta odgovora kod velikoglavog klijena i medake. Povlačenje sekundarnih polnih karakteristika kod mužjaka potrebno je tumačiti uz oprez zbog niske statističke snage, a interpretacija bi trebalo da se bazira na stručnoj procjeni i težini dokaza. Postoje ograničenja za korišćenje ove vrste zebrice, usljed nemogućnosti da se kvantifikuju sekundarne polne karakteristike koje reaguju na hemikalije sa androgenim dejstvom.

Kod velikoglavog klijena, glavni pokazatelj egzogenog izlaganja androgenima je broj kvržica na ustima ženki u polno zrelom uzrastu. Kod medake, broj papilarnih procesa predstavlja glavni pokazatelj egzogene izloženosti androgenim hemikalijama ženki riba. Dodatak 5A i Dodatak 5B daju preporučene postupke koje je potrebno slijediti radi procjene polnih karakteristika kod velikoglavog klijena i medake.

U Dodatku 1 data su značenja pojedinih izraza upotrijebljenih u ovoj ispitnoj metodi.

3. PRINCIP ISPITIVANJA

Za vrijeme testa, mužjaci i ženke u reproduktivnom stanju izlažu se zajedno u ispitnim posudama. Zbog adultnog i reproduktivnog stanja u kojima se nalaze, može se jasno napraviti razlika među polovima i izvršiti analiza svih parametara praćenja vezana za pol, ali i osigurati njihova osjetljivost na egzogene hemikalije. Na kraju testa, pol se potvrđuje makroskopskim pregledom gonada nakon što se abdomen otvori makazama. U Dodatku 2 dat je opšti pregled relevantnih uslova biotesta. Test se uobičajeno počinje uzimanjem uzorka ribe iz populacije koja je u mrijestu; stare životinje se ne koriste. Smjernice o razvojnom stadijumu riba i o reproduktivnom statusu date su u odsjeku o izboru riba. Test se izvodi uz pomoć tri koncentracije izlaganja hemikaliji i kontrole sa vodom i, po potrebi, kontrole sa rastvaračem. Koriste se dvije posude ili ponavljanja po tretmanu (u svakoj posudi nalaze se 5 mužjaka i 5 ženki) kod medake i zebrice, dok se kod velikoglavog klijena koriste četiri suda ili ponavljanja po tretmanu (u svakoj posudi nalaze se 2 mužjaka i 4

ženke). Postupak se izvodi tako da se uzme u obzir teritorijalno ponašanje mužjaka velikoglavog klijena, a istovremeno zadrži snaga testa. Ribe se izlažu 21 dan, a uzorkovanje riba vrši se dvadeset prvog dana.

Dvadeset i prvog dana sve životinje se humano usmrćuju. Mjere se sekundarne polne karakteristike kod velikoglavog klijena i medake (Dodatak 5A i Dodatak 5B); uzimaju se uzorci krvi da bi se utvrdio nivo vitelogenina kod zebrice i velikoglavog klijena, pri čemu se za određivanje nivoa vitelogenina kod zebrice može uzeti i glava/rep (Dodatak 6); za analizu vitelogenina kod medake koristi se jetra (Dodatak 6).

4. KRITERIJUMI PRIHVATLJIVOSTI TESTA

Da bi se rezulati testa smatrali prihvatljivim, primjenjuju se sljedeći uslovi:

- Smrtnost u kontrolama sa vodom (ili rastvaračem) ne smije da bude veća od 10% na kraju perioda izlaganja;
- Koncentracija rastvorenog kiseonika mora iznositi najmanje 60% vrijednosti zasićenosti vazduha (ASV) tokom perioda izlaganja;
- Temperatura vode među posudama ne smije se razlikovati za više od ± 1,5 °C u bilo kojem trenutku za vrijeme perioda izlaganja, a mora se i održavati tako da od temperaturnih opsega koji su definisani za određenu ispitnu vrstu (Dodatak 2) varira za najviše 2°C;
- Moraju se obezbijediti dokazi kojima će se potvrditi da su koncentracije ispitivane hemikalije u rastvoru bile adekvatno održavane u opsegu od ± 20% srednjih izmjerenih vrijednosti.

5. OPIS METODE

5.1. Aparatura

Koristi se uobičajena laboratorijaska oprema, a naročito:

a) mjerači kiseonika i pH vrijednosti;
b) oprema za utvrĐivanje tvrdoće i alkaliteta vode;
c) odgovarajuća oprema za kontrolu temperature i, po mogućnosti, stalno praćenje;
d) akvarijumi napravljeni od hemijski inertnih materijala i dovoljnog kapaciteta s obzirom na preporučeni broj riba po jedinici zapremine u njemu (v. Dodatak 2);
e) upstrat za mriješćenje velikoglavog klijena i zebrice, potrebni podaci navode se u Dodatku 4;
f) vaga odgovarajuće tačnosti (tj. dozvoljeno odstepene od tačnosti do ± 0,5 mg).

5.2. Voda

Za ispitnu vodu može poslužiti svaka voda u kojoj se ispitnim vrstama omogućavaju odgovarajući dugoročni opstanak i rast. Za sve vrijeme trajanja testa voda mora imati stalan kvalitet. pH vrijednost vode treba da se kreće u opsegu od 6,5 do 8,5, ali za vrijeme datog testa trebalo bi da bude u rasponu od ± 0,5 pH jedinica. Uzorci za analizu treba da se uzimaju u intervalima da bi se osiguralo da voda za razblaživanje nema značajnijeg uticaja na rezultate ispitivanja (na primjer, kombinovanjem sa ispitivanom hemikalijom). Mjerenja teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), glavnih katjona i anjona (npr. Ca2+, Mg2+, Na+, K+, Cl- i SO4 2-), pesticida (npr. ukupnih organofosfornih i organohlornih pesticida),

ukupnog organskog ugljenika i suspendovanih čvrstih materija potrebno je vršiti, na primjer, svaka tri mjeseca ako se zna da je voda za razblaživanje relativno stabilnog kvaliteta. Ako se pokazalo da je kvalitet vode stabilan više od najmanje godinu dana, određivanje se može vršiti rjeĐe, a intervali mjerenja mogu se produžiti (npr. svakih šest mjeseci). U Dodatku 3 navode se neka od hemijskih svojstava prihvatljive vode za razblaživanje.

5.3. Ispitni rastvori

Ispitni rastvori izabranih koncentracija pripremaju se razblaživanjem osnovnog rastvora. Osnovni rastvor bi, po mogućnosti, trebalo da se pripremi prostim miješanjem ili mućkanjem ispitivane hemikalije u vodi za razblaživanje mehaničkim putem (npr. priborom za miješanje ili ultrazvukom). Za postizanje odgovarajuće koncentracije rastvora mogu se koristiti kolone za zasićivanje (kolone za rastvaranje). Ne preporučuje se upotreba vehikuluma. Ako je ipak neophodno upotrijebiti rastvarač, paralelno treba da se primijeni i kontrola sa rastvaračem u istoj koncentraciji koja je korišćena u tretmanima hemikalijom. U slučaju složenih ispitivanih hemikalija, rastvarač može biti najbolje rješenje u tehničkom smislu; potrebno je uputiti se na Smjernicu OECD-a o ispitivanju toksičnosti složenih supstanci i smješa za vodu. Izbor rastvarača vrši se na osnovu hemijskih svojstava hemikalije. Smjernicom OECD-a preporučuje se najviše 100 µl/l i to se mora poštovati. Međutiim, u nedavnoj reviziji, istaknute su nove nedoumice u vezi sa upotrebom rastvarača za ispitivanje hormonske aktivnosti. Zato se preporučuje da se koncentracija rastvarača, po potrebi, svede na najmanju moguću mjeru kada god je to tehnički izvodljivo (u zavisnosti od fizičkih i hemijskih svojstava ispitivane hemikalije).

Za potrebe ispitivanja koristi se protočni sistem. Takav sistem kontinuirano raspršuje i razblažuje osnovni rastvor ispitivane hemikalije (npr. pumpa za doziranje, proporcionalni razblaživač, saturator) kako bi se obezbijedio dotok niza koncentracija u ispitne komore. Trebalo bi da se, za vrijeme testa, brzina protoka osnovnih rastvora i vode za razblaživanje provjerava u intervalima, po mogućnosti na dnevnoj bazi, a dozvoljava se odstepene od najviše 10%. Potrebno je preduzeti mjere opreza kako bi se izbjegla upotreba plastičnih cijevi lošeg kvaliteta ili drugih materijala koji u sebi mogu sadržati biološki aktivne hemikalije. Prilikom izbora materijala koji će se koristiti u protočnom sistemu, potrebno je uzeti u obzir moguću adsorpciju ispitivane hemikalije na tom materijalu.

5.4. Držanje riba

Ribe koje učestvuju u testu potrebno je birati meĐu laboratorijaskom populacijom, po mogućnosti iz istog jata koje se prethodno najmanje dvije sedmice aklimatizovalo u uslovima kvaliteta vode i osvijetljenosti koji su slični sa onima koji će važiti na samom ispitivanju.

Važno je da količina i masa riba po jedinici zapremine odgovaraju ispitnoj vrsti koja se koristi (Dodatak 2).

Nakon perioda prilagoĐavanja u trajanju od 48 sati, evidentira se smrtnost, pri čemu se primjenjuju sljedeći kriterijumi:

- za smrtnost veću od 10% populacije u periodu od sedam dana: odbaciti cijelu seriju;
- za smrtnost između 5% i 10% populacije: aklimatizovanje u trajanju od još sedam dana;
- za smrtnost veću od 5% za vrijeme drugog perioda od sedam dana, odbaciti cijelu seriju;

- za smrtnost manju od 5% populacije u periodu od sedam dana: prihvatiti seriju. Ribe se ne smiju liječiti za vrijeme aklimatizovanja, u periodu prije izlaganja, kao ni tokom samog perioda izlaganja.

5.5. Period prije izlaganja i izbor ribe

Preporučuje se da period prije izlaganja traje jednu sedmicu, kada se životinje stavljaju u posude koje su slične posudama koje se upotrebljavaju na samom testu. Ribe je potrebno hraniti ad libitum i za vrijeme perioda držanja i u fazi izlaganja. Faza izlaganja počinje se polno dimorfnom odraslom jedinkom ribe iz laboratorijaske grupe reproduktivno zrelih životinja (npr. sa jasno vidljivim sekundarnim polnim karakteristikama u slučaju velikoglavog klijena i medake) koja se aktivno mrijesti. Za bolje razumijevanje (pri čemu se ovakva smjernica ne smije posmatrati izolovano od stvarnog reproduktivnog stanja date serije riba), približna starost velikoglavog klijena mora iznositi 20 (± 2) sedmice, pod pretpostavkom da su tokom životnog vijeka uzgajani na temperaturi od 25 ± 2 °C. Japanska medaka treba da je približne starosti od 16 (± 2) sedmica, ako se pretpostavi da je za životnog vijeka uzgajana na temperaturi od 25 ± 2 °C. Zebrica bi trebalo da je stara približno 16 (± 2) sedmica, uz pretpostavku da je za životnog vijeka uzgajana na temperaturi od 26 ± 2 °C.

6. PLAN TESTA

Primjenjuju se tri koncentracije ispitivane hemikalije, jedna kontrola (sa vodom) i, po potrebi, jedna kontrola sa rastvaračem. Može se izvršiti analiza podataka kako bi se utvrdile statistički značajne razlike između odgovora dobijenog za vrijeme tretmana i za vrijeme kontrole. Tim analizama dobiće se odgovor na pitanje da li je potrebno vršiti dalje dugoročno ispitivanje štetnih efekata date hemikalije (na preživljavanje, razvoj, rast i reprodukciju), umjesto za potrebe procjene rizika.

Kod zebrice i medake, dvadeset prvog dana eksperimenta mužjaci i ženke tretirane svim nivoima koncentracija (5 mužjaka i 5 ženki u svakom od dva ponavljanja) i jedinke iz kontrola uzorkuju se zbog mjerenja nivoa vitelogenina i sekundardnih polnih karakteristika, tamo gdje je to primjenjivo. Kod velikoglavog klijena, dvadeset prvog dana izlaganja, uzorkuju se mužjaci i ženke (2 mužjaka i 4 ženke u svakom od četiri ponavljanja) i iz kontrola radi mjerenja nivoa vitelogenina i sekundarnih polnih karakteristika.

6.1. Izbor ispitnih koncentracija

Za potrebe izvoĐenja ovog testa, najvišu ispitnu koncentraciju potrebno je utvrditi pomoću maksimalne tolerisane koncentracije (MTK), koja se određuje tabelom ili na osnovu drugih podataka o toksičnosti, ili kao 10 mg/l, ili na osnovu maksimalne količine rastvorljive u vodi, odnosno najnižeg od njih. MTK se definiše kao najviša ispitna koncentracija hemikalije koja proizvodi smrtnost nižu od 10%. Izborom tog pristupa polazi se od pretpostavke da postoje empirijski podaci o akutnoj toksičnosti ili drugi podaci o toksičnosti iz kojih je moguće utvrditi MTK. Procjena MTK može se pokazati nepreciznom i obično zahtijeva stručno mišljenje.

Potrebne su tri ispitne koncentracije sa stalnim faktorom razmaka između njih koji nije veći od 10 i kontrola sa vodom za razblaživanje (ako je potrebno, i kontrola sa rastvaračem). Preporučuje se da se faktor razmaka kreće između 3,2 i 10.

7. POSTUPAK

7.1. Izbor i vaganje riba za ispitivanje

Važno je da se na početku ispitivanja smanje razlike u težini riba na najmanji mogući nivo. U Aneksu 2 navedeni su odgovarajući rasponi veličina za različite vrste preporučene za ovo ispitivanje. Kada je u pitanju cijela serija riba koja se koristi u ovom ispitivanju, potrebno je da se raspon težine ženki i mužjaka na početku ispitivanja održi, ako je moguće u rasponu od ± 20% aritmetičke srednje težine za ribe istog pola. Preporučuje se vaganje pod-uzorka ribljeg fonda prije ispitivanja u cilju određivanja srednje težine.

7.2. Uslovi izlaganja

7.2.1. Trajanje

Ispitivanje, nakon perioda prije izlaganja, traje 21 dan. Preporučeni period prije izlaganja je nedjelju dana.

7.2.2. Ishrana

Ribe treba hraniti ad libitum odgovarajućom hranom (Aneks 2) dovoljno često da bi se održalo fizičko stanje. Potrebno je posvetiti pažnju kako bi se izbjegao razvoj mikroba i zamućenost vode. Kao opšta smjernica, dnevna količina hrane može se podijeliti na dvije ili tri jednake porcije u cilju učestalijeg hranjenja uz razmak od najmanje tri sata između svakog hranjenja. Jedna veća porcija prihvatljiva je posebno tokom vikenda. Ribe ne treba hraniti 12 sati prije uzorkovanja/seciranja.

Hranu za ribe treba analizirati u pogledu prisustva kontaminanata kao što su organohlorni pesticidi, policiklični aromatski ugljovodonici (PAH), polihlorovani bifenili (PCBs). Potrebno je izbjegavati hranu sa povišenim nivoom fitoestrogena koji bi uticali na reakciju u okviru ispitivanja na poznati agonist estogena (npr. 17-beta estradiol).

Nepojedenu hranu i fekalne materije iz ispitnih posuda potrebno je uklanjati najmanje dva puta nedjeljno, npr. pažljivim čišćenjem dna svakog akvarijuma pomoću sifona.

7.2.3. Svjetlost i temperatura

Izlaganje svjetlosti i temperatura vode treba da budu odgovarajući u odnosu na vrstu koja se ispituje (Aneks 2).

7.3. Učestalost analitičkih utvrĐivanja i mjerenja

Prije početka perioda izlaganja, potrebno je osigurati pravilno funkcionisanje sistema dovoda hemikalije. Potrebno je utvrditi sve potrebne analitičke metode, uključujući dovoljno informacija o hemijskoj stabilnosti u ispitnom sistemu. Tokom ispitivanja, koncentracije ispitne hemikalije utvrĐuju se u redovnim intervalima kako slijedi: stope protoka razrjeĐivača i toksičnih osnovnih rastvora treba da se provjeravaju po mogućnosti svakodnevno, najmanje dva puta nedjeljno i ne treba da variraju više od 10% tokom trajanja ispitivanja. Preporučuje se da se stvarne koncentracije ispitivane hemikalije mjere u svim posudama na početku ispitivanja, a nakon toga svake nedjelje.

Preporučuje se da se rezultati zasnivaju na izmjerenim koncentracijama. Međutiim, ukoliko je koncentracija ispitivane hemikalije u rastvoru uspješno održana na ± 20% nominalne koncentracije tokom ispitivanja, rezultati se mogu zasnivati na nominalnim ili izmjerenim vrijednostima.

Možda će se javiti potreba za filtriranjem uzoraka (npr. pomoću pora veličine 0,45 µm). Kada je potrebno, preporučeni postupak je centrifugiranje. Međutiim, prihvatljivo je i filtriranje ukoliko se ispitivani materijal ne adsorbuje na filtere.

Tokom ispitivanja, potrebno je mjeriti rastvoreni kiseonik, temperaturu i pH vrijednost u svim ispitnim posudama najmanje jednom nedjeljno. Ukupna tvrdoća i alkalnost treba da se mjeri u kontrolnim grupama i jednoj posudi sa najvećom koncentracijom najmanje jednom nedjeljno. Temperaturu je poželjno mjeriti u kontinuitetu u najmanje jednoj ispitnoj posudi.

7.4. Zapažanja

Određen broj opštih (npr. preživljavanje) i osnovnih bioloških reakcija (npr. nivoi vitelogenina) procjenjuju se tokom ispitivanja ili na kraju ispitivanja. Mjerenje i procjena tih krajnjih parametara i njihova korist opisani su u daljem tekstu.

7.4.1. Preživljavanje

Potrebno je svakodnevno pregledati ribe tokom perioda ispitivanja, evidentirati svaku smrtnost, a uginule ribe ukloniti što je prije moguće. Uginule ribe ne treba zamijeniti ribama iz kontrolnih ili ispitnih posuda. Potrebno je utvrditi pol ribe koja je uginula kroz mikropskopsku evaluaciju gonada.

7.4.2. Ponašanje i izgled

Potrebno je evidentirati svako neuobičajeno ponašanje (u odnosu na kontrolne grupe); ovo može da podrazumijeva znake opšte toksičnosti uključujući hiperventilaciju, nekoordinirano plivanje, gubitak ravnoteže i netipično mirovanje ili hranjenje. Potrebno je evidentirati dodatne eksterne abnormalnosti (kao što je krvarenje, diskoloracija). Takvi znaci toksičnosti moraju se pažljivo razmotriti tokom tumačenja podataka jer oni mogu ukazati na koncentracije za koje biomarkeri endokrine aktivnosti nisu pouzdani. Takva zapažanja koja se odnose na ponašanje takođe mogu predstavljati korisne kvalitativne informacije za određivanje potencijalnih budućih zahtjeva za ispitivanje riba. Na primjer, teritorijalna agresivnost kod normalnih mužjaka ili maskulinizovanih ženki uočena je kod velikoglavog klijena kod izloženosti androgenima; kod zebrica, nakon svitanja karakteristično parenje i mrijest su smanjeni ili narušeni nakon izloženosti estrogenima ili antiandrogenima.

Imajući u vidu da se neki aspekti izgleda (najprije boja) mogu brzo promijeniti nakon hvatanja, važno je obaviti zapažanja prije uklanjanja životinja iz ispitnog sistema.

Dosadadašnje iskustvo sa velikoglavim klijenom ukazuje na to da određene endokrino aktivne hemikalije mogu na početku uzrokovati promjene sljedećih poljašnjih karakteristika: boje tijela (svijetla ili tamna), šare na životinji (prisustvo vertikalnih pruga) i oblika tijela (glava i grudni predio). Prema tome, potrebno je obaviti zapažanja fizičkog izgleda riba tokom i nakon ispitivanja.

7.4.3. Usmrćivanje riba na human način

Na 21. dan, odnosno na kraju izlaganja, ribe je potrebno usmrtiti odgovarajućim količinama trikaina (Tricaine metan sulfonat, Metacain, MS-222 (CAS 886-86-2)), 100-500 mg/l puferovanog sa 300 mg/l $NaHCO_3$ (natrijum bikarbonat, CAS 144-55-8) u cilju smanjenja iritacije sluzokože; zatim se uzimaju uzorci krvi ili tkiva za utvrđivanje vetelogenina, kako je objašnjeno u odjeljku o vitelogeninu.

7.4.4. Zapažanja o sekundardnim polnim karakteristikama

Neke endokrino aktivne hemikalije mogu izazvati promjene kod posebnih sekundardnih polnih karakteristika (broj izraslina kod polno zrelih mužjaka velikoglavog klijena, papilarni procesi kod mužjaka medake). Naročito, hemikalije sa određenim načinom djelovanja mogu

uzrokovati neuobičajenu pojavu sekundarnih polnih karakteristika kod životinja suprotnog pola; na primjer, agonisti receptora za androgene, kao što su trenbolon, metiltestosteron i dihidrotestosteron mogu kod ženki velikoglavog klijena uzrokovati razvoj izraženih izraslina ili papilarnih procesa kod ženki medake (11, 20, 21).TakoĐe je poznato da agonisti receptora estrogena mogu smanjiti broj izraslina i veličinu jastučića na leĐnom potiljačnom dijelu odraslih mužjaka (25, 26). Tako velika morfološka zapažanja mogu predstavljati korisne kvalitativne i kvantitativne informacije za određivanje potencijalnih budućih zahtjeva za ispitivanje riba. Broj i veličina izraslina kod velikoglavog klijena i papilarnih procesa kod medake mogu se kvantifikovati direktno ili praktičnije kod očuvanih uzoraka. Preporučeni postupci za procjenu sekundarnih polnih karakteristika kod velikoglavog klijena i medake navedeni su u Aneksu 5A, odnosno Aneksu 5B.

7.4.5. Vitelogenin (VTG)

Krv se uzima iz repne arterije/vene uz pomoć heparinizovane mikrohematokritske kapilarne cjevčice, ili punkcijom srca uz pomoć šprica. U zavisnosti od veličine ribe, volumen krvi koji se uzima kreće se od 5 do 60 µl po jednom velikoglavom klijenu i 5-15 µl po pojedinačnoj zebrici. Plazma se odvaja od krvi centrifugiranjem i čuva sa inhibitorima proteaze na – 80 °C, dok se ne izvrši analiza na vitelogenin. Po mogućnosti, kod medake koristi se jetra, a kod zebrice homogenati sa glave/repa mogu se koristiti za utvrĐivanje vitelogenina (Aneks 6). Mjerenje VTG treba da se zasniva na potvrĐenoj homolognoj metodi ELISA uz korišćenje homolognog standarda VTG i homolognih antitijela. Preporučuje se korišćenje metode uz pomoć koje je moguće odrediti nivoe VTG koji su niski i iznose svega nekoliko ng/ml plazme (ili ng/mg tkiva), što predstavlja osnovni nivo kod izloženih mužjaka riba.

Kontrola kvaliteta analize vitelogenina vrši se kroz korišćenje standarda, slijepih proba i najmanje dvostrukih analiza. Za svaki metod ELISA, potrebno je ssprovesti ispitivanje učinka matrice (učinak razreĐivanja uzorka) u cilju utvrĐivanja minimalnog faktora razreĐivanja uzorka. Svaka pločica ELISA koja se koristi za VTG ispitivanja treba da uključi sljedeće uzorke za kontrolu kvaliteta: najmanje 6 kalibracionih standarda kojim se obuhvata opseg očekivanih koncentracija vitelogenina i najmanje jedna neodređena obavezujuća slijepa proba (analizirana u dva primjerka). Apsorpcija ovih slijepih proba treba da bude manja od 5% maksimalne apsorpcije standardne kalibracije. Najmanje dva jednaka dijela (duplikati bunarčića) svakog razrijeđenog uzorka se analiziraju. Duplikate bunarčića koji se razlikuju za više od 20% potrebno je ponovo analizirati.

Koeficijent korelacije (R2) za kalibracione krive treba da bude veći od 0,99. Međutiim, visoka korelacija nije dovoljna kako bi se osiguralo odgovarajuće predviĐanje koncentracije u svim rasponima. Pored dovoljno visoke korelacije za kalibracionu krivu, koncentracija svakog standarda, kako je izračunato iz kalibracione krive, treba da se kreće u opsegu od 70% do 120% nominalne koncentracije. Ukoliko se nominalne koncentracije udalje od kalibracione linije regresije (npr. kod nižih koncentracija) možda će biti potrebno da se kalibraciona kriva podijeli na niske i visoke opsege ili da se koristi nelinearni model kako bi se na odgovarajući način prilagodili podaci o apsorpciji. Ukoliko se kriva podijeli, oba segmenta linije treba da imaju $R2 > 0,99$.

Granica otkrivanja (LOD- limit of detection) definiše se kao koncentracija najnižeg analitičkog standarda, a granica kvantitacije (LOQ- limit of quantitation) definiše se kao koncentracija najnižeg analitičkog standarda pomnožena najnižim faktorom razreĐivanja.

Svakog dana kada se vrše ispitivanja vitelogenina, analizira se uzorak sa pojačanim nivoom vitelogenina kroz korišćenje referentnog standarda između testova (Aneks 7). Odnos

očekivane koncentracije i izmjerene koncentracije evidentiraju se zajedno sa rezultatima iz svakog niza testova sprovedenih tog dana.

8. PODACI I IZVJEŠTAVANJE

8.1. Procjena reakcija biomarkera kroz analizu varijanse (ANOVA)

Kako bi se identifikovale potencijalne endokrine aktivnosti hemikalije, reakcije tretiranih i kontrolnih grupa upoređuju se uz pomoć analize varijanse (ANOVA). Kada se koristi kontrolna grupa za razrjeđivač, treba izvršiti odgovarajući statistički test između kontrolnih grupa sa vodom za razrjeđivanje i kontrolnih grupa sa razrjeđivačem za svaki parametar praćenja. Smjernice o načinu obrade podataka za kontrolne grupe sa vodom za razrjeđivanje i razrjeđivačem u naknadnim statističkim analizama mogu se naći u dokumentu OECD, 2006c (27). Sve podatke o biološkim reakcijama treba posebno analizirati i evidentirati u zavisnosti od pola. Ukoliko se ne ispune potrebne pretpostavke za parametarske metode – nenormalna distribucija (npr. Šapiro-Vilkov (Shapiro-Wilk's) test) ili heterogene varijanse (Bartletov (Bartlett's) test ili Levenov (Levene's) test), potrebno je razmotriti pretvaranje podataka u homogenizovane varijanse prije sprovođenja ANOVA ili sprovođenje ponderisane ANOVA. Danetov (Dunnett's) test (parametarski) o višestrukim upoređivanjima parova ili Men-Vitnijev (Mann-Whitney) test sa Bonferoni (Bonferroni) prilagođavanjima mogu se koristiti za nemonotoničnu reakciju na dozu. Mogu se koristiti i drugi testovi (npr. Jonker-Terpstra (Jonckheere-Terpstra) test ili Vilijamsov (Williams) test) ako je reakcija na dozu približno monotonična. Statistički dijagram u Aneksu 8 prikazan je kako bi se pomoglo prilikom izbora najpogodnijeg statističkog testa za upotrebu. Dodatne informacije takođe se mogu dobiti iz dokumenta OECD o postojećim pristupima statističkoj analizi podataka o ekotoksičnosti (27).

8.2. Izvještavanje o rezultatima ispitivanja

Podaci o studiji treba da uključe sljedeće:

Ustanova u kojoj se obavlja ispitivanje:

- Odgovorna lica i njihove odgovornosti u okviru studije
- Svaka labaratorija treba da ima dokazanu stručnost kod korišćenja niza reprezentativnih hemikalija *Ispitna hemikalija:*
- Karakterizacija ispitne hemikalije
- Fizička svojstva i relevantne fizičko-hemijske karakteristike
- Metoda i učestalost pripreme ispitivanih koncentracija
- Informacije o stabilnosti i biorazgradivosti *Rastvor:*
- Karakteristike rastvora (svojstvo, korišćena koncentracija)
- Obrazloženje izbora rastvora (ukoliko se ne radi o vodi)

Ispitne životinje:

- Vrsta i podvrsta
    - Dobavljač i poseban objekat dobavljača
- Starost ribe na početku ispitivanja i reproduktivni status/status mriješćenja
- Detalji o postupku aklimatizacije životinje
-

Težina ribe na početku izlaganja (iz pod-uzorka ribljeg fonda) *Ispitni uslovi:*

- Ispitni postupak koji se koristi (vrsta ispitivanja, broj i masa riba u odnosu na zapreminu akvarijuma, itd.)
- Način pripreme osnovnog rastvora i stopa protoka;
- Nominalne ispitne koncentracije, nedjeljno izmjerene koncentracije ispitnih rastvora i korišćena analitička metoda, način mjerenja vrijednosti i standardna odstepena u ispitnim posudama kao i dokazi da se mjerenja odnose na koncentracije ispitne hemikalije u stvarnom rastvoru;
- Svojstva vode za razreĐivanje (uključujući pH vrijednost, tvrdoću, alkalnost, temperaturu, koncentraciju rastvorenog kiseonika, nivoe preostalog hlora, ukupan organski ugljenik, suspendovane čvrste materije i druga izvršena mjerenja);
- Kvalitet vode u ispitnim posudama: pH vrijednost, tvrdoća. temperatura i rastvorena koncentracija kiseonika;
- Detaljne informacije o ishrani (npr. vrsta hrane, izvor, data količina i učestalost i analize relevantnih kontaminanata ukoliko postoje (npr. PCBs, PAHs i organohlorni pesticidi) *Rezultati:*
- Dokaz da su kontolne grupe ispunile kriterijume prihvatljivosti ispitivanja;
- Podaci o smrtnosti koja se javila u bilo kojoj ispitnoj koncentaciji i kontrolnim grupama;
- Korišćene statističko-analitičke metode, obrada podataka i obrazloženje korišćenih metoda;
- Podaci o biološkim zapažanjima mahromorfologije, uključujući sekunardne polne karakteristike i vitelogenin;
- Rezultati o analizama podataka, po mogućnosti u tabelarnom i grafičkom obliku;
- Pojava svih neuobičajenih reakcija riba i svi fizički efekti koje su uzrokovale ispitivane hemikalije.

9. SMJERNICE ZA TUMAČENJE I PRIHVATANJE REZULTATA ISPITIVANJA

Ovaj dio sadrži nekoliko razmatranja koja je potrebno uzeti u obzir prilikom tumačenja rezultata ispitivanja za različite izmjerene parametre praćenja. Rezultati treba da se tumače oprezno kada se čini da ispitivana hemikalija uzrokuje očiglednu toksičnost ili utiče na opšte stanje ispitne životinje.

Prilikom određivanja opsega ispitnih koncentracija, potrebno je voditi računa da se ne premaši maksimalna tolerisana koncentracija kako bi se omogućilo smisleno tumačenje podataka. Važno je imati najmanje jednu tretiranu grupu koja ne pokazuje znake toksičnosti. Znaci bolesti i znaci toksičnih efekata treba detaljno da se ocijene i evidentiraju. Na primjer, moguće je da na proizvodnju VTG kod ženki takoĐe mogu da utiču opšta toksičnost i neendokrini toksični načini djelovanja, npr. hepatotoksičnost. Međutiim, veća sigurnost kod tumačenja efekata može se postići ako postoje druge grupe tretirane različitim koncentracijama koje nisu narušene sistemskom toksičnošću.

Postoji nekoliko aspekata koje je potrebno razmotriti za prihvatanje rezultata ispitivanja. Kao smjernica, nivoi VTG kod kontrolnih grupa mužjaka i ženki treba da budu različiti i odvojeni za približno tri reda veličine kod velikoglavog klijena i zebrice, i za jedan red veličine kod medake. Primjeri opsega vrijednosti kod kontrolnih i tretiranih grupa na rapolaganju su u izvještajima o validaciji. Visoke vrijednosti VTG kod kontrolnih mužjaka mogu da naruše

reakciju na ispitivanje i njegovu sposobnost otkrivanja slabih agonista estrogena. Niske vrijednosti VTG kod ženki iz kontrolnih grupa mogu da utiču na reakciju na ispitivanje i njegovu sposobnost otkrivanja inhibitora aromataze i antagonista estrogena. Studije validnosti koriste se za izradu te smjernice.

Ukoliko labaratorija ranije nije sprovodila ispitivanje ili su izvršene značajne izmjene (npr. promjena riblje podvrste ili dobavljača), savjetuje se sprovođenje studije tehničke osposobljenosti. Preporuka je da se koriste hemikalije koje obuhvataju određen opseg načina djelovanja ili učinaka na brojne ispitne parametre praćenja. U praksi, svaka labaratorija se ohrabruje da razvije sopstvene kontrolne podatke za mužjake i ženke i da vrše pozitivne kontrole hemikalije za estrogene aktivnosti (npr. 17β-estradiola na 100 ng/l ili poznatog slabijeg agonista) što će za rezultat imati povećanje VTG kod mužjaka riba, pozitivne kontrolne hemikalije za inhibiciju aromataze (npr. fadrozol ili prohloraz na 300 µg/l) što će za rezultat imati smanjenje VTG kod ženki riba i pozitivne kontrolne hemikalije za androgeno djelovanje (npr. 17β-trenbolon kod 5 µg/l) što će za rezultat imati indukciju sekundarnih polnih karakteristika kod ženki velikoglavog klijena i medake. Svi ovi podaci mogu se uporediti sa rapoloživim podacima iz studija validnosti kako bi se obezbijedila labaratorijska osposobljenost.

Uopšteno gledano, mjerenja vitelogenina treba da se smatraju pozitivnim ukoliko postoji statistički značajno povećanje VTG kod mužjaka ($p < 0,05$) ili statistički značajno smanjenje kod ženki ($p < 0,05$) barem kod najveće ispitivane doze u poređenju sa kontrolnom grupom i u odsustvu znakova opšte toksičnosti. Pozitivan rezultat dodatno se potkrijepljuje demonstracijom biološki vjerovatnog odnosa između krive doze i krive reakcije. Kao što je ranije pomenuto, smanjenje vitelogenina ne mora u cjelosti biti endokrinog porijekla.
Međutiim, pozitivan rezultat uopšteno treba tumačiti kao dokaz endokrine aktivnosti in vivo i obično je potrebno pokrenuti aktivnosti za dalje pojašnjenje.

Aneks 1

Skraćenice i značenje izraza

Hemikalija: materija ili smješa **CV:** koeficijent varijacije.

ELISA: imunoenzimski test.

Stopa opterećenja: mokra masa ribe u odnosu na količinu vode.

Gustina: broj riba u odnosu na količinu vode.

VTG (Vitellogenin): fosfolipoglikoproteinski prekursor proteina žumanceta koji se obično javlja kod seksualno aktivnih ženki svih vrsta koje polažu jaja. **HPG osa**: osa hipotalamus-hipofiza-gonade

MTK: maksimalna tolerisana koncentracija koja iznosi približno 10 % LC50.

Ispitna hemikalija: Svaka materija ili smješa koja se ispituje putem ove ispitne metode.

Aneks 2

Eksperimentalni uslovi za endokrino ispitivanje velikog uzorka riba

1. Preporučene vrste	**Velikoglavi klijen** (Pimephales promelas)	**Medaka** (Oryzias latipes)	Zebrica (Danio rerio)
2. Vrsta ispitivanja	Protok	Protok	Protok
3. Temperatura vode	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C
4. Kvalitet osvjetljenja	Fluorescentne sijalice (širokog spektra)	Fluorescentne sijalice (širokog spektra)	Fluorescentne sijalice (širokog spektra)
5. Intenzitet svjetlosti	10 – 20 µE/m2/s, 540 – 1 000 luksa ili 50 – 100 ft-c (nivoi u laboratorijaskim uslovima)	10 – 20 µE/m2/s, 540 – 1 000 luksa ili 50 – 100 ft-c (nivoi u laboratorijaskim uslovima)	10 – 20 µE/m2/s, 540 – 1 000 luksa ili 50 – 100 ft-c (nivoi u laboratorijaskim uslovima)
6. Fotoperiod (prelazi iz perioda svitanja u period sumraka su mogući, ali se ne smatraju neophodnim)	16 sati svjetla, 8 sati tame	12 – 16 sati svjetla, 12 – 8 sati tame	12 – 16 sati svjetla, 12 – 8 sati tame
7. Stopa opterećenja	< 5 g po l	< 5 g po l	< 5 g po l
8. Veličina ispitne komore	Najmanje 10 l	Najmanje 2 l	Najmanje 5 l
9. Količina ispitnog rastvora	Najmanje 8 l	Najmanje 1,5 l	Najmanje 4 l
10. Razmjene količine ispitnih rastvora	Najmanje 6 puta dnevno	Najmanje 5 puta dnevno	Najmanje 5 puta dnevno
11. Starost ispitnih organizama	v. stav 20	v. stav 20	v. stav 20
12. Približna mokra masa odrasle ribe	Ženke: 1,5 ± 20 % Mužjaci: 2,5 ± 20 %	Ženke: 0,35 ± 20 % Mužjaci: 0,35 ± 20 %	Ženke: 0,65 ± 20 % Mužjaci: 0,4 ± 20 %
13. Broj riba po ispitnoj	6 (2 mužjaka i 4 ženke)	10 (5 mužjaka i 5 ženki)	10 (5 mužjaka i 5 ženki)
posudi			
14. Br. tretiranih grupa	= 3 (uz odgovarajuće kontrolne grupe)	= 3 (uz odgovarajuće kontrolne grupe)	= 3 (uz odgovarajuće kontrolne grupe)
15. Broj posuda po tretiranoj grupi	Najmanje 4	Najmanje 2	Najmanje 2
16. Broj riba po ispitnoj koncentraciji	16 odraslih ženki i 8 mužjaka (4 ženke i 2 mužjaka u svakoj identičnoj posudi)	10 odraslih ženki i 10 mužjaka (5 ženki i 5 mužjaka u svakoj identičnoj posudi)	10 odraslih ženki i 10 mužjaka (5 ženki i 5 mužjaka u svakoj identičnoj posudi)
17. Raspored hranjenja	Žive ili smrznute odrasle jedinke ili larve Artemija račića dva ili tri puta dnevno (ad libitum), hranom koja je dostupna na tržištu ili kombinacija	Larve Artemija račića dva ili tri puta dnevno (ad libitum), hranom koja je dostupna na tržištu ili kombinacija ova dva načina.	Larve Artemija račića dva ili tri puta dnevno (ad libitum), hranom koja je dostupna na tržištu ili kombinacija ova dva načina.

	ova dva načina.		
18. Aeracija	Ne obavlja se osim ukoliko se koncentracija ne spusti ispod 60% zasićenosti kiseonikom	Ne obavlja se osim ukoliko se koncentracija ne spusti ispod 60% zasićenosti kiseonikom	Ne obavlja se osim ukoliko se koncentracija ne spusti ispod 60% zasićenosti kiseonikom
19. Voda za razreĐivanje	Čista površinska, izvorska ili obraĐena voda ili voda iz vodovoda bez hlora	Čista površinska, izvorska ili obraĐena voda ili voda iz vodovoda bez hlora	Čista površinska, izvorska ili obrađena voda ili voda iz vodovoda bez hlora
20. Period prije izlaganja	Preporučuje se sedam dana	Preporučuje se sedam dana	Preporučuje se sedam dana
21. Trajanje izlaganja hemikaliji	21 dan	21 dan	21 dan
22. Biološki parametar praćenja	preživljavanje, ponašanje, polne karakteristike 2y, VTG	preživljavanje, ponašanje, polne karakteristike 2y, VTG	preživljavanje, ponašanje, polne karakteristike 2y, VTG
23. Prihvatljivost ispitivanja	Rastvoreni kiseonik > 60 % zasićenosti; srednja temperatura od 25 ± 2 °C; preživljavanje riba u kontrolnim grupama od 90 %; mjerene ispitne koncentracije u okviru 20% srednjih izmjerenih vrijednosti po nivou tretmana.	Rastvoreni kiseonik > 60 % zasićenosti; srednja temperatura od 24 ± 2 °C; preživljavanje riba u kontrolnim grupama od 90 %; mjerene ispitne koncentracije u okviru 20% srednjih izmjerenih vrijednosti po nivou tretmana.	Rastvoreni kiseonik > 60 % zasićenosti; srednja temperatura od 26 ± 2 °C; preživljavanje riba u kontrolnim grupama od 90 %; mjerene ispitne koncentracije u okviru 20% srednjih izmjerenih vrijednosti po nivou tretmana.

Aneks 3

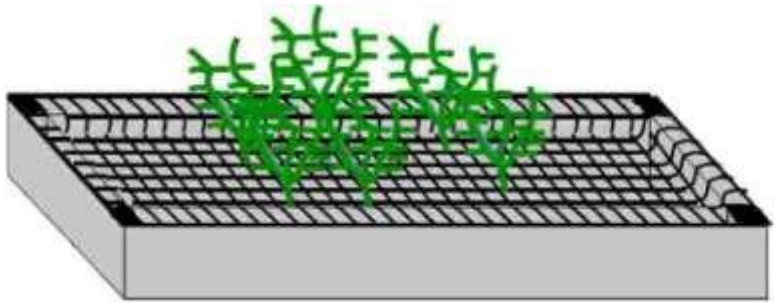
Određene hemijske karakteristike prihvatljive vode za razrjeđivanje

Komponenta	Koncentracije
Fine čestice	< 20 mg/l
Ukupan organski ugljenik	< 2 mg/l
Nejonizovani amonijak	< 1 µg/l
Rezidualni hlor	< 10 µg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
Ukupni organohlorni pesticidi sa polihlorovanim bifenilima	< 50 ng/l
Ukupan organski hlor	< 25 ng/l

Aneks 4A

Supstrat za mriješćenje zebrice

Posuda za mriješćenje: potpuno staklena posuda, na primjer dimenzija 22×15×5,5 cm (d×š×v), prekrivena pokretnom žičanom rešetkom od nerĐajučeg čelika (mrežica širine 2mm). Rešetka treba da pokriva otvor posude ispod ivice.



Na rešetki je potrebno smještiti supstrat za mriješćenje. On treba da omogući ribi mjesto u koje bi uplivala. Na primjer, pogodne su vještačke akvarijumske biljke napravljene od zelene plastike (napomena: potrebno je uzeti u obzir moguću adsorpciju ispitne hemikalije na plastiku). Plastični materijal treba da se ispere u dovoljnoj količini tople vode dovoljno dugo kako bi se osiguralo da neće doći do ispuštanja bilo kakvih hemikalija u ispitnu vodu. Prilikom korišćenja staklenog materijala potrebno je osigurati da se riba neće povrijedi niti skučiti tokom svog energičnog kretanja.

Udaljenost između posude i stakla treba da bude najmanje 3 cm kako bi se osiguralo da se mrijest ne obavlja van posude. Jaja izmriješćena u posudi propadaju kroz rešetku i mogu se uzorkovati 45-60 minuta nakon početka osvjetljenja. Prozirna jaja se ne lijepe i mogu se lako prebrojati uz pomoć transverzalne svjetlosti. Kada se koristi pet ženki po posudi, broj jaja od 20 dnevno može se smatrati malim brojem, do 100 jaja može se smatrati srednjim, a više od 100 visokim brojem. Posuda za mriješćenje treba da se ukloni, jaja sakupe i posuda za mriješćenje vrati u ispitnu posudu što kasnije u večernjim časovima ili veoma rano ujutru. Vrijeme do vraćanja posude ne treba da bude duže od jednog sata jer u suprotnom supstrat za mriješćenje može da prouzrokuje pojedinačno parenje i mrijest u neuobičajeno vrijeme. Ukoliko je potrebno da se posuda za mriješćenje vrati kasnije, to treba uraditi najmanje 9 sati nakon početka osvjetljenja. U to kasno doba dana, ne dolazi do mriješćenja.

Aneks 4B

Supstrat za mriješćenje velikoglavog klijena

Dvije ili tri kombinovane plastične/keramičke/staklene pločice i posude za mrijest ili pločice i posude od nerĐajućeg čelika postavljaju se u svakoj ispitnoj komori (npr. sivi polukružni oluk dužine 80mm koji se nalazi na posudi sa ivicama dužine 130 cm). Pravilno obrađene PVC ili keramičke pločice su se pokazale odgovarajućim za supstrat za mriješćenje (Thorpe et al, 2007).

Preporučuje se brušenje pločica kako bi se pospiješilo prianjanje. Posuda takođe treba da se pregleda kako bi se spriječilo pristepene riba palim jajima osim ako je efikasnost prianjanja jaja dokazana u slučaju korišćenog supstrata za mriješćenje.

Podloga je namijenjena za zadržavanje svih jaja koja se nisu zalijepila za površinu ploče i stoga bi propala na dno akvarijuma (ili za ona jaja koja su položena direktno na ravnu plastičnu podlogu). Svi supstrati za mriješćenje treba da se ispiraju najmanje 12 sati, u vodi za razreĐivanje, prije upotrebe.

Aneks 5A

Procjena sekundarnih polnih karakteristika kod velikoglavog klijena u cilju otkrivanja određenih endokrino-aktivnih hemikalija

1. Pregled

Potencijalno važne karakteristike fizičkog izgleda kod odraslog velikoglavog klijena kada se radi o ispitivanju endokrinih disruptora uključuju boju tijela (tj. svijetla/tamna boja), šare (odnosno prisustvo ili odsustvo vertikalnih pruga), oblik tijela (tj. oblik glave i grudnog dijela, izduženost abdomena) i posebne sekundarne polne karakteristike (tj. broj i veličina izraslina, veličina leĐnog peraja i leglaice).

Izrasline se nalaze na glavi (leĐnom peraju) reproduktivno aktivnih mužjaka velikoglavog klijena i obično su poreĐani u obostrano simetričnom šablonu (Jensen et al., 2001). Ženke iz kontrolnih grupa i mladi mužjaci i ženke ne ipoljavaju znake razvoja izraslina (Jensen et al., 2001). Može se javiti do osam pojedinačnih izraslina oko očiju i između nozdrva mužjaka. Najveći broj i najveće izrasline nalaze se u dvije paralelne linije odmah ispod nozdrva i iznad usta. Kod mnogih riba postoji grupa izraslina ispod donje vilice; one koje su najbliže ustima obično se javljaju u jednom paru, dok se u trbušnom dijelu mogu naći i do četiri izrasline. Stvarni broj izraslina je rijetko veći od 30 (opseg od 18 do 28; Jensen et al. 2001). Dominantne izrasline (u pogledu broja) javljaju se kao jedinstvena relativno okrugla struktura visine približno jednake poluprečniku. Većina reproduktivno aktivnih mužjaka takoĐe ima barem nekoliko izraslina koje su uvećane i izražene tako da se ne mogu razlikovati kao pojedinačne strukture.

Neke vrste endokrino disruptivnih hemikalija mogu da uzrokuju neuobičajenu pojavu određenih sekundarnih polnih karakteristika kod suprotnog pola; na primjer, agonisti receptora za androgene, kao što su 17β- metiltestosteron ili 17β-trenbolon, mogu da uzrokuju razvoj izraslina kod ženki velikoglavog klijena (Smith, 1974; Ankley et al., 2001;) dok agonisti receptora za estrogene mogu prouzrokovati smanjenje broja ili veličine izraslina kod mužjaka (Miles-Richardson et al. 1999; Harries et al. 2000).

U daljem tekstu naveden je opis karakterizacije izraslina velikoglavog klijena na osnovu postupaka koji se primjenjuju u labaratoriji Agencije za zaštitu životne sredine SAD u Dulutu, Minesoti. Posebni proizvodi i/ili oprema mogu se zamijeniti sličnim dostupnim materijalima.

Najbolji pregled postiže se pomoću lupe sa osvjetljenjem ili stetoskopskim mikroskopom sa osvjetljenjem i sočivom od 3x. Posmatrajte leĐni i prednji dio ribe (glava prema posmatraču).

a) Staviti ribu u malu petrijevu posudu (npr. prečnika 100 mm), sa prednjim dijelom prema naprijed i trbušnim dijelom okrenutim na dolje. Izoštriti aparat kako bi se omogućilo uočavanje izraslina. Polako i nježno okretati ribu sa jedne strane na drugu kako bi se uočili djelovi na kojima se nalaze izrasline. Prebrojati i ocijeniti izrasline.
b) Ponoviti zapažanje na trbušnoj strani glave tako što se riba stavlja leĐima naprijed u petrijevu posudu.
c) Zapažanje treba da se završi u roku od dva minuta za svaku ribu.

2. Prebrojavanje i ocjena izraslina

Prepoznato je šest posebnih oblasti za procjenu prisustva izraslina i njihovog razvoja kod odraslog velikoglavog klijena. Razvijen je obrazac kako bi se evidentiralo mjesto i broj prisutnih izraslina. Broj izraslina se evidentira i njihova veličina se može brojčano ocijeniti kao: 0 – izostanak, 1 – prisutna, 2 – povećana i 3 – izražena za svaki organizam (slika 1). Ocjena 0 – izostanak izraslina. Ocjena 1 – prisutna, identifikuje se kao svaka izraslina sa jednim vrhom čija je visina približno jednaka njenom poluprečniku (prečniku). Ocjena 2 – povećana, odnosi se na tkivo koje podsjeća na zvjezdicu po izgledu, obično ima veliku radijalnu osnovu sa brazdama koje se javljaju iz sredine. Vrh izrasline je obično nazubljeniji ali ponekad može biti zaobljen. Ocjena 3 – izražena, obično se odnosi na prilično velike i zaobljene izrasline čija je struktura manje definisana. Ponekad se ove izrasline javljaju zajedno pri čemu stvaraju jednu masu duž jedne oblasti ili kombinacije oblasti (B, C i D, prema opisu u nastavku). Boja i uzorak slični su kao kod ocjene 2, ali su u nekim slučajevima prilično neodređeni. Korišćenje ovih sistema generalno će za rezultat imati sveukupne ocjene izraslina od < 50 kod normalnih mužjaka iz kontrolne grupe koji ima 18-20 izraslina (Jensen et al. 2001).

Slika 1

Stvarni broj izraslina kod nekih riba može biti veći od brojeva datih u obrascu (Aneks A) za određenu oblast koja se ocjenjuje. Ukoliko se to dogodi, dodatne ocjene se mogu navesti sa lijeve ili desne strane polja. Iz tog razloga obrazac ne treba da bude simetričan. Dodatni način evidentiranja mjesta izaslina koje su u paru ili se nalaze vertikalno niz horizontalni dio usta može se obaviti označavanjem dvije tačke za ocjenjivanje izraslina u jednom polju.

Mjesta na kojima se evidentiraju izrasline:

A- Izrasline koje se nalaze oko očiju. Nalaze se sa leĐne i trbušne strane oko prednje ivice oka. Često se nalaze u većem broju kod zrelih mužajaka iz kontrolne grupe, nisu prisutne kod ženki iz kontrolnih grupa, uopšteno se nalaze u paru (jedna pored svakog oka) ili pojedinačno kod ženki izloženih androgenima.

B- Izrasline koje se nalaze između nozdrva (pora senzornih kanala). Obično se javljaju u parovima kod mužjaka iz kontrolne grupe na višim nivoima (2-povećana ili 3-izražena) razvoja. Izrasline nisu prisutne kod ženki iz kontrolnih grupa dok se ponekad javljaju i razvijaju kod ženki izloženih androgenima.

C- Izrasline koje se nalaze odmah ispred nozdrva, paralelno sa ustima. Obično su povećane ili izražene kod mužjaka iz kontrolnih grupa. Prisutne ili uvećane su kod manje razvijenih mužjaka ili ženki koje su tretirane androgenima.

D- Izrasline koje se nalaze paralelno sa linijom usta. Obično se ocjenjuju kao razvijene kod mužjaka iz kontrolne grupe. Ne javljaju se kod ženki iz kontrolnih grupa, ali su prisutne kod ženki koje su izložene androgenima.

E- Izrasline na donjoj vilici, blizu usta, obično su male i javljaju se u parovima. Njihova pojava varira kod mužjaka u kontrolnim i tretiranim grupama i kod tretiranih ženki.

F- Izrasline sa trbušne strane u odnosu na E. Obično su male i u paru. Prisutne su kod mužjaka iz kontrolne grupe i ženki izloženih androgenima.

Obrazac za ocjenu izraslina	**Ocjena**
Oznaka _____	1-prisutna
Datum _____	2-uvećana
Ukupna ocjena _____	3-izražena

Aneks 5B

Procjena sekundarnih polnih karakteristika kod medake u cilju otkrivanja određenih endokrino-aktivnih hemikalija

U daljem tekstu prikazan je opis mjerenja papilarnih procesa koji predstavljaju sekundarne polne karakteristike kod medake (Oryzias latipes).

Nakon uklanjanja jetre (Aneks 6), tijelo ribe stavlja se u epruvetu sa približno 10 ml 10% neutralno puferovanog formalina (glavom okrenutom na gore, repom na dolje). Ako je gonada fiksirana rastvorom koji nije 10 % neutralno puferovani formalin, potrebno je napraviti poprečni rez duž tijela ribe između prednjeg dijela analnog peraja i anusa pomoću skalpela, vodeći računa da se ne ošteti gonopora ili sama gonada (Slika 3). Staviti kranijalni dio ribe u rastvor za fiksiranje u cilju očuvanja gonade, a repnu stranu tijela ribe u 20 % neutralni pufeovani formalin kako je gore opisano.

Nakon stavljanja tijela ribe u 10% neutralni puferovani formalin, pincetom uhvatiti prednji dio analnog peraja i držati ga presavijenog oko 30 sekundi kako bi analno peraje ostalo

otvoreno. Prilikom hvatanja analnog peraja pincetom, pažljivo uhvatite nekoliko perajnih zraka u prednjem dijelu vodeći računa da se papilarni proces ne ogrebe.

Nakon što je analno peraje bilo otvoreno približno 30 sekundi, smještiti tijelo ribe u 10 % neutralni puferovani formalin na sobnoj temperaturi do mjerenja papilarnih procesa (mjerenje treba da se izvrši nakon period fiksiranja od najmanje 24 časa).

1. Mjerenje

Nakon fiksiranja ribe u 10 % neutralni puferovani formalin tokom najmanje 24 časa, potrebno je izvaditi tijelo ribe iz epruvete i obrisati formalin filter papirom (ili papirnim ubrusom).

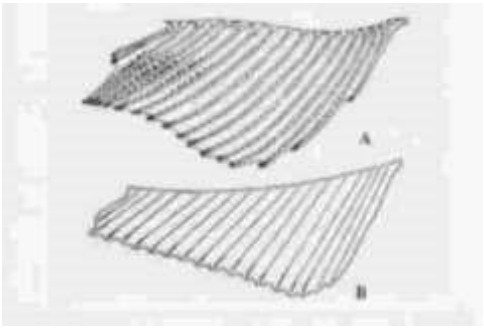
Postaviti ribu trbušnom stranom na gore. Zatim pažljivo napraviti zarez na analnom peraju pomoću malih makaza za seciranje (poželjno je odrezati analno peraje i mali dio perajne kosti).

Pincetom uhvatiti prednji dio odrezanog analnog peraja i staviti ga na staklo sa nekoliko kapi vode. Zatim analno peraje pokriti staklenim poklopcem. Voditi računa da se papilarni procesi ne ogrebu prilikom hvatanja analnog peraja pincetom.

Prebrojati kosti bodlje sa papilarnim procesima koristeći se brojačem pod biološkim mikroskopom (uspravni mikroskop ili obrnuti mikroskop). Papilarni procesi se prepoznaju kada se mala grupa procesa može uočiti na zadnjem dijelu kosti bodlje. Zabilježiti u obrascu broj kosti bodlje sa papilarnim procesima za svaki perajni zrak (npr. prvi perajni zrak: 0; drugi perajni zrak: 10; treći perajni zrak: 12, itd.) i unijeti zbir ovog broja u Excel tabelu za svaku ribu pojedinačno. Ukoliko je potrebno, slikati analno peraje i prebrojati kosti bodlje sa papilarnim procesima na fotografiji.

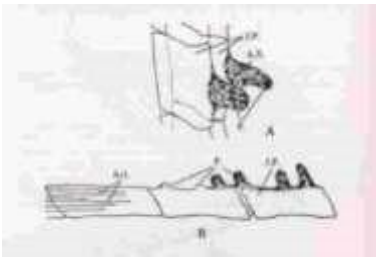
Nakon mjerenja, analno peraje staviti u epruvetu opisanu pod (1) i skloniti je.

Slika 1. Dijagram prikazuje polnu razliku u obliku i veličini analnog peraja. A, mužjak; B, ženka. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of Oryzias latipes and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

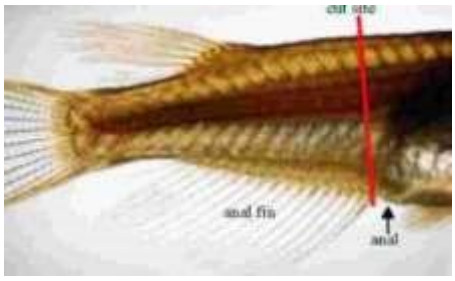


Slika 2.A: **Procesi na kostima bodlje analnih perajnih zraka. J.P.-kost bodlje; A.S., aksijalni prostor; P., proces. B, krajnji dio perajnog zraka. Na vrhu se nalaze šipkice peraja *(Actinotrichia - Act.) Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the***

male of Oryzias latipes and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



Slika 3. Fotografija tijela ribe sa prikazom mjesta reza kada je gonada fiksirana u rastvoru za fiksiranje koji nije 10% neutralni puferovani formalin. U tom slučaju, ostatak tijela se odrezuje između prednjeg dijela analnog peraja i analnog otvora pomoću skalpela (crvena linija), a prednji dio sa glavom ribe stavlja se u rastvor za fiksiranje gonade, dok se repni dio tijela ribe stavlja u 10% neutralni puferovani formalin.



Aneks 6

Preporučeni postupci za uzimanje uzoraka za analizu vitelogenina

Potrebno je voditi računa kako bi se izbjegla unakrsna kontaminacija između VTG uzoraka mužjaka i ženki.

<u>Postupak 1A:</u> Velikoglavi klijen, uzimanje uzorka krvi iz repne vene/arterije

Nakon anestezije, korijen repa se djelimično odvaja skalpelskim nožem i uzima se uzorak krvi iz repne vene/arterije uz pomoć heparinizovane mikrohematokritske kapilarne cjevčice. Nakon uzimanja krvi, plazma se brzo izoluje centrifugiranjem u trajanju od 3 minuta na 15 000g (ili po mogućnosti 10 minuta na 15 000g pri temperaturi od 4 °C). Po želji, procenat hematokrita može se utvrditi nakon centrifugiranja. Plazma se zatim uklanja iz mikrohematokritske epruvete i stavlja se u epruvetu za centrifugu sa 0,13 jedinica aprotinina (inhibitora proteaze) na temperaturi od – 80 °C dok se ne dođe u fazu određivanja vitelogenina. U zavisnosti od veličine velikoglavog klijena (što zavisi od pola ribe), količina plazme koja se uzorkuje obično se kreće od 5 do 60 mikrolitara po ribi (Jensen et al. 2001).

<u>Postupak 1B:</u> velikoglavi klijen, uzimanje uzorka krvi iz srca

Kao alternativno rješenje, krv se takođe može uzorkovati punkcijom srca pomoću heparinizovanog šprica (1000 jedinica heparina po ml). Krv se prenosi u epruvete za centrifugu (koje se čuvaju na ledu) i zatim se centrifugiraju (5 min, 7 000g, sobna

temperatura). Plazma zatim treba da se prebaci u čiste epruvete za centrifugu (u jednakim djelovima ako plazma to omogućava) i odmah zamrzne na– 80 °C, do analize (Panter et al., 1998).

<u>Postupak 2A:</u> Japanska medaka, odstranjivanje jetre kod medake

Uklanjanje ispitne ribe iz ispitne komore

Ispitna riba treba da se ukloni iz ispitne komore uz pomoć mrežice u obliku kašike. Voditi računa da se ispitivana riba ne ispusti u druge ispitne komore.

Načelno, ispitna riba treba da se ukloni sljedećim redosljedom: kontrolna grupa, kontrolna grupa sa rastvorom (kada je moguće), najniža koncentracija, srednja koncentracija, najveća koncentracija i pozitivna kontrolna grupa. Uz to, svi mužjaci treba da se uklone iz jedne ispitne komore prije uklanjanja preostalih ženki.

Pol svake ispitne ribe prepoznaje se na osnovu poljašnjih sekundarnih polnih karakteristika (npr. oblik analnog peraja).

Ispitna riba postavlja se u posudu za transport i odnosi do radnog stola u svrhe odstranjivanja jetre. Provjeriti tačnost oznake na ispitnoj komori i posudi za transport i potvrditi da je broj riba koje su uklonjene iz ispitne komore i broj riba koje ostaju u ispitnoj komori u skladu sa očekivanjima.

Ukoliko se pol ne može prepoznati prema poljašnjem izgledu ribe, potrebno je ukloniti sve ribe iz ispitne komore. U tom slučaju, pol treba da se identifikuje posmatranjem gonade ili sekundarnih polnih karakteristika uz pomoć steoroskopskog mikroskopa. **Odstranjivane jetre**

Premjestiti ispitnu ribu iz posude za transport u rastvor sa anestetikom uz pomoć male mreže u obliku kašike.

Nakon što je ispitna riba odstojala u anesteziji, prenosi se na filter papir (ili papirni ubrus) uz pomoć (obične) pincete. Prilikom hvatanja ispitne ribe, pincetom uhvatiti glavu kako bi se izbjeglo kidanje repa.

Obrisati vodu sa površine ispitne ribe filter papirom (ili papirnim ubrusom).

Ribu okrenuti trbušnom stranom na gore. Zatim makazama za seciranje napraviti mali poprečni rez između leĐnog vratnog dijela i srednjeg trbušnog dijela.

U ovaj rez ubaciti makaze za seciranje i izrezati abdomen od tačke repne strane od škržnog pokrivača do prednje strane anusa duž abdomena. Potrebno je voditi računa da se makaze za seciranje ne stave preduboko kako bi se izbjeglo oštećenje jetre i gonade.

Obaviti sljedeće postupke koji slijede pod stereoskopskim mikroskopom.

Položiti ispitnu ribu trbušnom stranom na gore na papirni ubrus (mogu se koristiti i petrijeva posuda ili staklo).

Raširiti zidove abdominalnog otvora preciznom pincetom i izvaditi unutrašnje organe. TakoĐe je prihvatljivo odstranjivanje unutrašnjih organa uklanjanjem jedne strane zida abdominalne šupljine po potrebi.

Otkriti povezani dio jetre i žučne kese uz pomoć još jedne precizne pincete. Zatim uhvatiti žučni kanal i otkinuti žučnu kesu. Voditi računa da se žučna kesa ne probuši.

Uhvatiti jednjak i odvojiti probavni trakt od jetre na isti način. Voditi računa da sadržaj probavnog trakta ne iscuri. Odvojiti repni dio probavnog trakta od anusa i ukloniti trakt iz abdominalne šupljine.

Ukloniti masno tkivo i ostalo tkivo sa poljašnjeg dijela jetre. Voditi računa da se jetra ne ogrebe.

Uhvatiti jetreni dio preciznom pincetom i odstraniti jetru iz abdominalne šupljine.

Staviti jetru na staklo. Uz pomoć precizne pincete, ukloniti svo dodatno masno tkivo i dodatno tkivo (npr. abdominalnu sluznicu), po potrebi, sa površine jetre.

Izmjeriti težinu jetre sa mikroepruvetom od 1,5 ml kao dare uz pomoć elektronske analitičke vage. Zabilježiti izmjerenu vrijednost u obrazac (očitano: 0,1 mg). Potvrditi identifikacione podatke na etiketi mikroepruvete.

Zatvoriti poklopac mikroepruvete u kojoj se nalazi jetra. Skloniti je u stalak za hlaĐenje (ili stalak sa ledom).

Nakon odstranjivanja jedne jetre, očistiti instrumente za seciranje ili ih zamijeniti čistim instrumentima.

Ukloniti jetre iz svih riba u posudama za transport u skladu sa prethodnim opisom.

Nakon odstranjivanja jetri iz svih riba u posudi za transport (odnosno svih mužjaka i ženki iz ispitne komore), svi uzorci jetre stavljaju se u stalak za epruvete sa identifikacionom oznakom i čuvaju se u zamrzivaču. Kada se jetre doniraju za prethodno tretiranje odmah nakon odstranjivanja, uzorci se prenose na drugu radnu stanicu u stalku za hlaĐenje (ili stalku sa ledom).

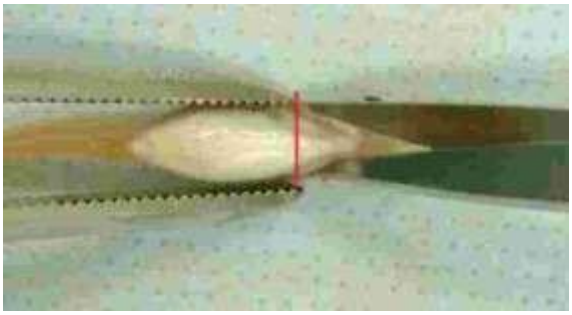
Nakon odstranjivanja jetre, tijelo ribe je na rapolaganju za mjerenje sekunardnh polnih karakteristika.

Uzorak

Čuvati uzorke jetre odstranjene iz ispitnih riba na ≤ – 70 °C ako se ne koriste za prethodno tretiranje brzo nakon uklanjanja.

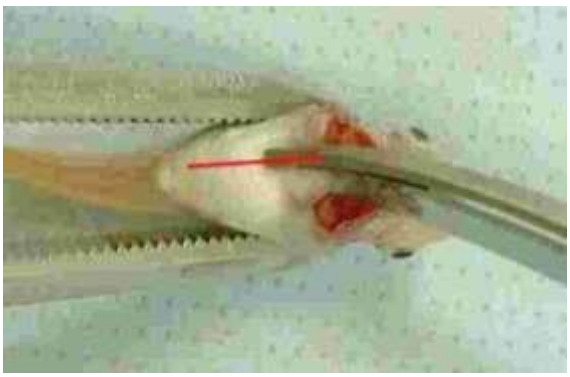
Slika 1

Rez se pravi makazama neposredno kod grudnih peraja.



Slika 2

Makazama se reže srednji dio abdomena do tačke približno 2 mm od kranijalne strane anusa.



Slika 3 **Abdominalni zidovi šire se kliještima kako bi se otkrila jetra i drugi unutrašnji organi. (Po mogućnosti abdominalni zidovi mogu se pričvstiti sa strane).**

Slika 4

Jetra se reže i odstranjuje pomoću kliješta

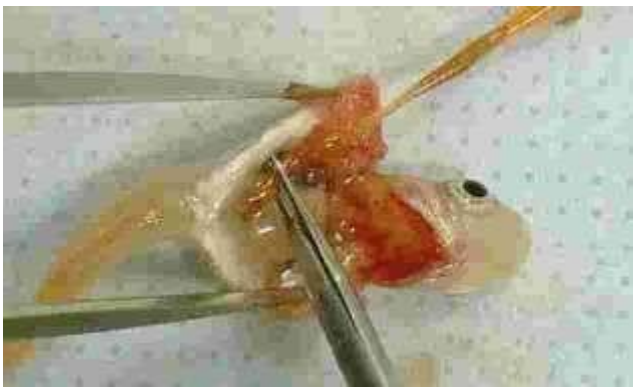
Slika 5

Crijeva se nježno povlače kliještima.

Slika 6

Makazama se režu oba kraja crijeva i sva mezenterijalna tkiva se također prekidaju.

Slika 7 (ženka) **Postupak za ženke je identičan.**



Slika 8

Završeni postupak

<u>Postupak 2B:</u> Japanska medaka (Oryzias latipes), preliminarno tretiranje jetre za analizu vitelogenina

Uzeti bocu homogenizacionog pufera iz kompleta za analizu ELISA i ohladiti je usitnjenim ledom (temperatura rastvora: ≤ 4 °C). Ako se koristi homogenizacioni pufer iz sistema EnBio ELISA, rastvoriti rastvor na sobnoj temperaturi, pa nakon toga ohladiti bocu usitnjenim ledom.

Izračunati količinu homogenizacionog pufera za jetru na osnovu njene težine (dodati 50 µl homogeizacionog pufera po 1 mg težine jetre za homogenat). Na primjer, ako je težina jetre 4,5 mg, količina homogenizacionog pufera je 225 µl. Pripremiti spisak količina homogenziacionog pufera za sve jetre. **Priprema jetre za preliminarno tretiranje**

Uzeti mikroepruvetu od 1,5 ml u kojoj se nalazi jetra iz zamrzivača neposredno prije tretiranja.

Preliminarno tretiranje jetre za mužjake treba da se izvrši prije ženki kako bi se izbjegla kontaminacija vitelogenina. Uz to, preliminarno tretiranje ispitnih grupa treba da se sprovede sljedećim redosljedom: kontrolna grupa, kontrolna grupa sa rastvorom (ako je moguće), srednja koncentracija, visoka koncentracija i pozitivna kontrolna grupa.

Broj mikroepruveta od 1,5 ml koje sadrže uzorke jetre izvaĐene iz zamrzivača ne smiju da premaše broj koji se može istovremeno centrifugirati.

Postaviti mikroepruvete od 1,5 ml koje sadrže uzorke jetre na stalak sa ledom (nema potrebe za rastvaranjem jetre) prema broju uzorka.

Preliminarno tretiranje

1. *<u>Dodavanje homogenizacionog pufera</u>*

Provjeriti spisak u pogledu količine homogenizacionog pufera koji se koristi za pojedinačne uzorke jetre i prilagoditi mikropipetu (opseg količine: 100-1 000 µl) odgovarajućoj količini. Na mikropipetu postaviti čisti vrh.

Uzeti homogenizacioni pufer iz boce sa reagensom i u mikroepruvetu koja sadrži jetru dodati pufer od 1,5 ml.

Dodati homogenizacioni pufer svim mikroepruvetama od 1,5 ml koje sadrže jetre u skladu sa gore opisani postupkom. Nema potrebe za zamjenom vrha mikropipete čistim vrhom. Međutiim, ako je vrh kontaminiran ili se sumnja da je kontaminiran, vrh treba zamijeniti.

2. *Homogenizacija jetre*

Na homogenizator mikroepruvete prikačiti novi tučak za homogenizaciju.

Ubaciti tučak u mikroepruvetu od 1,5 ml. Držati homogenizator mikroepruvete kako bi se jetra pritisnula između površine tučka i unutrašnjeg zida mikroepruvete od 1,5 ml.

Uključiti homogenizator mikroepruvete na 10 do 20 sekundi. Tokom postupka, potrebno je hladiti mikroepruvetu od 1,5 ml usitnjenim ledom.

Podići tučak iz mikroepruvete od 1,5 ml i ostaviti ga na 10 sekundi. Zatim izvršiti vizuelnu provjeru stanja suspenzije.

Ukoliko se djelovi jetre mogu uočiti u suspenziji, ponoviti postupak (3) i (4) kako bi se pripremio zadovoljavajući homogenat jetre.

Hladiti homogenat jetre u suspenziji na stalak sa ledom do centrifugiranja.

Zamijeniti tučak novim za svaki homogenat.

Homogenizovati sve jetre homogenizacionim puferom u skladu sa gore opisanim postupkom.

3. *Centrifugiranje suspendovanog homogenata jetre*

Potvrditi da je temperatura rashlađene komore za centrifugiranje ≤ 5 °C.

U ohlaĐenu centrifugu postaviti mikroepruvete od 1,5 ml koje sadrže homogenat jetre u suspenziji (podesiti ravnotežu ako je potrebno).

Centrifugirati suspendovani homogenat jetre na 13 000g 10 minuta pri temperaturi od ≤ 5 °C. Međutiim, ako su supernatanti adekvatno odvojeni, po potrebi se mogu prilagoditi centrifugalna sila i vrijeme centrifugiranja.

Nakon centrifugiranja, provjeriti da li su supernatanti razdvojeni na odgovarajući način (površina: lipidi, sredina: supernatant, donji sloj: tkivo jetre). Ukoliko nije došlo do odgovarajuće separacije, suspenziju još jednom centrifugirati pod istim uslovima.

Ukloniti sve uzorke iz ohlaĐene centrifuge i postaviti ih na stalak sa ledom prema broju uzorka. Voditi računa da se odvojeni slojevi ponovo ne jedinjenjee nakon centrifugiranja.

4. *Sakupljanje supernatanta*

Staviti četiri mikroepruvete od 0,5 ml za čuvanje supernatanta u stalak za epruvete.

Mikropipetom sakupiti 30 µl svakog supernatanta (srednji sloj) i staviti ga u jednu mikroepruvetu od 0,5 ml. Voditi računa da se ne sakupe lipidi sa površine ili tkivo jetre iz donjeg sloja.

Izvaditi supernatant i staviti ga u druge dvije mikroepruvete od 0,5 ml kao što je gore opisano.

Sakupiti ostatak supernatanta mikropipetom (ako je izvodljivo: ≥ 100 µl). Zatim supernatant staviti u posljednju mikroepruvetu od 0,5 ml. Voditi računa da se ne sakupe lipidi sa površine niti tkivo jetre iz donjeg sloja.

Zatvoriti poklopac mikroepruvete od 0,5 ml i na etiketi napisati količinu supernatanta. Mikroepruvete odmah ohladiti na stalku sa ledom.

Zamijeniti vrh mikropipete novim za svaki supernatant. Ukoliko se na vrhu nakupi veća količina lipida, odmah ga zamijeniti novim kako bi se izbjegla kontaminacija ekstrakta jetre mašću.

Sav centrifugirani supernatant staviti u četiri mikroepruvete od 0,5 ml u skladu sa gore opisanim postupkom.

Nakon stavljanja supernatata u mikroepruvete od 0,5 ml, staviti ih sve na stalak sa identifikacionom oznakom, a zatim odmah sve zamrznuti u zamrzivaču. Ako se koncentracije VTG mjere odmah nakon preliminarnog tretiranja, jednu mikroepruvetu od 0,5 ml (koja sadrži 30 µl supernatanta) ostaviti da se hladi u stalku za epruvete i prenijeti je na radnu površinu na kojoj se vrši ispitivanje ELISA. U tom slučaju, preostale mikroepruvete staviti u stalak za epruvete i zamrznuti ih u zamrzivaču.

Nakon sakupljanja supernatata, ostatke ukloniti na odgovarajući način.

Čuvanje uzorka

Mikroepruvete od 0,5 ml koje sadrže supernatant homogeata jetre čuvati na ≤ – 70 °C dok ne budu iskorišćene za ELISA ispitivanje.

Postupak 3A: Zebrica, uzimanje uzorka krvi iz repne vene/arterije

Odmah nakon anestezije, korijen repa treba zarezati poprečno i krv se uzima iz repne vene/arterije uz pomoć heparinizovane mikrohematokritske kapilarne cjevčice. Količina krvi varira od 5 do 15 µl u zavisnosti od veličine ribe. Jednaka količina pufera aprotinina (6 µgml u fiziološkom rastvoru sa fosfatnim puferom) dodaje se u mikrokapilarnu cjevčicu i plazma se od krvi odvaja centrifugiranjem (5 minuta na 600g). Plazma se stavlja u epruvete za ispitivanje i čuva na – 20 °C do analize vitelogenina ili ostalih proteina od inetersa.

Postupak 3B: Zebrica, uzimanje uzorka krvi punkcijom srca

Kako bi se izbjegla koagulacija/zgrušavanje krvi i propadanje proteina, uzorci se sakupljaju u fiziološkom rastvoru sa fosfatnim puferom (PBS) koji sadrži heparin (1 000 jedinica/ml) i inhibitor proteaze aprotinin (2 TIU/ml). Kao sastojci za pufer preporučuju se soli amonijum heparina i liofilizovani aprotinin. Za uzimanje uzoraka krvi, preporučuje se špric (1ml) sa fiksiranom tankom iglom (npr. Braun Omnikan-F).U špricu već treba da se nalazi pufer (približno 100 µl) kako bi se u potpunosti isprale male količine krvi iz svake ribe. Uzorci krvi uzimaju se punkcijom srca. Prvo je potrebno ribi dati anestetik MS-222 (100 mg/l). Kod odgovarajuće količine anestezije korisnik može da razazna otkucaje srca zebrice. Prilikom punkcije srca, držati klip šprica pod blagom tenzijom. Količina koja se sakuplja kreće se od 20 – 40 mikrolitara. Nakon punkcije srca, mješavinu krvi i pufera prenijeti u ispitnu epruvetu. Plazma se odvaja od krvi centrifugiranjem (20 minuta; 5000 g) i čuva se na temperaturi of – 80 °C do analize.

Postupak 3C: SOP: Zebrica, homogenizacija glave i repa

Ribama je data anestezija i usmrćene su na human način u skladu sa opisom ispitivanja.

Glava i rep odsijecaju se u skladu sa slikom 1.
Važno: Sve instrumente za seciranje i dasku za seciranje potrebno je isprati i pravilno očistiti (npr. 96% etanolom) između rukovanja svakom ribom u cilju sprečavanja „zagaĐenja vitelogenina— sa ženki i indukovanih mužjaka na neindukovane mužjake.

Slika 1

Težina odrezane glave i repa svake ribe vagaju se do najbližeg mg.

Nakon vaganja, djelovi se stavljaju u odgovarajuće epruvete (npr. epruvete za centrifugiranje) i zamrzavaju se na temperaturi od – 80 °C do homogenizacije ili se direktno homogenizuju na ledu sa dva plastična tučka. (Druge metode se mogu koristiti ako se obavljaju na ledu, a rezultat je homogena masa). Važno: Epruvete treba pravilno da se označe tako da se glava i rep odgovarajuće ribe mogu povezati sa njihovim tijelom koje se koristi za histologiju gonade.

Kada se postigne homogena masa, dodaje se smrznuti homogenizacioni pufer 4 puta teži u odnosu na težinu tkiva (22). Nastavite da radite tučcima dok smješa ne postane homogena. Važna napomena: novi tučci se koriste za svaku ribu.

Uzorci se smještaju na led do centrifugiranja pri temperaturi 4 °C na 50 000 × g 30 minuta.

Koristiti pipetu za doze supernatanta u količini od 20 µl koje se sipaju u najmanje dvije epruvete umakanjem vrha pipete ispod sloja masnoće na površini i pažljivim usisavanjem supernatanta bez djelića masnoće ili taloga.

Epruvete se čuvaju na temperaturi od – 80 °C do upotrebe.

Aneks 7

Uzorci sa pojačanim nivoom vitelogenina i referentni standard između testova

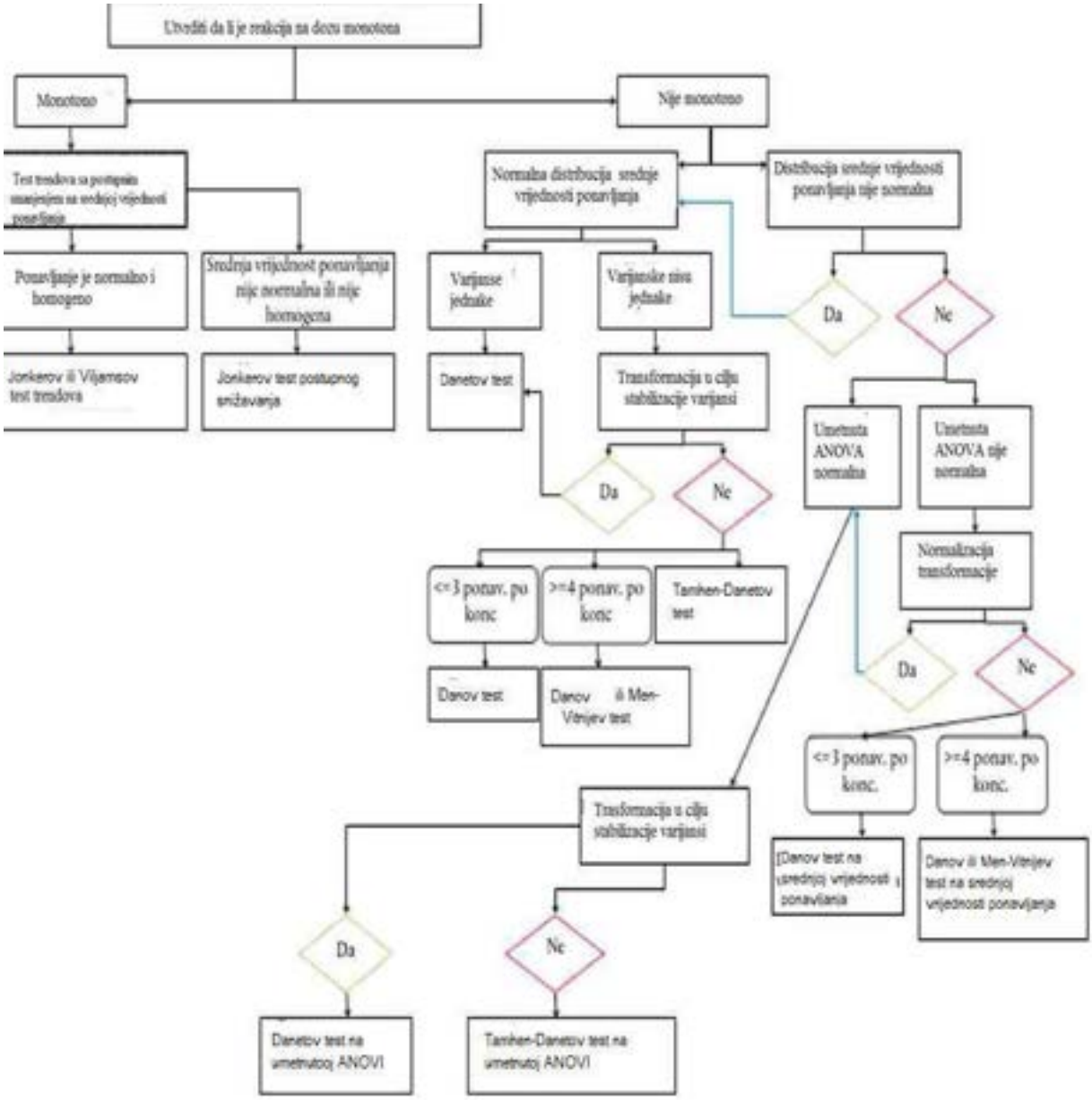
Svakog dana sprovođenja ispitivanja vitelogenina, analizira se uzorak sa povećanim nivoom vitelogenina izraĐen kroz referentni standard između testova. Vitelogenin koji se koristi za izradu referentnog standarda između testova će formirati grupu koja je drugačija od one koja se koristi za pripremu kalibracionih standarda za ispitivanje koje se vrši.

Pojačani uzorak izraĐuje se dodavanjem poznate količine standarda između testova uzorku plazme mužjaka iz kontrolne grupe. Uzorak se pojačava kako bi se postigla koncentracija vitelogenina koja je 10 do 100 puta veća od očekivane koncentracije vitelogenina kod mužjaka riba iz kontrolne grupe. Uzorak plazme mužjaka iz kontrolne grupe koji se pojačava može se uzeti iz jedne ribe ili se može sastaviti iz nekoliko riba.

Poduzorak neojačane plazme mužjaka analizira se u najmanje dva dupla bunarčića. Pojačani uzorak se takoĐe analizira u najmanje dva dupla bunarčića. Srednja količina vitelogenina u dva neojačana uzorka plazme mužjaka iz kontrolne grupe dodaju se izračunatoj količini vitelogenina koja se dodaje ojačanim uzorcima kako bi se utvrdile očekivane koncentracije. Odnos ove očekivane koncentracije i izmjerene koncentracije evidentira se zajedno sa rezultatima svakog niza ispitivanja koji su izvršeni tog dana.

Aneks 8

Grafikon odluka za statističku analizu



C.38. ISPITIVANJE METAMORFOZE VODOZEMACA

1. UVOD

Ova ispitna metoda poklapa se sa Smjernicama za ispitivanje OECD(TG) 231 (2009).

Potreba za razvojem i potvrĐivanjem ispitivanja putem kojeg se mogu otkriti hemikalije aktivne u sistemu štitne žlijezde kičmenjaka potiče iz zabrinutosti da nivoi hemikalija u životnoj sredini mogu izazvati negativne efekte na ljude i životinjski svijet. OECD je 1998. godine započeo visoko prioritetne aktivnosti kako bi se revidirale postojeće smjernice za ispitivanje i razvile nove za izbor i testiranje potencijalnih endokrinih disruptora. Jedan element aktivnosti je bio razvoj Smjernica za skrining hemikalija koje djeluju na sistem štitne žlijezde kičmenjaka. Predloženo je unapreĐenje studije toksičnosti kod glodara u trajanju od 28 dana sa primjenom ponavljanih doza (Poglavlje B.7 ovog Aneksa) i Ispitivanja

metamorfoze vodozemaca (AMA). UnaprijeĐena ispitna metoda B.7 bila je predmet postupka validnosti i izdat je revidirani ispitni metod. Ispitivanje metamorfoze vodozemaca (AMA) prošlo je sveobuhvatan program validnosti koji je uključio intralabaratorijske i interlabaratorijske studije kojima je dokazana važnost i pouzdanost ispitivanja (1, 2). Nakon toga, postupak validnosti bio je predmet analize panela nezavisnih stručnjaka (3). Ova ispitna metoda je rezultat iskustva stečenog tokom studija validnosti za otkrivanje hemikalija koje aktivno utiču na štitnu žlijezdu i rada koji je obavljen na drugim mjestima u državama članicama OECD.

2. NAČELO ISPITIVANJA

Ispitivanje metamorfoze vodozemaca je skrining ispitivanje usmjereno na empirijsku identifikaciju hemikalija koje mogu ometati normalnu funkciju hipotalamusno-hipofiznotiroidne ose (HPT). AMA predstavlja generalizovani model za kičmenjake do mjere u kojoj se zasniva na očuvanim strukturama i funkcijama HPT ose. To je važno ispitivanje jer se metamorfozom vodozemaca omogućava dobro proučavan proces koji zavisi od štitne žlijezde i kojim se otkriva aktivnost štitne žlijezde kod životinje koja prolazi kroz morfološki razvoj.

Opšti eksperiment osmišljen je tako da podrazumijeva izlaganje 51. stadijuma Xenopus laevis punoglavaca u odnosu na najmanje tri različite koncentracije ispitivane hemikalije i kontrolne grupe sa vodom za razrjeĐivanje tokom perioda od 21 dan. Za svako ispitno tretiranje postoje četiri ponavljanja. Gustina larvi na početku testa je 20 punoglavaca po ispitnom akvarijumu u svim tretiranim grupama. Parametar praćenja posmatranja su dužina zadnjih udova, dužina od vrha nosa do kloake, stadijum razvoja, mokra masa, histologija štitne žlijezde i svakodnevno posmatranje smrtnosti.

3. OPIS METODE

3.1. Ispitne vrste

Vrsta Xenopus laevis se rutinski uzgaja u labaratorijama širom svijeta i lako se može nabaviti kod lokalnih dobavljača. Razmnožavanje se kod ove vrste može lako podstaći tokom godine korišćenjem injekcija humanog horionskog gonadotropina i larve kao rezultat toga se mogu rutinski uzgajati do odabranih stadijuma razvoja u velikom broju kako bi se omogućilo korišćenje ispitnih protokola za koje je potreban određen stadijum razvoja. Poželjno je da su larve koje se koriste za ispitivanje dobijene iz odraslih jedinki uzgojenih u labaratoriji. Kao alternativno rješenje, iako to nije poželjno, jaja ili embrioni mogu se dostaviti labaratoriji koja sprovodi ispitivanje i može im se omogućiti aklimatizacija; dostavljanje u fazi larve za potrebe ispitivanja nije dozvoljeno.

3.2. Oprema i material

Oprema i materijal koji slijede potrebni su za sprovođenje ovog ispitivanja:

a) Sistem izlaganja (v. opis u daljem tekstu);
b) Stakleni akvarijum ili akvarijum od nerĐajućeg čelika (v. opis u daljem tekstu);
c) Akvarijumi za uzgajanje;
d) Uređaj za kontrolu temperature (npr. grijači ili hladnjaci (sa mogućnošću prilagoĐavanja na temperaturu od 22° ± 1 °C));
e) Termometar;
f) Binokularni mikroskop za seciranje;
g) Digitalna kamera sa najmanjom rezolucijom od 4 megapiksela i mikrofunkcijom;
h) Softver za digitalizaciju fotografija;
i) Petrijeva posuda (npr. 100 × 15 mm) ili providna plastična posuda slične veličine;

j) Analitička vaga sa preciznošću do 3 decimale (mg);
k) Mjerač rastvorenog kiseonika;
l) Mjerač pH vrijednosti;
m) Mjerač intenziteta svjetlosti koji može mjeriti u luks jedinicama;
n) Razni labaratorijski stakleni materijal i alati;
o) Podesive pipete (10 do 5 000 µl) ili niz pipeta odgovarajućih veličina;
p) Hemikalije koje se ispituju u dovoljnim količinama za sprovođenje studije, poželjno jedna serija;
q) Analitički instrumenti odgovarajući za hemikaliju tokom ispitivanja ili ugovorene analitičke usluge.

3.2.1. Ispitivost hemikalije

AMA se zasniva na protokolu vodenog izlaganja gdje se ispitna hemikalija uvodi u ispitne komore kroz sistem protoka. Metoda protoka međutiim povlači i ograničenja u pogledu vrste hemikalija koja se može ispitivati, što je utvrĐeno fizikohemijskim svojstvima same hemikalije. Iz tog razloga, prije korišćenja ovog protokola, potrebno je dobiti sve osnovne informacije o hemikaliji koje su važne za utvrĐivanje mogućnosti ispitivanja hemikalije i potrebno je konsultovati Smjernice OECD o ispitivanju toksičnosti teških supstanci i smješa u vodi (4). Karakteristike koje ukazuju da može doći do poteškoća prilikom testiranja hemikalije u vodenim sistemima uključuju: visoki koeficijenti razdvajanja oktanola i vode (log Kow), visoku isparljivost, podložnost hidrolizi i podložnost fitolizi u uslovima labaratorijskog osvjetljenja. Ostali faktori mogu takoĐe uticati na utvrĐivanje ispitivosti i potrebno ih je utvrditi u svakom slučaju posebno. Ukoliko uspješan test za hemikaliju nije moguć uz pomoćnog ispitnog sistema protoka, može se koristiti sistem statičkog obnavljanja. Ukoliko nijedan od ovih sistema nije odgovarajući za ispitnu hemikaliju, hemikalija se ne testira korišćenjem ovog protokola.

3.3. Sistem izlaganja

Poželjan je sistem protoka razrjeĐivača, kada je moguće, u odnosu na sistem statičkog obnavljanja. Ukoliko fizička i/ili hemijska svojstva bilo koje od ispitnih hemikalija nisu pogodna za sistem protoka razreĐivača, koristi se alternativni sistem izlaganja (npr. statičko obnavljanje). Komponente sistema treba da imaju komponente od stakla, nerĐajućeg čelika i/ili politetrafluoroetilena u dodiru sa vodom. Međutiim, može se koristiti odgovarajuća plastika ukoliko se studija time neće ugroziti. Akvarijumi za izlaganje treba da budu od stakla ili nerĐajućeg čelika, opremljeni cijevima koje doprinose da približna zapremina akvarijuma iznosi između 4 i 10 litara i minimalna dubina vode od 10 do 15 cm. Sistem treba da bude u mogućnosti da podrži sve koncentracije izlaganja i kontrolu, sa četiri ponavljanja po tretmanu. Stopa protoka za svaki akvarijum treba da bude nepromjenljiva s obzirom na održavanje bioloških uslova i izlaganje hemikaliji (npr. 25 ml/min). Akvarijumi za tretiranje treba nasumično da se rasporede na mjesto u sistemu izlaganja kako bi se smanjili potencijalni efekti mjesta, uključujući manje varijacije u temperaturi, intenzitetu svjetlosti, itd. Fluoroscentno osvjetljenje treba koristiti kako bi se obezbijedio fotoperiod od 12 sati svijetla: 12 sati tame, intenziteta koji se kreće od 600 do 1 000 luksa (lumen/m2) na površini vode. Temperatura vode u svakom ispitnom akvarijumu treba da se održava na 22° ± 1 °C, pH vrijednost između 6,5 i 8,5, a koncentracija rastvorenog kiseonika (DO) > 3,5 mg/l (> 40 % zasićenosti kiseonikom). Temperaturu vode, pH vrijednost i rastvoreni kiseonik treba mjeriti najmanje jednom nedjeljno; temperaturu je poželjno mjeriti u kontinuitetu u najmanje jednoj ispitnoj posudi. U Aneksu 1 navedeni su eksperimentalni uslovi u kojima protokol treba da se izvrši. Za dalje informacije o uspostavljanju sistema izlaganja sa protokom i/ili sistemima

statičkog obnavljanja, vidjeti Standardne smjernice za sprovođenje ispitivanja akutne toksičnosti na ispitivanim materijalima sa ribama, makrobeskičmenjacima i vodozemcima Američkog društva za testiranje i materijale (5) i opšta toksikološka ispitivanja vode.

3.3.1. Kvalitet vode

Može se koristiti bilo koja voda koja je lokalno dostupna (npr. izvorska voda ili voda iz vodovoda filtritrana aktivnim ugljenikom) u kojoj je omogućen normalan rast i razvoj punoglavaca X. laevis. S obzirom da kvalitet lokalne vode može značajno da varira iz mjesta u mjesto, potrebno je ssprovesti analizu kvaliteta vode, posebno ako podaci o prethodnom korišćenju vode za uzgajanje vrste Xenopus nisu na rapolaganju. Posebna pažnja treba da se posveti da voda ne sadrži bakar, hlor ili hloramin, koji su toksični za žabe i punoglavce. Dalja preporuka je da se voda analizira u pogledu osnovnih nivoa fluorida, perhlorata i hlorata (nusproizvoda dezinfikovanja vode za piće) jer svi ovi anjoni mogu da poremete rezultate studije. Potrebno je izvršiti analizu prije početka ispitivanja i ispitna voda ne treba da sadrži ove anjone.

3.3.2. Koncentracija jodida u ispitnoj vodi

Kako bi štitna žlijezda stvorila TH, potrebno je da za larve na rapolaganju postoji dovoljno jodida kroz kombinaciju vode i prehrambenih izvora. Za sada, ne postoje empirijski dobijene smjernice za minimalne koncentracije jodida. Međutiim, rapoloživost jodida može da utiče na reakciju sistema štitne žlijezde na aktivne agente štitne žlijezde i poznato je da moduliše bazalnu aktivnost štitne žlijezde, aspekat koji zaslužuje da mu se posveti pažnja prilikom tumačenja rezultata iz histopatologije štitne žlijezde. Stoga je potrebno evidentirati izmjene koncentracije jodida u ispitnoj vodi. Na osnovu rapoloživih podataka iz studija validnosti, pokazalo se da protokol dobro funkcioniše kada se koncentracije jodida (I-) u ispitnoj vodi keću od 0,5 and 10 µg/l. Idealan nivo koncentracije jodida u ispitnoj vodi treba da iznosi 0,5 µg/l. Ukoliko se ispitna voda dobija iz dejonizovane vode, treba dodati jod u minimalnoj koncentraciji od 0,5 µg/l. U izvještaju je potrebno zabilježiti svako naknadno dodavanje joda ili drugih soli u ispitnu vodu.

3.4. Držanje životinja

3.4.1. Njega i uzgajanje odraslih jedinki

Njega i uzgoj odraslih jedinki sprovodi se u skladu sa standardnim smjernicama pa se čitalac za više informacija upućuje na stadardne smjernice za sprovođenje ispitivanja teratogeneze embriona žabe (FETAX) (6). Te standardne smjernice sadrže primjer odgovarajućih metoda njege i uzgajanja, ali nije potrebno strogo ih se pridržavati. Kako bi se podstaklo razmnožavanje, parovima (3-5) odraslih ženki i mužjaka ubrizgava se humani horionski gonadotropin (hCG). Primjercima ženki i mužjaka ubrizgava se približno 800 IU-1 000 IU odosno 600 IU-800 IU hCG rastvorenog u 0,6-0,9 % slani rastvor. Parovi koji se razmnožavaju drže se u velikim akvarijumima, ne ometaju se i obezbjeđuju se statični uslovi kako bi se podstakao ampleksus. Dno svakog akvarijuma za razmnožavanje treba da ima lažno dno od nerĐajućeg čelika ili plastičnu mrežicu kako bi jaja pala na dno akvarijuma.

Žabe kojima se hCG ubrzigava kasno popodne obično polože većinu svojih jaja do sredine jutra sljedećeg dana. Nakon što je dovoljna količina jaja proizvedena i oploĐena, odrasle jedinke se uklanjaju iz akvarijuma za razmnožavanje.

3.4.2. Briga o larvama i njihova selekcija

Nakon što se odrasle jedinke uklone iz akvarijuma za razmnožavanje, jaja se sakupljaju i procjenjuje se njihova života sposobnost uz pomoć podgrupe embriona iz svih akvarijuma za uzgajanje. Najbolja pojedinačna ikra(e) (preporučuje se 2-3 u cilju procjene kvaliteta ikre) treba da se zadrži na osnovu životne sposobnosti embriona i prisustva odgovarajućg broja (najmanje 1 500) embriona. Svi organizmi koji se koriste u studiji treba da potiču iz jednog mrješćenja (tj. ikre ne treba da se miješaju). Embrioni se premještaju u veliku ravnu posudu ili zdjelu i sva očigledno mrtva ili abnormalna jaja (v. definiciju pod brojem 5)) uklanjaju se uz pomoć pipete ili kapaljke. Zdravi embrioni iz svakog od tri mrijesta premještaju se u tri posebne posude za polaganje jaja.Četiri dana nakon premještanja u posude za polaganje jaja, bira se najbolja ikra, na osnovu životne sposobnosti i uspjeha polaganja jaja i larve se prebacuju u odgovarajući broj posuda za uzgajanje na temperaturi od 22° ± 1 °C. Uz to, dodatne larve premještaju se u dodatne posude tokom prve nedjelje. Ovim postupkom se održava doslijedna gustina organizama i time se smanjuju odstepena u razvoju u grupi iz jednog mrješćenja. Sve posude za uzgajanje treba svakodnevno čistiti. Kao predostrožnost, poželjne su vinilne ili nitrilne rukavice u odnosu na gumene. Uginule larve treba svakodnevno uklanjati i zamjenjivati larvama kako bi se održao broj organizama tokom prve nedjelje. Hranjenje treba obavljati najmanje dva puta dnevno.

Tokom faze prije izlaganja, punoglavci se navikavaju na uslove faze stvarnog izlaganja, uključujući vrstu hrane, temperaturu, ciklus svjetlosti-tame i podlogu za uzgajanje kulture. Iz tog razloga, preporuka je da se ista kultura/voda za razreĐivanje koriste tokom faze prije izlaganja i faze izlaganja. Ukoliko se koristi statički sistem kulture za održavanje punoglavaca tokom faze prije izlaganja, podloga za uzgajanje kulture treba u potpunosti da se zamjenjuje najmanje dva puta nedjeljno. Preveliki broj koji uzrokuje visoka gustina larvi tokom perioda prije izlaganja treba izjegavati jer to može znatno da utiče na razvoj punoglavaca tokom kasnije faze ispitivanja. Stoga, gustina uzgoja ne treba da premaši približno četiri punoglavca po litru podloge za uzgajanje kutlure (sistem statičkog izlaganja) ili 10 punoglavaca po litru podloge za uzgajanje kulture (sa npr. 50 ml/min brzine protoka u sistemu prije izlaganja ili sistemu uzgajanja kulture). U tim uslovima, punoglavci treba da se razviju iz 45/46. stadijuma u 51. stadijum u roku od dvanaest dana. Reprezentativni punoglavci ove matične populacije treba svakodnevno da se provjeravaju zbog stadijuma razvoja kako bi se procijenilo odgovarajuće vrijeme za početak izlaganja. Potrebno je voditi računa da se stres i trauma punoglavaca svedu na najmanju moguću mjeru, posebno tokom kretanja, čišćenja akvarijuma i rukovanja larvama. Treba izbjegavati stresne uslove/aktivnosti kao što je glasna i/ili neprestana buka, kuckanje po akvarijumu, vibracije u akvarijumu, pretjerana aktivnost u labaratoriji i brze promjene okruženja (raspoloživo osvjetljenje, temperatura, pH vrijednost, DO, brzina protoka vode, itd.). Ukoliko se punoglavci ne razviju do 51. stadijuma u roku od 17 dana od oplodnje, pretjerani stres treba smatrati potencijalnim krivcem.

3.4.3. Podloga za uzgajanje larvi i hranjenje

Punoglavci se hrane npr. hranom za punoglavce koja je dostupna na tržištu i koja je korišćena u studijama validnosti tokom perioda prije izlaganja (nakon 45./46. stadijuma Nievkop i Faber (Nieuwkoop and Faber) (NF)) (8)) i tokom cjelokupnog peroda ispitivanja u trajanju od 21 dan ili drugom hranom za koju je dokazano da ima isti učinak na Ispitivanje metamorfoze vodozemaca. Hranjenje tokom perioda prije izlaganja treba pažljivo da se prilagodi kako bi se ispunile potrebe punoglavaca u razvoju. To znači da punoglavcima koji su se tek izlegli treba da se daju male porcije hrane nekoliko puta dnevno (najmanje dva puta). Pretjerana količina hrane treba da se izbjegava kako bi se i) održao kvalitet vode i ii) spriječilo začepljenje filtera česticama hrane i ostacima. Kada je riječ o hrani punoglavaca koja se koristi u studijama validnosti, dnevne porcije hrane treba da se povećavaju uporedo sa razvojem punoglavaca za približno 30 mg/po životinji/dnevno ubrzo nakon početka testa. Ova hrana dostupna na tržištu se pokazala u studijama validnosti da pruža podršku

pravilnom razvoju i rastu punoglavaca vrste X. laevis i predstavlja sitne čestice koje ostaju u cjevčici za vodu duže vrijeme i mogu se isprati protokom vode. Stoga, ukupna dnevna količina hrane treba da se podijeli u manje porcije i daje najmanje dva puta dnevno. Punoglavci se mogu hraniti suvom hranom ili rastvorom pripremljenim u vodi za razrjeĐivanje. Takav rastvor treba svakog dana da se priprema kako bi bio svjež i da se čuva na temperaturi od 4 °C kada se ne koristi.

Tabela 1: Hranjenje komercijalno dostupnom hranom za punoglavce korišćenom u studijama validnosti za punoglavce X. laevis tokom dijela životnog ciklusa AMA u uslovima protoka

Dan studije	Porcija hrane (mg hrane/životinja/dan)
0-4	30
5-7	40
8-10	50
11-14	70
15-21	80

3.5. Analitička hemija

Prije sprovođenja studije, potrebno je procijeniti stabilnost ispitivane hemikalije korišćenjem postojećih informacija o njenoj rastvorljivosti, razgradivosti i isparivosti. Ispitni rastvori iz svakog identičnog akvarijuma svake koncentracije treba da se uzorkuju u cilju analitičke hemijske analize na početku ispitivanja (dan 0) i nedjeljno tokom ispitivanja potrebno je uzimati najmanje četiri uzorka. TakoĐe se preporučuje da se svaka ispitna koncentracija analizira tokom pripreme sistema, pije početka ispitivanja, kako bi se provjerilo funkcionisanje sistema. Uz to, preporuka je da se rastvori analiziraju kada se mijenjaju, posebno ukoliko količina rastvora ne sadrži dovoljne količine hemikalije tokom trajanja perioda rutinskog uzorkovanja. Kada je riječ o hemikalijama koje se ne mogu otkriti u nekim ili svim koncentracjama koje se koriste tokom ispitivanja, rastvori treba da se izmjere i zabilježe stope protoka sistema kako bi se izračunale nominalne koncentracije.

3.6. Uvođenje hemikalije

Metoda koja se koristi za uvođenje ispitne hemikalije u sistem može da varira u zavisnosti od njenih fizioloških i hemijskih karakteristika. Hemikalije rastvorljive u vodi mogu se rastvoriti u jednakim količinama ispitne vode u koncentracijama kojima se omogućava uvođenje ciljne ispitne koncentracije u sistem protoka. Hemikalije koje su u tečnom obliku na sobnoj temperaturi i djelimično se rastvaraju u vodi mogu se uvesti kroz uvođenje cijevi za zasićivanje od staklene vune. Poželjno je da se koristi sistem bez prenosnika, ali razne ispitne hemikalije posjeduju različite fizikohemijske karakterstike za koje će vjerovatno biti potrebni različiti pristupi za pripremu vode za izlaganje hemikaliji. Poželjno je da se uloži napor da se izbjegnu rastvori ili prenosnici iz sljedećih razloga: i) određeni rastvori sami mogu uzrokovati toksičnost i/ili neželjene ili neočekivane endokrinološke reakcije, ii) ispitivane hemikalije iznad njihove rastvorljivosti u vodi (što se često dogaĐa kada se koriste rastvori) može za rezultat imati netačna utvrĐivanja djelotvornih koncentracija i iii) korišćenje rastvora kod dugoročnih ispitivanja za rezultat može imati pojavu značajnog nivoa „biofilma— povezanog sa makrobiološkom aktivnošću. U cilju utvrĐivanja najbolje metode, potrebno je voditi se dokumentom o ispitivanju toksičnosti teških supstanci i smješa. Rastvori za koje je utvrĐeno da su djelotvorni za ispitivanje toksičnosti u vodi uključuju aceton, etanol, metanol, dimetil formamid i trietilen glikol. Kada se koristi prenosnik rastvora, koncentracije rastvora treba da budu ispod hronične koncentracije bez vidljivog efekta (NOEC). Smjernicama OECD se preporučuje maksimalna količina od 100 µl/l, a nedavnim

pregledom je preporučeno da se koriste koncentracije rastvora koje su niske i iznose 20 µl/l vode za razreĐivanje. Ukoliko se koriste prenosnici rastvora, potrebno je izvršiti procjenu odgovarajućih kontrolnih grupa sa rastvorom pored kontrolnih grupa bez rastvora (čista voda). Ukoliko hemikaliju nije moguće uvesti kroz vodu, ili usljed njenih fizikohemijskih karakteristika (niska rastvorljivost) ili ograničene dostupnosti hemikalije, može se razmotriti njeno uvođenje putem ishrane. Preliminarne aktivnosti sprovedene su u pogledu izlaganja putem hrane ali se ovaj vid izlaganja ne koristi često. Izbor metode treba da se dokumentuje i analitički potvrdi.

3.7. Izbor ispitnih koncentracija

3.7.1. Utvrđivanje visoke ispitne koncentracije

U svrhe ovog ispitivanja, najveća ispitna koncentracija treba da se utvrdi kroz granicu rastvorljivosti ispitne hemikalije, maksimalna tolerisana koncentracija (MTK) za akutno toksične hemikalije ili 100 mg/l, koja god da je niža.

MTK se definiše kao najveća ispitna koncentracija hemikalije koja za rezultat ima manje od 10% akutne smrtnosti. Prilikom korišćenja ovog pristupa pretpostavlja se da postoje podaci o empirijskoj akutnoj smrtnosti iz kojih se MTK može procijeniti. Procjena MTK može biti netačna i obično je potrebno stručno mišljenje. Iako korišćenje modela regresije može biti tehnički najispravniji pristup za procjenu MTK, korisna približna vrijednost MTK može se izvesti iz postojećih podataka o akutnim stanjima kroz korišćenje 1/3 akutne vrijednosti LC50. Međutiim, moguće je da nedostaju podaci o akutnoj toksičnosti za vrstu koja se ispituje. Ukoliko na rapolaganju ne postoje podaci o akutoj toksičnosti za određene vrste, može se ssprovesti test LC50 u trajanju od 96 sati sa punoglavcima koji su reprezentativni primjerci (tj. u istoj fazi) onih koji se ispituju u okviru AMA. Po mogućnosti, ukoliko su rapoloživi podaci o drugim vodenim vrstama (npr. studije LC50 kod riba ili drugih vodozemaca), stručno mišljenje se može koristiti za procjenu vjerovatne MTK zasnovane na ekstrapolaciji vrsta.

Kao alternativno rješenje, ako hemikalija nije akutno toksična ili rastvorljiva iznad 100 mg/l, 100 mg/l se smatra najvećom ispitnom koncetracijom (NIK) jer se ova koncentracija obično smatra „praktično netoksičnom—.

Iako ovo nije preporučeni postupak, metode statičkog obnavljanja mogu se koristiti kada metode protoka nisu odgovarajuće za postizanje MTK. Ukoliko se koriste metode statičkog obnavljanja, stabilnost koncentracije ispitne hemikalije treba da se evidentira i da zadrži u okviru granica kriterijuma učinkovitosti. Preporučuju se periodi obnavljanja od 24 časa. Periodi obnavljanja koji su duži od 72 časa nisu prihvatljivi. Uz to, parametri kvaliteta vode (npr. DO, temperatura, pH vrijednost, itd.) treba da se mjere na kraju svakog perioda obnavljaja, odmah prije samog obnavljanja.

3.7.2. Opseg ispitne koncentracije

Potrebne su najmanje tri ispitne koncentracije i kontrola sa čistom vodom (i kontrola sa prenosnikom, po potrebi). Minimalni diferencijal ispitne koncentracije između najviše i najniže vrijednosti treba da bude za oko jedan red veličine. Maksimalna separacija doze je 0,1 a minimalna 0,33.

4. POSTUPAK

4.1. Početak i sprovođenje ispitivanja

0. dan

Izlaganje treba da se započne kada postoji dovoljan broj punoglavaca u matičnoj populaciji prije izlaganja koji su dostigli 51. stadijum, u skladu sa Nievkop i Faber Tabelom 8 i koji su stari 17 dana ili manje nakon oplodnje. Za odair ispitnih životinja, zdravi punoglavci normalnog izgleda iz matične populacije objedinjuju se u jednu posudu koja sadrži odgovarajuću količinu vode za razreĐivanje. Za utvrĐivanje faze razvoja, punoglavci treba pojedinačno da se uklone iz posude za sakupljanje uz pomoć male mreže ili cjediljke i da se prenesu u providnu posudu za mjerenje (npr. petrijeva posuda od 100mm) koja sadrži vodu za razrjeĐivanje. Za utvrĐivanje faze, poželjno je izbjeći anesteziju, međutiim punoglavcima se može pojedinačno dati anestezija uz pomoć 100 mg/l trikain metansulfonata (npr. MS222), koji je puferovan na odgovarajući način natrijum bikarbonatom (pH vrijednost 7,0) prije rukovanja. Kada se koristi anestezija, iz iskusnih labaratorija potrebno je dobiti metodologiju za adekvatno korišćenje anestezije npr. MS-222 i o istima izvijestiti zajedno sa rezultatima studije. Životinjama treba pažljivo rukovati prilikom transfera kako bi se stres usljed rukovanja smanjio na minimum i izbjegle povrede.

Stadijum razvoja životinja utvrđuje se uz pomoć binokularnog mikroskopa za seciranje. Kako bi se smanjila krajnja promjenljivost u stadijumu razvoja, važno je da se stadijum odredi što preciznije. U skladu sa Nievkop and Faber tabelom (8), primarni znak razvoja za izbor 51. stadijuma kod organizama je morfologija zadnjih udova. Morfološke karakteristike zadnjih udova treba da se analiziraju pod mikroskopom. Iako je potrebno koristiti cjelokupan vodič Nievkop i Faber (8) radi sveobuhvatnih informacija o odreĐivanju stadijuma razvoja punoglavaca, stadijum se pouzdano može utvrditi kroz istaknute morfološke karakteristike. Tabela koja slijedi može se koristiti za pojednostavljivanje i standardizovanje procesa određivanja stadijuma razvoja tokom studije kroz identifikovanje tih istaknutih morfoloških karakteristika povezanih sa različitim stadijumima razvoja, pod pretpostavkom da je razvoj normalan.

<u>Tabela 2:</u> Istaknute morfološke karakteristike stadijuma razvoja na osnovu smjernica Nevkop i Faber

Istaknute morfološke karakteristike	Stadijum razvoja															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Zadnji udovi	X	X	X	X	X	X	X									
Prednji udovi						X	X	X	X	X						
Kraniofacijalna struktura										X	X	X	X			
Morfologija olfaktornog nerva											X	X	X			
Dužina repa													X	X	X	X

Da bi se započelo sa ispitivanjem, svi punoglavci treba da budu u 51. stadijumu. Najistaknutije morfološko obilježje tog stadijuma je morfologija zadnjih udova, kao što je prikazano na slici 1.

Slika 1:Morfologija zadnjih udova punoglavca X. laevis u 51. stadijumu razvoja

Pored izbora stadijuma razvoja, može se koristi opcionalni izbor veličine životinja za ispitivanje. U tom cilju, dužinu cijelog tijela (ne dužinu od vrha nosa do kloake) je potrebno izmjeriti 0. dana zbog poduzorka kod približno 20 NF punoglavaca u 51. stadijumu razvoja. Nakon izračunavanja srednje dužine cijelog tijela za ovu grupu životinja, mogu se odrediti minimalna i maksimalna ograničenja za dužinu cijelog tijela životinja za ispitivanje kroz omogućavanje opsega srednje vrijednosti od ± 3 mm (srednje vrijednosti dužine cijelog tijela kreću se od 24,0 do 28,1 mm kod punoglavaca u 51. stadijumu). Međutiim, određivanje stadijuma razvoja primarni je parametar kod utvrĐivanja spremnosti svake ispitne životinje.

Punoglavci kod kojih su izražene jasno vidljive deformacije ili povrede treba isključiti iz ispitivanja.

Punoglavci koji ispunjavaju kriterijume stadijuma razvoja koji su opisani u gornjem dijelu teksta čuvaju se u posudi sa čistom vodom za kulturu dok se ne završi postupak određivanja stadijuma razvoja. Kada se ovaj postupak završi, larve se nasumično raspoređuju u akvarijume za izlaganje dok se svaki akvarijum ne popuni sa 20 larvi. Nakon toga, svaki akvarijum se provjerava u pogledu životinja deformisanog izgleda (npr. povrede, nepravilan način plivanja, itd.). Punoglavci koji očigledno nisu zdravi treba da se uklone iz posuda za tretiranje i zamijene novim larvama iz posude za sakupljanje.

4.2. Zapažanja

Za detaljnije informacije o pokolonama završetka ispitivanja i obrade punoglavaca pogledati Smjernice OECD o histologiji štitne žlijezde vodozemaca (9).

4.2.1. Mjerenja 7. dana

Pet nasumično odabranih punoglavaca iz svakog ponavljanja uklanjaju se iz svake ispitne posude 7. dana. Nasumičnim postupkom koji se koristi treba svakom organizmu u ispitivanju da se omogući jednaka vjerovatnoća da bude odabran. Ovo se može postići korišćenjem bilo koje nasumične metode ali je potrebno da svaki punoglavac bude umrežen. Punoglavci koji nisu odabrani vraćaju se u posudu iz koje su uzeti i odabrani punoglavci se humano ubijaju sa 150 do 200 mg/l npr. MG-222, koji je na adekvatan način puferovan natrijum bikarbonatom kako bi se postigla pH vrijednost 7,0. Mrtvi punoglavci se ispiraju u vodi i suše, nakon čega se utvrđuje njihova težina do najbližeg miligrama. Dužina zadnjih udova, dužina od vrha nosa do kloake i stadijum razvoja (uz pomoć binokularnog mikroskopa za seciranje) utvrĐuju se za svakog punoglavca.

4.2.2. *Mjerenja 21. dana (završetak ispitivanja*)

Po završetku ispitivanja (21. dan) preostali punoglavci uklanjaju se iz ispitnih posuda i vrši se njihova eutanazija u 150 do 200 mg/l npr. MS-222, puferovanog na odgovarajući način natrijum bikarbonatom, kao što je gore navedeno. Punoglavci se ispiraju u vodi i suše nakon čega slijedi utvrĐivanje njihove težine do najbližeg miligrama. Stadijum razvoja, dužina od vrha nosa do kloake i dužina zadnjih udova mjere se za svakog punoglavca.

Sve larve se stavljaju u Davidsonov fiksativ tokom 48 ili 72 sata, kao uzorci cijelih tijela ili odrezani uzorci tkiva koji sadrže donju vilicu za potrebe histoloških procjena. Za histopatologiju, ukupno pet punoglavaca treba da se uzorkuje iz svake posude koja

predstavlja ponavljanje. S obzirom da visina folikularnih ćelija zavisi od stadijuma (10), najadekvatniji pristup uzimanja uzorka za histološke analize je da se koriste jedinke čiji se stadijumi podudaraju, kada je moguće. U cilju izbora pojedinki čiji se stadijumi podudaraju, potrebno je odrediti stadijume za sve larve prije izbora i naknadne obrade u cilju sakupljanja i čuvanja podataka. Ovo je neophodno jer će normalno odstepene u razvoju dovesti do različite raspodjele stadijuma u okviru svake ispitne posude.

Životinje odabrane za histopatologiju (n= 5 iz svakog ponavljanja) treba da se povežu sa srednjim stadijumom kontrolnih grupa (grupnih ponavljanja) kada je moguće. Ukoliko postoje posude za ispitivanja koja se ponavljaju, a koja sadrže više od pet larvi u odgovarajućem stadijumu, u tom slučaju se nasumično bira pet larvi.

Ukoliko postoje posude za ispitivanja koja se ponavljaju koja sadrže manje od pet larvi u odgovarajućem stadijumu, nasumično odabrane jedinke iz prvog prethodnog ili sljedećeg stadijuma razvoja uzimaju se kao uzorci da bi se dostigla ukupna veličina uzorka od pet larvi po ponavljanju. Poželjno je da se odluka za uzimanjem uzorka dodatne larve ili iz prethodnog ili sljedećeg stadijuma zasniva na sveukupnoj procjeni raspodjele stadijuma u kontrolnim i hemijskim tretmanima. To znači da, ako je hemijski tretman povezan sa usporenim razvojem, onda se uzorkuju dodatne larve iz prvog prethodnog stadijuma razvoja. Sa druge strane, ukoliko je hemikalija povezana sa ubrzavanjem razvoja, dodatne larve se uzorkuju iz sljedećeg stadijuma razvoja.

U slučaju ozbiljnih promjena razvoja punoglavaca usljed tretmana ispitnom hemikalijom, možda neće doći do poklapanja raspodjele stadijuma razvoja u hemijskim tretmanima sa izračunatim kontrolnim srednjim stadijumom razvoja Samo u tim slučajevima, proces selekcije treba da se izmijeni kroz korišćenje stadijuma koji se razlikuje od kontrolnog srednjeg stadijuma razvoja kako bi se postiglo uzimanje uzoraka larvi čiji se stadijumi razvoja poklapaju za potrebe histopatologije štitne žlijezde. Uz to, ukoliko se stadijumi ne mogu utvrditi (asinhronija), nasumično se uzima 5 punoglavaca iz svakog ponavljanja za histološku analizu. Potrebno je evidentirati obrazloženje osnovnog uzorkovanja bilo koje larve koja nije u stadijumu razvoja koji je jednak kontrolnom srednjem stadijumu razvoja.

Utvrđivanje bioloških parametara praćenja

Tokom faze izlaganja u trajanju od 21 dan, mjerenje primarnih parametara praćenja obavlja se 7 i 21 dana, ali je potrebno životinje svakodnevno posmatrati. U tabeli 3 prikazan je pregled mjerenja parametara praćenja i poklapajućih vremenskih tački posmatranja. Detaljnije infomacije za tehničke postupke mjerenja apikalnih parametara praćenja i histoloških procjena na rapolaganju su u smjernicama OECD (9).

Tabela 3: Vremenske tačke posmatranja za primarne parametre praćenja kod AMA

Apikalni parametri praćenja	Svakodevno	7. dan	21. dan
Smrtnost	•		
Faza razvoja		•	•
Dužina zadnjih udova		•	•
Dužina od vrha nosa do kloake		•	•
Težina mokrog tijela		•	•
Histologija štitne žlijezde			•

4.3. Apikalni parametri praćenja

Stadijum razvoja, dužina zadnjih udova, dužina od vrha nosa do kloake i masa mokre jedinke su apikalni parametri praćenja AMA i svaki je u daljem tekstu kratko opisan. Detaljnije tehničke informacije za sakupljanje ovih podataka su na rapolaganju u navedenim smjernicama, uključujući postupke za kompjuterske analize čija se upotreba preporučuje.

Stadijum razvoja

Stadijum razvoja punoglavaca X. laevis utvrđuje se primjenom kriterijuma za stadijume Nevkop i Faber (8). Podaci o stadijumu razvoja koriste se za utvrĐivanje ubrzanog, asinhronog, usporenog ili neometanog razvoja. Ubrzani ili usporeni razvoj utvrđuje se poređenjem sa srednjim stadijumom koji su postigle kontrolne i tretirane grupe. Asinhroni razvoj bilježi se kada ispitno tkivo nije deformisano niti abnormalo, ali je relativno vrijeme morfogeneze ili razvoja raznog tkiva poremećeno kod jednog punoglavca.

4.3.1. Dužina zadnjih udova

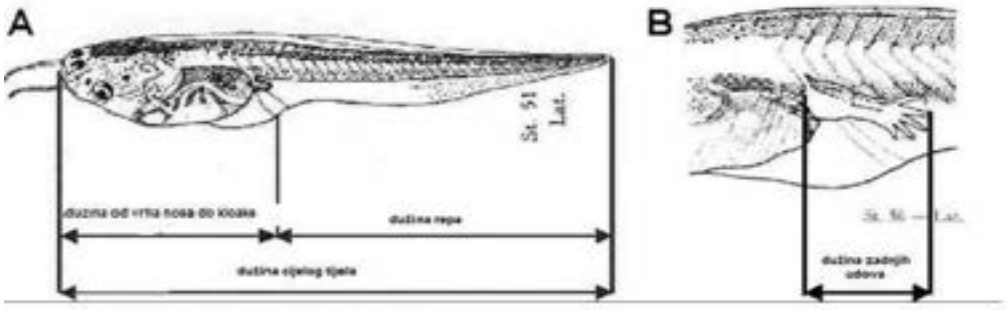
Diferencijacijom i rastom zadnjih udova upravljaju hormoni štitne žlijezde i predstavljaju važno obilježje razvoja koje se već koristi za utvrĐivaje stadijuma razvoja. Razvoj zadnjih udova koristi se kvalitativno za utvrĐivanje stadijuma razvoja ali se ovdje posmatra kao kvantitivan parametar praćenja. Dakle, dužina zadnjih udova se mjeri kao parametar praćenja u cilju otkrivanja uticaja ose štitne žlijezde (Slika 2). Radi dosljednosti, dužina zadnjih udova mjeri se na lijevom zadnjem udu. Dužina zadnjih udova se procjenjuje 7. i 21. dana ispitivanja. Mjerenje zadnjih udova 7. dana je jednostavno, kao što je prikazano na Slici 2. Međutiim, mjerenje zadnjih udova 21. dana komplikovanije je usljed pregiba udova. Stoga, mjerenje dužine zadnjih udova 21. dana obavlja se od ivice tijela i prati srednju liniju uda preko svih pregiba. Promjene kod dužine zadnjih udova 7. dana, čak iako nisu očigledna 21. dana i dalje se smatraju značajnim u pogledu potencijalne aktivnosti štitne žlijezde. Mjerenja dužine dobijaju se sa digitalnih fotografija uz pomoć softvera za analizu slike kao što je opisano u Smjernici OECD o histologiji štitne žlijezde vodozemaca (9).

4.3.2. Dužina tijela i masa mokre jedinke

UtvrĐivanje dužine od vrha nosa do kloake (Slika 2) i masa mokre jedinke uključuju se u ispitni protokol radi procjene potencijalnih efekata ispitne hemikalije na brzinu razvoja punoglavaca u poreĐenju sa kontrolnim grupama i korisni su kod otkrivanja opšte toksičnosti na ispitnu hemikaliju. S obzirom da uklanjanje preostale vode za određivanje mase može uzrokovati stresne uslove za punoglavce, kao i oštećenje kože, ta mjerenja se obavljaju 7. dana kod punoglavaca kao poduzoraka, a kod svih ostalih punoglavaca po završetku ispitivanja (21. dana). U cilju dosljednosti, kao granica mjerenja repa koristi se kranijalni aspekat otvora kloake.

Na slici 2 je prikazana dužina od vrha nosa do kloake koja se koristi za procjenu rasta punoglavaca.

Slika 2: (A) Vrste mjerenja dužine tijela i (B) Mjerenja dužine zadnjih udova za punoglavce X. laevis (1)



4.4. Histologija štitne žlijezde

Iako su faza razvoja i dužina zadnjih udova važni parametri praćenja za procjenu promjena u metamorfološkom razvoju povezanih sa izlaganjem, zaostatak u razvoju, sam po sebi, ne može se smatrati dijagnostičkim indikatorom negativne antitiroidne aktivnosti. Neke promjene se mogu uočiti samo rutinskom histopatološkom analizom. Dijagnostički kriterijumi uključuju hipertrofiju/atrofiju štitne žlijezde, hipertrofiju follikularnih ćelija, hiperplaziju folikularnih ćelija i kao dodatne kvalitativne kriterijume: oblast folikularnog lumena, koloidni kvalitet i veličina/oblik folikularnih ćelija. Ocjene nivoa jačine (4 nivoa) treba da se zabilježe. Informacije o dobijanju i obradi uzoraka za histološku analizu i obavljanje histoloških analiza na uzorcima tkiva dostupne su u dokumentima „Ispitivanje metamorfoze vodozemaca: 1. dio- Tehničke smjernice za morfološko uzorkovanje i histološku pripremu— i „Ispitivanje metamorfoze vodozemaca: 2. dio – Pristup upoznavanju sa studijama, dijagnostičkim kriterijumima, nivoima jačine i atlasu— (9). Labaratorije koje po prvi put sprovode ispitivanja treba da traže savjete iskusnih patologa radi obuke prije sprovođenja histološke analize i ocjene štitne žlijezde. Očigledne i značajne promjene apikalnih krajnih ishoda koji ukazuju na ubrzani ili usporeni razvoj ili asinhroniju mogu isključiti potrebu za obavljanjem histopatološke analize štitnih žlijezda. Međutiim, u odsustvu očiglednih morfoloških promjena ili dokaza o usporenom razvoju potrebna je histološka analiza.

4.5. Smrtnost

Svakodnevno treba provjeravati da li ispitne posude sadrže mrtve punoglavce i zabilježiti broj u svakoj posudi. Datum, koncentracija i broj posude treba da se zabilježe za svaki slučaj zapažene smrtnosti. Mrtve životinje treba što prije da se uklone iz ispitnih posuda. Stopa smrtnosti koja je veća od 10% može da ukaže na neodgovarajuće ispitne uslove ili toksične efekte ispitne hemikalije.

4.6. Dodatna zapažanja

Slučajevi neobičnog ponašanja i jasno vidljivih deformacija i lezija treba da se zabilježe. TakoĐe treba da se zabilježe datum, koncentracija i broj posude za svako zapaženo neobičnog ponašanje, veće deformacije i lezije. Normalno ponašanje karakteriše rep punoglavaca koji je izdignut iznad glave prilikom plutanja u vodenom stubu, redovno ritmično podnosanje repa, povremeno izranjanje, operkulacija i reakcija na stimulans. Neobično ponašanje uključuje, na primjer plutanje na površini vode, boravak na dnu posude, obrnuto ili nepravilno plivanje, nedostatak izranjanja i nedostatak reakcije na stimulans. Pored toga, treba da se zabilježe značajne razlike u potrošnji hrane između tretmana. Veće deformacije i lezije mogu da uključe morfološke anomalije (npr. deformacije udova), lezije koje krvare, bakterijske ili gljivične infekcije predstavlljaju samo neke od primjera. Ova utvrĐivanja su kvalitativne prirode i treba da se smatraju srodnim kliničkim znacima bolesti/stresa i da se uporede sa životinjama iz kontrolne grupe. Ukoliko su ove pojave ili

stope ovih pojava veće kod izloženih jedinki nego u kontrolnim grupama, oni treba da se smatraju dokazima očigledne toksičnosti.

5. PODACI I IZVJEŠTAVANJE

5.1. Sakupljanje podataka

Svi podaci treba da se sakupe uz pomoć elektronskih ili ručnih sistema koji su u skladu sa dobrim labaratorijskim praksama (GLP).

5.1.1. Ispitna hemikalija:

- Opis ispitne hemikalije: fizičko-hemijska svojstva; informacije o stabilnosti i biorazgradivosti;
- Hemijske informacije i podaci: način i učestalost pripreme rastvora. Informacije o ispitnoj hemikaliji uključuju stvarne i nominalne koncentracije ispitne hemikalije i u nekim slučajevima, nepolaznu hemikaliju gdje je moguće. Mjerenja ispitne hemikalije mogu biti potrebna za osnovne rastvore kao i za ispitne rastvore;
- Rastvor (ako nije voda); obrazloženje izbora rastvora i opis rastvora (priroda, korišćene koncentracije);

5.1.2. Ispitni uslovi

- Radna evidencija: sastoji se iz zapažanja funkcionisanja sistema i pratećeg očvrstenja i infrastrukture. Uobičajena evidencija uključuje: temperaturu očvrstenja, ispitnu temperaturu, fotoperiod, status ključnih komponenti sistema izlaganja (npr. pumpe, brojači ciklusa, pritisci), stope protoka, nivoi vode, promjene zaliha u bocama i evidenciju o hranjenju. Opšti parametri kvaliteta vode uključuju: pH vrijednost, DO, provodljivost, ukupan jod, alkalnost i tvrdoću;
- Odstepena od ispitne metode: ove informacije treba da uključe sve informacije ili tekstualni opis odstepena od ispitne metode.

5.1.3. Rezultati:

- Biološka zapažanja i podaci: oni uključuju svakodnevno posmatranje smrtnosti, potrošnju hrane, neobično plivanje, letargiju, gubitak ravnoteže, deformacije, lezije, itd. Zapažanja i podaci sakupljeni u unaprijed određenim intervalima uključuju: stadijum razvoja, dužinu zadnjih udova, dužinu od vrha nosa do kloake i masu mokre životinje;
- Tehnike statističke analize i obrazloženje odabranih tehnika; rezultati statističke analize po mogućnosti u tabelarnom obliku;
- Histološki podaci: oni uključuju opis, kao i nivo jačine i ocjene konkretnih zapažanja, kao što je opisano u histopatološkim smjernicama;
- Ad hoc zapažanja: ova zapažanja treba da uključe opis studije koji se ne uklapa u prethodno opisane kategorije.

5.2. Izvještavanje o podacima

Aneks 2 sadrži obrazac za svakodnevno sakupljanje podataka koji se može koristiti kao smjernica za unos neobrađenih podataka i iizračunavanje statističkog sažetka. Uz to, tabele za izvještavanje su obezbijeđene i pogodne su za dostavljanje sažetaka o podacima koji se odnose na parametre praćenja. Tabele za izvještavanje o histološkim procjenama mogu se naći u Aneksu 2.

5.3. Kriterijumi učinkovitosti i prihvaljivost/validnost ispitivanja

Uopšteno, velika odstepena od ispitne metode će za rezultat imati neprihvatljive podatke za tumačenje ili izvještavanje. Stoga, kriterijumi koji slijede u tabeli 4 razvijeni su kao smjernice za utvrĐivanje kvaliteta ssprovedenog ispitivanja i opšte učinkovitosti kontrolnih organizama.

Tabela 4: Kriterijumi efikasnosti za AMA

Krtierijum	**Prihvatljive granice**
Ispitne koncentracije	Održavaju se na ≤ 20 % CV (varijabilnost izmjerene ispitne koncentracije) tokom trajanja ispitivanja od 21. dan
Smrtnost u kontrolnim grupama	≤ 10 % — smrtnost u bilo kom ponavljanju u kontrolnim grupama ne smije biti veća od 2 punoglavca
Najmanji srednji stadijum razvoja u kontrolnim grupama na kraju ispitivanja	57
Raspon stadijuma razvoja u kontrolnoj grupi	10. i 90. postotak raspodjele stadijuma razvoja ne treba da se razlikuje za više od 4 faze
Rastvoreni kiseonik (DO)	≥ 40 % zasićenosti kiseonika (23) (*)
pH vrijednost	pH vrijednost treba da se održava od 6,5 do 8,5. Razlike između ponavljanja ili tretmana ne treba da budu veće od 0,5.
Temperatura vode	22° ± 1 °C — razlike između ponavljanja ili tretmana ne treba da budu veće od 0,5.
Ispitne koncentracije bez očigledne toksičnosti	≥ 2
Učinkovitost ponavljanja	≤ 2 ponavljanja tokom trajanja ispitivanja mogu se poništiti
Posebni uslovi za korišćenje rastvora	Ukoliko se koristi rastvor prenosnik, treba da se koriste kontrola rastvora i kontrola čiste vode i rezultati zabilježe.
	Statistički značajne razlike između kontrolnih grupa sa rastvorom i kontrolnih grupa sa čistom vodom posebno se obraĐuju. Za više informacija, vidi nastav teksta.
Posebni uslovi za sistem statičkog obnavljanja	Reprezentativne hemijske analize prije i nakon obavljanja treba zabilježiti
	Nivo amonijaka treba izmjeriti neposredno prije obnavljanja
	Sve parametre kvaliteta vode navedeni u tabeli 1 Aneksa 1 treba izmjeriti neposredno prije obnavljanja
	Period obnavljanja ne treba da bude duži od 72 sata
	Odgovarajući raspored hranjenja (50% dnevne porcije hrane za punoglavce koja je dostupna na tržištu)
(*) Aeracija vode može da se održava uz pomoć aeratora. Preporučuje se da se aeratori podese na nivoe koji ne stvaraju prekodnosan stres na punoglavce.	

5.4. Validnost ispitivanja Kako bi ispitivanje bilo prihvatljivo/validno, potrebno je da se ispune sljedeći uslovi:

Validni eksperiment u ispitivanju za koji je utvrĐeno da nema efekat na aktivnost štitne žlijezde:

1) Za svaki tretman (uključujući kontrolne grupe), procenat smrtnosti ne smije da preĐe 10%. Za svako ponavljanje, smrtnost ne smije biti veća od tri punoglavca, u suprotnom se ponavljanje smatra kompromitovanim.
2) Za analizu su potrebna najmanje dva nivoa tretmana, sa sva četiri nekompromitovana ponavljanja.
3) (Za analizu su potrebna najmanje dva nivoa tretmana bez očigledne toksičnosti.

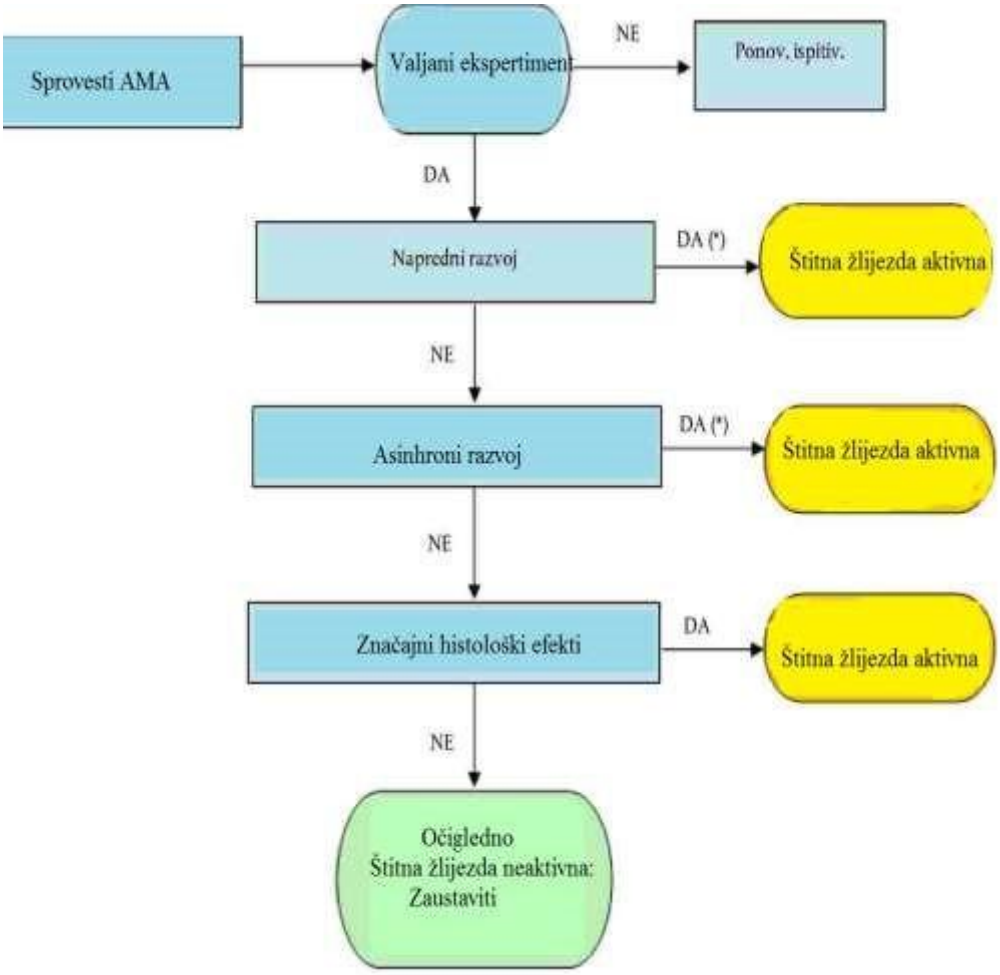
Validni eksperiment u ispitivanju za koji je utvrĐeno da ima efekat na aktivnost štitne žlijezde:

1) Može se javiti smrtnost od najviše dva punoglavca/ponavljanju u kontrolnoj grupi.

5.5. Logika donošenja odluka za sprovođenje AMA

Logika donošenja odluka razvijena je za AMA kako bi se pružila logička pomoć prilikom sprovođenja i tumačenja rezultata biološkog ispitivanja. Logika donošenja odluka, u suštini, odnosi se na odmjeravanje parametara praćenja u tom naprednom razvoju, gdje se asinhroni razvoj i histopatologija štitne žlijezde smatraju značajnijim dok se usporeni razvoj, dužina od vrha nosa do kloake i masa mokre jedinke, parametri na koje opšta toksičnost može da ima uticaj, smatraju manje značajnim.

Slika 3:Logika donošenja odluka za sprovoĐenje AMA



*

Histologiju mogu tražiti određeni regulatorni organi uprkos značajnim razlikama u naprednom i asinhronom razvoju. Subjekat koji sprovodi ovo ispitivanje ohrabruje se da konsultuje relevantne organe prije sprovođenja ispitivanja kako bi se utvrdilo koji parametri praćenja su potrebni.

5.5.1. Napredni razvoj (utvrĐen kroz stadijum razvoja, dužinu od nosa do kloake i dužinu zadnjih udova)

Poznato je da se napredni razvoj dogaĐa samo kroz efekte koji su povezani sa hormonima štitne žlijezde. To mogu biti efekti na periferno tkivo kao što je direktna interakcija sa receptorima hormona štitne žlijezde (kao što je T4) ili efekti koji mogu da izmijene nivoe cirkularnih hormona štitne žlijezde. Napredni razvoj se procjenjuje na jedan od dva načina. Prvi način je da se opšti stadijum razvoja može utvrditi kroz standardizovani pristup opisan u smjernicama Nievkopa i Fabera. Drugi način je mogućnost kvantitativnog određivanja konkretnih morfoloških karateristika, kao što je dužina zadnjih udova 7 i 21 dana, što se pozitivno povezuje sa agonističkim efektima na receptore hormona štitne žlijezde. Ukoliko se javi statistički značajan napred u razvoju ili dužini zadnjih udova, onda test ukazuje na to da hemikalija aktivno djeluje na štitnu žlijezdu.

Procjena ispitnih životinja u pogledu prisustva ubrzanog razvoja u odnosu na kontrolnu populaciju zasniva se na rezultatima statističkih analiza koje se sprovode za četiri parametra praćenja:

- dužina zadnjih udova (utvrĐena kroz dužinu od nosa do kloake) 7. dana studije
- dužina zadnjih udova (utvrĐena kroz dužinu od nosa do kloake) 21. dana studije
- stadijum razvoja 7 dana studije
- stadijum razvoja 21 dana studije

Statističke analize dužine zadnjih udova treba ssprovesti na osnovu mjerenja dužine lijevog zadnjeg uda. Dužina zadnjih udova utvrđuje se kroz utvrĐivanje proporcije dužine zadnjih udova i dužine od vrha nosa do kloake jedinke. Zatim se za svaki nivo tretmana upoređuje prosjek utvrĐenih vrijednosti. Na ubrzani razvoj ukazuje značajno povećanje prosječne dužine zadnjih udova (utvĐene) u grupi koja je tretirana hemikalijom u odnosu na kontrolnu grupu 7. dana studije i/ili 21. dana studije.

Statističke analize stadijuma razvoja treba sprovoditi na osnovu utvrĐivanja stadijuma razvoja u skaldu sa morfološkim kriterijumima opisanim u smjernicama Nievkop i Faber (8). Na ubrzani razvoj se ukazuje kada višekvantalna analiza otkrije značajno povećanje vrijednosti stadijuma razvoja u grupi koja je tretirana hemikalijama u odnosu na kontrolnu grupu 7. dana studije i/ili 21. dana studije.

Kod metode ispitivanja AMA, značajan uticaj na bilo koji od četiri gore pomenuta parametra praćenja smatra se dovoljnim za pozitivno otkrivanje ubrzanog razvoja. To znači da za značajan uticaj na dužinu zadnjih udova u određenom trenutku nije potrebna potvrda značajnog uticaja na dužinu zadnjih udova u nekom drugom trenutku, niti značajan uticaj na stadijum razvoja u određenom trenutku. Na osnovu toga, za značajan uticaj na stadijum razvoja u određenom trenutku nije potrebna potvrda značajnih uticaja na stadijum razvoja u nekom drugom trenutku, niti značajan uticaj na dužinu zadnjih udova u određenom trenutku. Težina dokaza za ubrzani razvoj će se uprkos tome povećati ukoliko se za više od jednog parametra praćenja utvrde značajni uticaji.

5.5.2. Asinhroni razvoj (utvrĐen kroz kriterijume stadijuma razvoja)

Asinhroni razvoj karakteriše poremećaj relativnog vremena morfogeneze ili razvoj različitih tkiva kod jedog punoglavca. Nemogućnost jasnog utvrĐivanja stadijuma razvoja organizma uz pomoć niza morfoloških parametara praćenja koji se smatraju tipičnim za svaki stadijum ukazuje na to da se tkivo asinhrono razvija kroz metamorfozu. Asinhroni razvoj je indikator aktivnosti štitne žlijezde. Jedini poznati načini djelovanja koji uzrokuju asinhroni razvoj je kroz uticaj hemikalija na aktivnosti perifernog hormona štitne žlijezde i/ili metabolizma hormona štitne žlijezde kod razvoja tkiva kao što je primijećeno kod inhibitora dejodinaze. Procjena ispitnih životinja u pogledu prisustva asinhronog razvoja u odnosu na kontrolnu populaciju zasniva se na mahromorfološkoj procjeni ispitnih životinja 7 i 21 dana studije. Opis normalnog razvoja vrste Xenopus laevis koji su prikazali Nievkop i Faber (8) predstavlja okvir za identifikaciju numeričkog redosljeda preoblikovanja normalnog tkiva. Izraz „asinhroni razvoj— odnosi se konkretno na ona odstepena u mahromorfološkom razvoju punoglavaca koja onemogućavaju konačno utvrĐivanje stadijuma razvoja u skladu sa kriterijumima koje su prikazali Nievkop i Faber (8) jer ključna morfološka obilježja ukazuju na karakteriske različitih stadijuma.

Kao što ukazuje izraz „asinhroni razvoj—, potrebno je razmotriti samo slučajeve koji ukazuju na odstepena u procesu preoblikovanja određenih tkiva u odnosu na napred preoblikovanja drugih tkiva . Neki klasični fenotipovi uključuju kašnjenje ili odsustvo pojavljivanja prednjeg uda uprkos normalnom ili naprednom razvoju zadnjih udova i tkiva repa, ili preranu resorpciju škrga u odnosu na stadijum morfogeneze zadnjih udova i resorpciju repa. Zabilježiće se da životinja pokazuje asinhroni razvoj ako se ne može pripisati određenom stadijumu jer ne ispunjava većinu obilježja kriterijuma razvoja za određeni stadijum iz opisa Nievkop i Faber ili ako postoji značajno kašnjenje ili ubrzanje jedne ili više ključnih karateristika (npr. rep u potpunosti resorbovan, ali se prednji udovi nisu pojavili). Ova procjena se vrši kvalitativno i potrebno je analizirati cijeli niz obilježja navedenih u opisu Nievkop and Faber. Međutiim, nije potrebno da se evidentiraju stadijumi razvoja različitih obilježja životinja koje se posmatraju. Životinje za koje je pokazan asinhroni razvoj ne svrstavaju se u stadijume razvoja u skladu sa opisom Nievkop i Faber.

Stoga, centralni kriterijum za određivanje slučajeva poremećenog morfološkog razvoja kao „asinhronog razvoja— je da je relativno vrijeme preoblikovanja tkiva i morfogeneze tkiva poremećeno dok morfologija zahvaćenog tkiva nije očigledno poremećena. Jedan primjer kojim se može prikazati ovo tumačenje mahromorfoloških poremećaja je da usporena morfogeneza zadnjeg uda u odnosu na razvoj ostalih tkiva ispunjava kriterijum „asinhronog razvoja— dok se slučajevi nedostatka zadnjeg uda, poremećenih brojki (npr. ektrodaktilija, polidaktilija) ili drugih očiglednih deformacija udova ne smatraju „asinhronim razvojem—.

U tom kontekstu, veća morfološka obilježja koja treba da se procijene u pogledu njihovog iskoordiniranog metamorfološkog napretka treba da uključe morfogenezu zadnjih udova, morfogenezu prednjih udova, pojavljivanje prednjih udova, stadijum resoprcije repa
(posebno resorpcije repnog peraja) i morfologiju glave (npr. veličina škrga i stadijum resorpcije škrga, morfologija donje vilice, pojavljivanje Mekelove hrskavice).
U zavisnosti od hemijskog načina djelovanja, može doći do različitih mahromorfoloških fenotipa. Neki klasični fenotipi uključuju usporenost ili odsustvo pojavljivanja prednjeg uda uprkos normalnom ili ubrzanom razvoju zadnjih udova i tkiva repa i preuranjenu resorpciju škrga u odnosu na preoblikovanje zadnjih udova i repa.

5.5.3. <u>Histopatologija</u>

Ako hemikalija ne uzrokuje očiglednu toksičnost i ne ubrzava razvoj ili uzrokuje asinhroni razvoj, histopatologija štitne žlijezde procjenjuje se uz pomoć odgovarajućih smjernica (9).

Zaostali razvoj, u odsustvu toksičnosti, je snažan indikator anti-tiroidne aktivnosti, ali analiza faze razvoja je manje osjetljiva i manje dijagnostična u odnosu na histopatološku analizu štitne žlijezde. Stoga, u ovom slučaju potrebno je sprovođenje histopatološke analize štitne žlijezde. Uticaji na histologiju štitne žlijezde događaju se u odsustvu razvojnih učinaka. Ukoliko se dogode promjene u histopatologiji štitne žlijezde, smatra se da hemikalija utiče na štitnu žlijezdu. Ukoliko se ne jave kašnjenja u razvoju niti histološke lezije štitne žlijezde smatra se da hemikalija ne utiče na štitnu žlijezdu. Obrazloženje ove odluke je da na štitnu žlijezdu utiče TSH i svaka hemikalija kojom se mijenja cirkularni hormon štitne žlijezde u dovojnoj mjeri da mijenja stvaranje TSH za rezultat će imati histopatološke promjene štitne žlijezde. Razni načini i mehanizmi djelovanja mogu uticati na promjenu cirkularnog hormona štitne žlijezde. Dakle, dok nivoi hormona štitne žlijezde ukazuju na efekte povezane sa štitnom žlijezdom, to nije dovoljno da bi se utvrdilo koji je način ili mehanizam djelovanja povezan sa reakcijom.

S obzirom na to da ovaj parametar praćenja nije odgovarajući za osnovne statističke pristupe, utvrđivanje učinka povezanog sa izloženošću hemikalije vrši se kroz stručno mišljenje patologa.

5.5.4. Usporeni razvoj (utvrđen kroz fazu razvoja HLL, BW, SVL)

Do usporenog razvoja može doći usljed antitiroidnih mehanizama i posrednu toksičnost. Blago usporeni razvoj zajedno sa očiglednim znacima toksičnosti vjerovatno ukazuje na efekte koji nisu konkretno uzrokovani toksičnošću. Procjena netiroidne toksičnosti je osnovni element ispitivanja kako bi se smanjila vjerovatnoća lažno pozitivnih rezultata. Pretjerana smrtnost je očigledan pokazatelj pojave drugih toksičnih mehanizama. Slično tome, blago smanjenje razvoja, utvrđeno kroz mjerenje mokre mase jedinke (BW) i/ili dužinu od vrha nosa do kloake (SVL), takođe ukazuju na netiroidnu toksičnost. Očigledna povećanja rasta se obično događaju kod hemikalija koje imaju negativan uticaj na normalan razvoj. Kao posledica toga, prisustvo većih životinja ne znači neophodno netiroidnu toksičnost. Međutiim, rast nikada ne treba da se zasniva na utvđenoj tiroidnoj toksičnosti. Umjesto toga, rast, zajedno sa fazom razvoja i tiroidnom histopatologijom treba da se koristi za utvrđivanje aktivnosti štitne žlijezde. Ostali parametri praćenja takođe treba da se uzmu u obzir prilikom utvrđivanja očigledne toksičnosti uključujući otoke, lezije koje krvare, letargiju, smanjenu potrošnju hrane, nepravilan/izmijenjen način plivanja, itd. Ukoliko sve ispitne koncentracije ukazuju na znake očigledne toksičnosti, ispitna hemikalija treba opet da se procijeni pri nižim ispitnim koncentracijama prije određivanja da li hemikalija aktivno utiče na štitnu žlijezdu.

Statistički značajan usporeni razvoj, kod odsustva drugih znaka očigledne toksičnosti, ukazuje na to da hemikalija aktivno utiče na štitnu žlijezdu (antagonistički). U odsustvu snažnog statističkog odgovora, ovaj ishod može da se potkrijepi rezultatima histopatologije štitne žlijezde.

5.6. Statističke analize

Poželjno je da statističke analize podataka prate postupke opisane u dokumentu pod nazivom „Postojeći pristupi u statističkoj analizi podataka o ekotoksičnosti: Smjernice za primjenu—. Za sve kontinuirane kvantitativne parametre praćenja (HLL, SVL, masa mokre jedinke) koji su dosljedni sa rekacijom na monotonu dozu, potrebno je primijeniti JonkerTerpstrin test na postupan način kako bi se utvrdili značajni efekti tretmana.

Za kontinuirane parametre praćenja koji su dosljedni sa reakcijom na monotonu dozu, podaci treba da se procijene u pogledu normaliteta (poželjno je korišćenje Šapiro-Vilkovog testa ili Anderson-Darlingovog (Anderson-Darling) testa) i homogenosti varijansi (poželjno je korišćenje Levenovog testa). Oba testa se vrše na ostacima iz ANOVA. Stručno mišljenje može se koristiti umjesto ovih formalnih testova kada je riječ o normalitetu i homogenosti varijansi, iako su poželjniji formalni testovi. Kada se utvrdi nedostatak normaliteta ili heterogenost varijansi, potrebno je pronaći tranformaciju za normalizaciju i stabilizaciju varijansi. Ukoliko se podaci (možda nakon transformacije) normalno raspoređuju homogenom varijansom, značajni uticaji tretmana određuju se kroz Danetov test. Ukoliko se podaci (možda nakon transformacije) normalno raspoređuju heterogenom varijasom, značajni efekti tretmana određuju se kroz test Tamhen-Danetov test (Tamhane-Dunnett) ili T3 test ili kroz Men-Vitni-Vilkoksonov (Mann-Whitney-Wilcoxon) U test. Kada se ne može pronaći transformacija za normalizaciju, značajni efekti tretmana utvrĐuju se kroz Men-VitniVilkoksonov U test korišćenjem Bonferoni-Holm (Bonferroni-Holm) prilagoĐavanja pvrijednostima. Danetov test primjenjuje se nezavisno od bilo kog ANOVA F-testa i MenVitnijev test primjenjuje se nezavisno od sveukupnog Kruskal-Valis (Kruskall-Wallis) testa.

Značajna smrtnost se ne očekuje ali treba da se procijeni Kohran-Armitidžovim (CochranArmitage) testom postupnog snižavanja kada su podaci u skladu sa reakcijom na monotonu dozu,a u suprotnom Fišerovim testom sa Bonferoni-Holmovim prilagoĐavanjima.

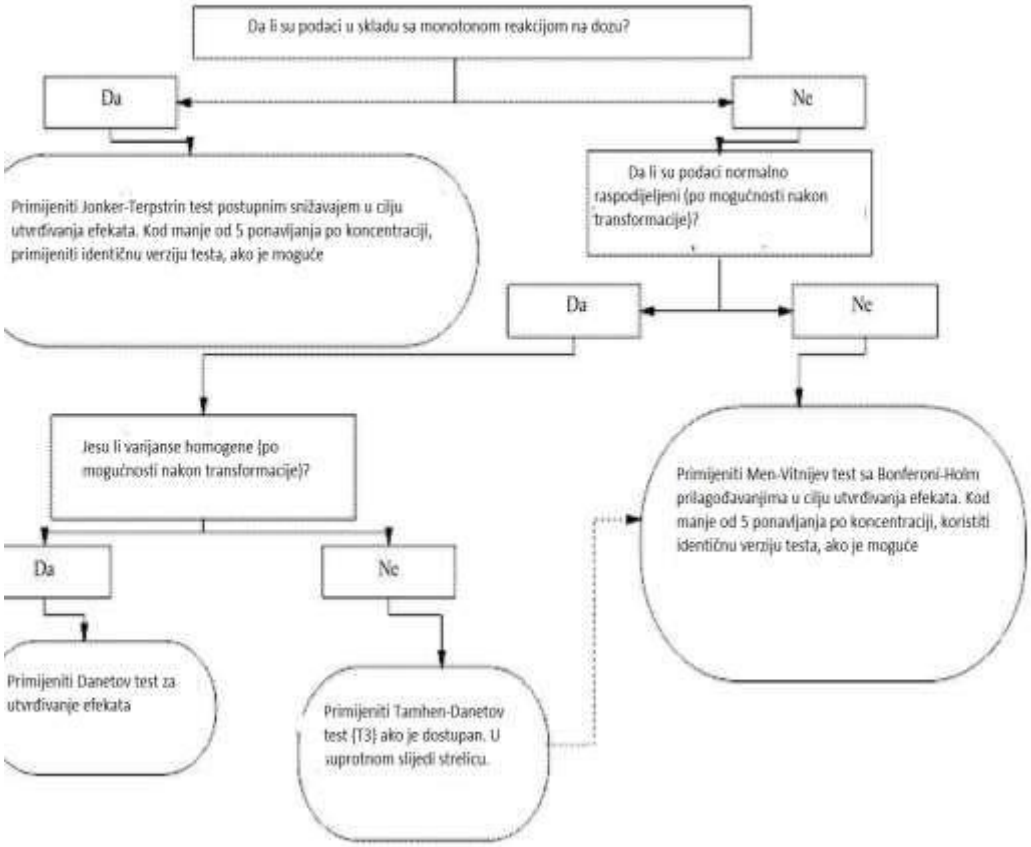
Značajan efekat tretmana za razvojni stadijum utvrđuje se primjenom postupnog snižavanja Jonker-Terpstrinim testom koji se primjenjuje na ponovljene srednje vrijednosti. Alternativno i poželjnije je korišćenje multikvantalnog Jonkerovog testa od 20 do 80 postotka za utvrĐivanje efekta jer se njime u obzir uzimaju promjene u profilu distribucije.

Odgovarajuća jedinica analize je ponavljanje tako da se podaci sastoje od ponovljenih srednjih vrijednosti ako se koristi Jonker-Terpstrin ili Men-Vitnijev U test ili ponovljenih srednjih vrijednosti ako se koristi Danetov test. Reakcija na monotoničnu dozu može se vizuelno procijeniti iz ponovljenih ili tretiranih prosjeka ili srednjih vrijednosti ili iz formalnih testova kao što je prethodno opisano (11). Sa manje od pet ponavljanja po tretmanu ili kontroli, potrebno je koristiti tačne permutacije Jonker-Terpstrinog ili Men-Vitnijevog testa. Statistički značaj svih navedenih testova se ocjenjuje na nivou značaja od 0,05.

Slika 4: predstavlja dijagram toka za obavljanje statističkih testova na kontinuiranim podacima.

Slika 4: Dijagram toka za statističke pristupe za podatke o kontinuiraim reakcijama

Dijagram toka kontinuiranog odgovora



5.7. Razmatranja analize posebnih podataka

5.7.1. Korišćenje kompromitovanih nivoa tretiranja

Nekoliko faktora se uzima u obzir prilikom određivanja da li jedno ponavljanje ili cijeli tretman ukazuju na očiglednu toksičnost i da li je potrebno njihovo uklanjanje iz analize. Očigledna toksičnost se definiše kao > 2 smrtnosti u svakom ponavljanju koje se može objasniti samo toksičnošću, a ne tehničkom greškom. Drugi znaci očigledne toksičnosti uključuju krvarenje, neuobičajeno ponašanje, poremećen način plivanja, anoreksiju i sve druge kliničke znake bolesti. Kada je riječ o znacima toksičnosti koji su gotovo smrtonosni, možda će biti potrebne kvalitativne procjene i uvijek ih je potrebno izvršiti u odnosu na kontrolnu grupu sa čistom vodom.

5.7.2. Kontrolne grupe sa rastvorom

Korišćenje rastvora treba da se uzme u obzir kao krajnji slučaj, kada su se razmotrili svi drugi načini uvođenja hemikalije. Ukoliko se koristi rastvor, paralelno sa tim je potrebno imati kontrolnu grupu sa čistom vodom. Nakon završetka ispitivanja, potrebno je izvršiti procjenu potencijalnih efekata rastvora. Ovo se obavlja kroz statističko poređenje kontrolne grupe sa rastvorom i kontrolne grupe sa čistom vodom. Najvažniji parametri praćenja za razmatranje u ovoj analizi su stadijum razvoja, dužina od vrha nosa do kloake i masa mokre životinje, jer na njih mogu uticati netiroidne toksičnosti. Ukoliko se kod ovih parametara praćenja otkriju statistički značajne razlike između kontrolne grupe sa čistom vodom i kontrolne grupe sa rastvorom, potrebno je odrediti parametre praćenja studije za mjere reakcije kroz kontrolnu grupu sa čistom vodom. Ukoliko ne postoje statistički značajne razlike između kontrolne grupe sa čistom vodom i kontrolne grupe sa rastvorom, potrebno je utvrditi parametri

praćenja studije za mjere reakcije kroz kontrolnu grupu sa vodom za razreĐivanje i kontrolnu grupu sa rastvorom.

5.7.3. Tretirane grupe koje postižu 60. stadijum razvoja i više

Nakon 60. stadijuma, punoglavci pokazuju smanjenje veličine i mase usljed resorpcije tkiva i smanjenja apsolutnog sadržaja vode. Dakle, mjerenja mokre mase i dužine od vrha nosa do kloake ne mogu se koristiti na odgovarajući način u statističkim analizama kako bi se odredila brzina razvoja. Iz tog razloga, potrebno je isključiti podatke o mokroj masi i dužini organizama > NF60 i oni se ne mogu koristiti u analizama ponavljanog prosjeka ili ponavljanih srednjih vrijednosti. Dva različita načina mogu se koristiti za analizu ovih parametara povezanih sa razvojem.

Jedan pristup je da se u obzir uzmu samo oni punoglavci koji su u nižem ili jednakom stadijumu razvoja u odnosu na 60. stadijum u svrhe statističke analize mokre mase i/ili dužine od vrha nosa do kloake. Vjeruje se da se ovim pristupom pružaju dovoljno pouzdani podaci o ozbiljnosti mogućih efekata na razvoj, dok god se iz analiza isključi samo mali dio ispitnih životinja ((≤ 20 %). Ukoliko povećan broj punoglavaca pokaže razvoj nakon 60 stadijuma ((≥ 20 %) u jednoj ili više nominalnih koncentracija, potrebno je ssprovesti dvofaktorski ANOVA sa uvrštenom strukturom varijansi za sve punoglavce kako bi se procijenili efekti razvoja usljed hemijskih tretmana, istovremeno uzimajući u obzir efekte kasnog stadijuma razvoja na rast. Aneks 3 sadrži smjernice o dvofaktorskoj analizi mase i dužine ANOVA.

Aneks 1

*Tabela 1:*Eksperimentalni uslovi za analizu metamorfoze vodozemaca u trajanju od 21 dan

Ispitna životinja	Larve *Xenopus laevis*	
Početna faza larve	51. stadijum Nievkop i Faber	
Period izlaganja	21 dan	
Kriterijumi izbora larve	Stadijum razvoja i ukupna dužina (po potrebi)	
Ispitne koncentracije	Najmanje 3 koncentracije u rasponu od približno jednog reda veličine	
Način izlaganja	Protok (poželjno) i/ili statičko obnavljanje	
Sistem za ispitivanje brzine protoka	25ml/min (potpuna zamjena zapremine približno svakih 2,7 sati)	
Primarni parametri praćenja /utvrĐivanje dana	Smrtnost	Svakodnevno
	Stadijum razvoja	7. i 21. D
	Dužina zadnjih udova	7. i 21. D
	Dužina od vrha nosa do kloake	7. i 21. D
	Masa mokre životinje	7. i 21. D
	Histologija štitne žlijezde	7. i 21. D
Voda za razreĐivanje/laboratorijaska kontrola	Voda iz vodovoda kojoj je uklonjen hlor (filtrirana aktivnim ugljenikom) ili ekvivalentan laboratorijaski izvor	
Gustina larvi	20 larvi/ispitna posuda (5/l)	

Ispitni rastvor /ispitna posuda		4-10 l (najmanje 10-15 cm vode)/ispitna posuda od stakla ili nerĐajući čelik (npr. 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)
Ponavljanje		četiri iste ispitne posude/ispitna koncentracija i kontrola
Prihvatljiva stopa smrtnosti u kontrolnim grupama		≤ 10 % po ispitnoj posudi-ponavljanju
Fiksacija štitne žlijezde	UtvrĐeni broj	Svi punoglavci (pet/ponavljanja se procjenjuju na početku)
	Dio tijela	Glava ili cijelo tijelo
	Tečnost za fiksiranje	Davidsonov fiksativ
Hranjenje	Hrana	Sera Micron® ili slično
	Količina/učestalost	V. tabelu 1 za režim ishrane korišćenjem Sera Micron®
Osvjetljenje	Fotoperiod	12 sati svijetla: 12 sati tame
	Intenzitet	600 do 2000 luksa (mjereno na površini vode)
Temperatura vode		22° ± 1 °C
PH vrijednost		6,5 — 8,5
Koncentracija rastvorenog kiseonika (DO)		> 3,5 mg/l (> 40 % zasićenosti kiseonikom)
Raspored uzorkovanja analitičke hemije		Jednom/nedjeljno (4 uzorka dogaĐaja/test)

Aneks 1

Tabela 1: Eksperimentalni uslovi za analizu metamorfoze vodozemaca u trajanju od 21 dan

Ispitna životinja	Larve *Xenopus laevis*	
Početna faza larve	51. stadijum Nievkop i Faber	
Period izlaganja	21 dan	
Kriterijumi izbora larve	Stadijum razvoja i ukupna dužina (po potrebi)	
Ispitne koncentracije	Najmanje 3 koncentracije u rasponu od približno jednog reda veličine	
Način izlaganja	Protok (poželjno) i/ili statičko obnavljanje	
Sistem za ispitivanje brzine protoka	25ml/min (potpuna zamjena zapremine približno svakih 2,7 sati)	
Primarni parametri praćenja /utvrĐivanje dana	Smrtnost	Svakodnevno
	Stadijum razvoja	7. i 21. D
	Dužina zadnjih udova	7. i 21. D
	Dužina od vrha nosa do kloake	7. i 21. D
	Masa mokre životinje	7. i 21. D
	Histologija štitne žlijezde	7. i 21. D
Voda za razreĐivanje/laboratorijaska kontrola	Voda iz vodovoda kojoj je uklonjen hlor (filtrirana aktivnim ugljenikom) ili ekvivalentan laboratorijaski izvor	
Gustina larvi	20 larvi/ispitna posuda (5/l)	
Ispitni rastvor /ispitna posuda	4-10 l (najmanje 10-15 cm vode)/ispitna posuda od stakla ili nerĐajući čelik (npr. 22,5	

		cm × 14 cm × 16,5 cm)
Ponavljanje		četiri iste ispitne posude/ispitna koncentracija i kontrola
Prihvatljiva stopa smrtnosti u kontrolnim grupama		≤ 10 % po ispitnoj posudi-ponavljanju
Fiksacija štitne žlijezde	UtvrĐeni broj	Svi punoglavci (pet/ponavljanja se procjenjuju na početku)
	Dio tijela	Glava ili cijelo tijelo
	Tečnost za fiksiranje	Davidsonov fiksativ
Hranjenje	Hrana	Sera Micron® ili slično
	Količina/učestalost	V. tabelu 1 za režim ishrane korišćenjem Sera Micron®
Osvjetljenje	Fotoperiod	12 sati svijetla: 12 sati tame
	Intenzitet	600 do 2000 luksa (mjereno na površini vode)
Temperatura vode		22° ± 1 °C
PH vrijednost		6,5 — 8,5
Koncentracija rastvorenog kiseonika (DO)		> 3,5 mg/l (> 40 % zasićenosti kiseonikom)
Raspored uzorkovanja analitičke hemije		Jednom/nedjeljno (4 uzorka dogaĐaja/test)

Aneks 2

Izvještajne tabele za neobraĐene podatke i sažete podatke

Tabela 1: Opšte informacije o ispitnoj hemikaliji

Informacije o hemikaliji			
	Unijeti informacije o hemikaliji, jedinicama koncentracije i tretmanima		
	Ispitna hemikalija:		
	Jedinice koncentracije:		
	Tretman 1		
	Tretman 2		
	Tretman 3		
	Tretman 4		
	Datum (0) dan		Unijeti datum (mm/dd/gg)

	Datum (7) dan		Unijeti datum (mm/dd/gg)
	Datum (21) dan		Unijeti datum (mm/dd/gg)

Tabela 2: Obrasci za sakupljanje neobraĐenih podataka za 7 i 21 dan

DAN X **DATUM 00/00/00**									
	Koncentracija	Broj tretmana	Broj ponavljan ja	Pojedinačni broj	Pojedina čni identifikator	Stadijum razvoja	Dužina od vrha nosa do kloake (mm)	Dužina zadnjih udova (mm)	Težina cijele mokre životinje
RED	TRT	#TRT	REP	IND	ID#	STADIJUM	BL	HLL	TEŽINA
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							
6	0,00	1							
7	0,00	1							
8	0,00	1							
9	0,00	1							
10	0,00	1							
11	0,00	1							
12	0,00	1							
13	0,00	1							
14	0,00	1							
15	0,00	1							
16	0,00	1							
17	0,00	1							
18	0,00	1							
19	0,00	1							
20	0,00	1							
21	0,00	2							
22	0,00	2							
23	0,00	2							
24	0,00	2							
25	0,00	2							
26	0,00	2							
27	0,00	2							
28	0,00	2							
29	0,00	2							
30	0,00	2							
31	0,00	2							

32	0,00	2							
33	0,00	2							
34	0,00	2							
35	0,00	2							
36	0,00	2							
37	0,00	2							
38	0,00	2							
39	0,00	2							
40	0,00	2							
41	0,00	3							
42	0,00	3							
43	0,00	3							
44	0,00	3							
45	0,00	3							
46	0,00	3							
47	0,00	3							
48	0,00	3							
49	0,00	3							
50	0,00	3							
51	0,00	3							
52	0,00	3							
53	0,00	3							
54	0,00	3							
55	0,00	3							
56	0,00	3							
57	0,00	3							
58	0,00	3							
59	0,00	3							
60	0,00	3							
61	0,00	4							
62	0,00	4							
63	0,00	4							
64	0,00	4							
65	0,00	4							
66	0,00	4							
67	0,00	4							
68	0,00	4							
69	0,00	4							
70	0,00	4							
71	0,00	4							
72	0,00	4							
73	0,00	4							
74	0,00	4							
75	0,00	4							
76	0,00	4							
77	0,00	4							
78	0,00	4							
79	0,00	4							

80	0,00	4							

Tabela 3: Izračunati saželi za podatke o parametrima praćenja iz 7 i 21 dana

		Faza razvoja			Dužina od vrha nosa do kloake (mm)		Dužina zadnjih udova (mm)		Masa (mg)	
TRT	REP	MIN	SREDNJE	MAX	PROSJEK	STANDARDNO ODSTUPANJE	PROSJEK	STANDARDNO ODSTUPANJE	PROSJEK	STANDARDNO ODSTUPANJE
1	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Napomena: Kalkulacije polja povezane su sa unosima podataka u Tabeli 2.

Tabela 4: Podaci o dnevnoj smrtnosti

Dan ispitivanja	Datum	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																
1	#Value!																
2	#Value!																
3	#Value!																
4	#Value!																
5	#Value!																
6	#Value!																
7	#Value!																
8	#Value!																
9	#Value!																
10	#Value!																
11	#Value!																
12	#Value!																
13	#Value!																
14	#Value!																
15	#Value!																
16	#Value!																
17	#Value!																
18	#Value!																
19	#Value!																
20	#Value!																
21	#Value!																
Broj ponavljanja		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Broj tretmana		0				0				0				0			

Napomena: Kalkulacije polja povezane su sa unosima podataka u Tabeli 1.

Tabela 5: Kriterijumi kvaliteta vode

Sistem izlaganja (protok/statičko obnavljanje):
Temperatura:
Jačina osvjetljenja:
Ciklus svijetla i mraka:
Hrana:
Režim ishrane:
pH vrijednost vode:
Koncentracija joda u ispitnoj vodi:

Tabela 6: Sažeti hemijski podaci

Naziv hemikalije:																					
Broj CAS:																					
Dan ispitivanja	Datum	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																				
1	#Value!																				
2	#Value!																				
3	#Value!																				
4	#Value!																				
5	#Value!																				
6	#Value!																				
7	#Value!																				
8	#Value!																				
9	#Value!																				
10	#Value!																				
11	#Value!																				
12	#Value!																				
13	#Value!																				
14	#Value!																				
15	#Value!																				
16	#Value!																				
17	#Value!																				
18	#Value!																				
19	#Value!																				
20	#Value!																				
21	#Value!																				

Napomena: Kalkulacije polja povezane su sa unosima podataka u Tabeli 1.

Tabela 7: Izvještajne tabele za ključne histopatološke kriterijume

Datum:
Hemikalija:
Patolog:

	Hipertrofija štitne žlijezde	Atrofija štitne žlijezde	Hipertrofija folikularnih ćelija	Heiperplazija folikularnih ćelija
Oznaka kontrolne životinje –				

	Hipertrofija štitne žlijezde	Atrofija štitne žlijezde	Hipertrofija folikularnih ćelija	Heiperplazija folikularnih ćelija
Oznaka kontrolne životinje –				

ponavljanje 1						ponavljanje 1					
Oznaka kontrolne životinje – ponavljanje 2						Oznaka kontrolne životinje – ponavljanje 2					
Ukupno						Ukupno:					

		Hipertrofija štitne žlijezde	Atrofija štitne žlijezde	Hipertrofija folikularnih ćelija	Heiperplazija folikularnih ćelija			Hipertrofija štitne žlijezde	Atrofija štitne žlijezde	Hipertrofija folikularnih ćelija	Heiperplazija folikularnih ćelija
Oznaka kontrolne životinje – ponavljanje 1						Oznaka kontrolne životinje – ponavljanje 1					
Oznaka kontrolne životinje – ponavljanje 2						Oznaka kontrolne životinje – ponavljanje 2					
Ukupno						Ukupno:					

<u>Tabela 8:</u> Dodatni histopatološki kriterijumi

Datum:

Hemikalija:

Patolog

		Povećanje oblasti lumena folikula	Smanenje oblasti lumena folikula				Povećanje oblasti lumena folikula	Smanenje oblasti lumena folikula
Oznaka kontrolne životinje – ponavljanje 1					Oznaka doze za životinju – ponavljanje 1			
Oznaka kontrolne životinje – ponavljanje 2					Oznaka doze za životinju – ponavljanje 2			
Ukupno:								

		Povećanje oblasti lumena folikula	Smanenje oblasti lumena folikula				Povećanje oblasti lumena folikula	Smanenje oblasti lumena folikula
Oznaka kontrolne životinje – ponavljanje 1					Oznaka doze za životinju – ponavljanje 1			
Oznaka kontrolne životinje – ponavljanje 2					Oznaka doze za životinju – ponavljanje 2			
Ukupno:								

Tabela 9: Tekstualni opis histopatoloških nalaza

Datum:
Hemikalija:
Patolog:
Tekstualni opis:

ka kontrolne votinje – navljanje 1		

aka doze za ivotinju – navljanje 2			Oznaka doze za ţivotinju – ponavljanje 1				

Oznaka doze za ţivotinju – ponavljanje 2					Oznaka doze za ţivotinju – ponavljanje 1				

Oznaka doze za ţivotinju – ponavljanje 2					Oznaka doze za ţivotinju – ponavljanje 1				

Oznaka kontrolne ţivotinje – ponavljanje 2						

Tabela 10: Tabela sažetog izvještavanja za x dan (7. ili 21. dan) AMA ispitivanja

		Kontrola				Doza 1					Doza 2					Doza 3					
Parametar praćenja	Ponavljanje	Srednja vrijednost	SD	CV	N	Srednja vrijednost	SD	CV	N	p-vrijednost	Srednja vrijednost	SD	CV	N	p-vrijednost	Srednja vrijednost	SD	CV	N	p-vrijednost	
Dužina zadnjih udova	1																				
	2																				
	3																				
	4																				
	Srednja vrijednost:																				
SVL (mm)	1																				
	2																				
	3																				
	4																				
	Srednja vrijednost:																				
Mokra masa (mg)	1																				
	2																				
	3																				
	4																				
	Srednja vrijednost:																				

Tabela 11: Tabela sažetog izvještavanja za x dan (7. ili 21. dan) AMA ispitivanja

		Kontrol	Doza	Doza	Doza 3	

		a				1					2										
Parametar praćenja	Ponavljanje	Srednja vrijednost	SD	CV	N	Srednja vrijednost	SD	CV	N	pvrijednost	Srednja vrijednost	SD	CV	N	pvrijednost	Srednja vrijednost	SD	CV	N	pvrijednost	
Stadijum razvoja	1																				
	2																				
	3																				
	4																				
	Srednja vrijednost:																				

Aneks 3

Alternativna analiza mase i dužine u slučaju stadijuma kasnog razvoja kod više od 20% punoglavaca u jednoj ili više koncentracija

Ukoliko povećan broj punoglavaca pokazuje razvoj nakon 60. stadijuma ((≥ 20 %) u jednoj ili više nominalnih koncentracija, treba ssprovesti dvofaktorski ANOVA sa uvrštenom strukturom varijansi na svim punoglavcima kako bi se procijenili uticaji razvoja usljed hemijskih tretmana uzimajući u obzir efekat stadijuma kasnog razvoja na rast.

Predlog je da se koriste svi podaci ali da se u obzir uzme uticaj stadijuma kasnog razvoja. Ovo se može uraditi kroz dvofaktorsku ANOVA sa uvršetnom strukturom varijansi. Definisati kasni stadijum = DA za životinju ako je njen stadijum razvoja 61. ili veći. U suprotnom, definisati kasni stadijum=NE. Zatim se može ssprovesti dvofaktorska ANOVA sa koncentracijama i kasnim stadijumom i njihovom interakcijom, sa nasumičnim faktorom ponavljanja (koncentracija) i drugim nasumičnim efektom punoglavci (ponavljanje). Ovim se i dalje tretira ponavljanje kao jedinica analize i dobijaju se u suštini isti rezultati kao u ponderisanoj analizi ponavljanja* prosjeka kasnog stadijuma, ponderisanog brojem životinja po prosjeku. Ako se podaci kose sa uslovima normalnosti ili homogenosti varijanse ANOVA, tada se može ssprovesti normalizacija transformacijom apsolutnih podataka kako bi se otkrilonio nedostatak.

Pored standardnih ANOVA F-testova za efekte koncentracije, kasnog stadijuma i njihove interakcije, interakcioni F-test može se „podijeliti— na dva dodatna ANOVA F-testa, jedan za srednje vrijednosti reakcija u okviru koncentracija za kasni stadijum=NE i drugi za srednje vrijednosti reakcija u okviru koncentracija za kasni stadijum=DA. Dalja poređenja srednjih vrijednosti tretmana sa kontrolnom grupom vrše se u okviru svakog nivoa kasnog stadijuma. Analiza vrste trenda može se ssprovesti kroz korišćenje odgovarajućih kontrasta ili jednostavnim poređenjem u paru ako postoji dokaz o reakciji na nemonotonu dozu u okviru nivoa varijabile kasnog stadiijuma. Bonferoni-Holm prilagođavanje p-vrijednostima se vrši jedino ako podudarni F-test nije značajan. Ovo se može ssprovesti u SAS i po mogućnosti, drugim statističkim softverskim paketima. Komplikacije se mogu javiti kada nema životinja u kasnom stadijumu u nekim koncentracijama, ali se ove situacije mogu riješiti na neposredan način.

Aneks 4

Značenje izraza

Hemikalija: materija ili smješa.

Ispitna hemikalija: Svaka materija ili smješa koja se ispituje putem ove ispitne metode.

C.39. ISPITIVANJE REPRODUKCIJE KOLEMBOLA U ZEMLJIŠTU

1. UVOD

Ova ispitna metoda ekvivalentna je Smjernicama OECD za ispitivanje (TG) 232 (2009). Ova metoda ispitivanja osmišljena je u cilju procjene uticaja hemikalija na reproduktivne rezultate kolembola u zemljištu. Partenogenetska vrsta Folsomia candida i seksualno reproduktivna vrsta Folsomia fimetaria dvije su najpristupačnije vrste kolembola, mogu se uzgajati i komercijalno su dostupne. Kada je potrebna procjena određenih staništa koja nisu nastanjena ovim vrstama, postupak je sveobuhvatan i uključuje druge vrste kolembole ukoliko su u mogućnosti da ispune kriterijume validnosti ispitivanja.

Kolembole koje žive u zemljištu su ekološki važne vrste za ekotoksikološko ispitivanje. Kolembole su heksapode sa tankim poljašnjim sekeletonom visoko propusnim na vodu i vazduh i predstavljaju vrstu zglavkara sa različitim pravcem i različitom stopom izloženosti u poreĐenju sa glistama i bijelim crvima.

Gustina naseljenosti kolembola obično dostigne 105 m -2 u zemlji i slojevima opalog lišća u mnogim kopnenim ekosistemima (3) (4). Odrasle jedinke obično su veličine 0,5 - 5 mm, njihov doprinos ukupnoj životinjskoj biomasi u zemlji i respiratornom dijelu je nizak i procjenjuje se od 1% do 5% (5). Njihova najvažnija uloga može stoga može biti uloga potencijalnih regulatora procesa kroz predaciju mikroorganizama i mirkofaune. Kolembole su plijen za široku lepezu beskičmjenjaka koji žive u dubinskom i površinskom sloju zemljišta kao što su grinje, stonoge, pauci, Carabidae i kukci. Kolembola doprinosi pokolonama razgradnje u kisjelim zemljištima u kojima možda predstavljaju najvažnije beskičmjenjake u zemljištu pored crva, s obzirom da gliste i stonoge obično nisu prisutne.

Vrsta F. fimetaria je rasprostranjena širom svijeta i obično se nalazi u nekoliko vrsta zemljišta od pjeskovitog do ilovastog zemljišta, kao i od zrelog do sirovog humusa. To je kolembola bez očiju i pigmenta. PronaĐena je u poljoprivrednim zemljištima širom Evrop.

Ima prehrambene navike svaštojeda, uljučujući hife gljiva, bakterije, protozoe i organske otpatke. Uzajamno djeluje kroz ispašu sa infekcijama gljiva koje uzrokuju bolesti biljaka (7) i mogu da utiču na mikorizu, kao što je slučaj sa vrstom F. candida. Kao i većina vrsta kolembola, polno se razmnožava uz potrebu za stalnim prisustvom mužjaka za oplodnju jaja. Vrsta F. candida takoĐe je rasprostranjena širom svijeta. Iako nije uobičajena u većini prirodnih zemljišta, često se javlja u velikom broju na mjestima bogatim humusom. To je kolembola bez očiju i pigmenta. Ima veoma dobro razvijenu odskočnu kost (organ za skakanje), aktivo se kreće i spremna je da odskoči ukoliko je uznemirena. Ekološka uloga vrste F. candida slična je ulozi vrste F. fimetaria, ali su njena staništa organski bogatija zemljišta. Razmnožava se bepolno. Mužjaci se mogu javiti u manje od 1 naprema hiljadu.

2. NAČELO ISPITIVANJA

Sinhrone odrasle (F. fimetaria) ili mlade jedinke (F. candida) kolembole izlažu se nizu koncentracija ispitne hemikalije koja je pomiješana sa modifikovanim vještačkim zemljištem

(8) uz pomoć sadržaja organske materije od 5% (ili alternativnog zemljišta). Ispitni scenario se može podijeliti na dva koraka:

- Test za određivanje oblasti koncentracija, ukoliko dovoljno informacija o toksičnosti nije na rapolaganju, prilikom kojeg smrtnost i razmnožavanje predstavljaju glavne parametre praćenja koji se procjenjuju nakon dvije nedjelje za vrstu F. fimetaria i 3 nedjelje za vrstu F. candida.
- Konačno ispitivanje reprodukcije kojim se procjenjuje ukupan broj mladih jedinki koje proizvedu životinje roditelji i preživljavanje životinja roditelja. Trajanje ovog konačnog ispitivanjea je tri nedjelje za vrstu F.fimetaria i 4 nedjelje za vrstu F. candida.

Toksični efekat ispitne hemikalije na smrtnost odraslih jedinki i reproduktivne rezultate izražava se kao LCx i ECx kroz uklapanje podataka u odgovarajući model ne-linearnom regresijom u cilju procjene koncentracija koje bi uzrokovale x% smrtnosti ili reprodukcije kod reproduktivnih rezultata ili alternativno kao vrijednost NOEC/LOEC.

3. INFORMACIJE O ISPITNOJ HEMIKALIJI

Poželjno je imati informacije o fizičkim karakteristikama hemikalije, rastvorljivosti u vodi, log Kow, koeficijentu raspodjele zemljišta u odnosu na vodu i pritisku pare ispitne hemikalije. Dodatne informacije poželjno je znati o sudbini ispitne hemikalije u zemljištu, kao što je stopa fotolize i hidrolize i biotičke razgradnje. Potrebno je zabilježiti hemijsku identifikaciju ispitne hemikalije u skladu sa IUPAC nomenklatirom, broj CAS, seriju, partiju, strukturnu formulu i čistoću ako su ove informacije na rapolaganju.

Ova ispitna metoda može se koristiti za hemikalije koje se rastvaraju i one koje se ne rastvaraju u vodi. Međutiim, način primjene ispitne hemikalije će se razlikovati. Ispitna metoda se ne može primijeniti na isparljive hemikalije, odnosno hemikalije za koje je Henrijeva konstanta ili koeficijent raspodjele voda/vazduh veći od jedan ili na hemikalije za koje pritisak pare prelazi 0,0133 Pa na 25 °C.

4. VALIDNOST ISPITIVANJA

Potrebno je ispuniti kriiterijume koji slijede u kontrolnim grupama koje nisu tretirane hemikalijom kako bi se rezultati testa smatrali validnim:

- Prosječna smrtnost odraslih jedinki ne prekoračuje 20% na kraju ispitivanja;
- Prosječan broj mladih jedinki po ispitnoj posudi treba da bude najmanje 100 na kraju ispitivanja;
- Koeficijent varijacije izračunat za broj mladih jedinki treba da je manji od 30% na kraju konačnog ispitivanja.

5. REFERENTNA HEMIKALIJA

Referentna hemikalija treba da se ispita pri svojoj EC50 koncentraciji za odabrane vrste zemljišta ili u redovnim intervalima ili po mogućnosti da se uključi u svako probno ispitivanje kako bi se provjerilo da je reakcija ispitnih organizama u ispitnom sistemu u okviru normalnog nivoa. Odgovarajuća referentna hemikalija je borna kisjelina, kojom reprodukcija treba da se smanji za 50% (10) (11) na približno 100mg/kg težine suvog zemljišta za obije vrste.

6. OPIS ISPITIVANJA

6.1. Ispitne posude i oprema

Odgovarajuće posude su posude u kojima se može čuvati 30g vlažnog zemljišta. Trebale bi da budu od stakla ili inertne plastike (koja nije toksična). Međutiim, treba izbjegavati korišćenje plastičnih posuda ukoliko se izloženost hemikaliji smanjuje zbog sorpcije. Ispitne posude treba da imaju poprečno presječeni dio čime se omogućava da stvarna dubina zemljišta u ispitnoj posudi bude 2-4 cm. Posude treba da imaju poklopce (npr. od stakla ili polietilena) koji su napravljeni tako da smanjuju ispravanje vode istovremeno omogućavajući razmjenu gasova između zemlje i atmosfere. Posuda treba da je makar djelimično providna kako bi se omogućilo propuštanje svjetlosti.

Potrebna je uobičajena labaratorijska oprema, posebno sljedeće:

- ormar za sušenje; stereo mikroskop; mjerač pH vrijednosti i luksometar;
- odgovarajuće precizne vage;
- odgovarajuća oprema za kontrolisanje temperature;
- odgovarajuća oprema za kontrolisanje vlažnosti vazduha (nije potrebno ukoliko su izložene posude pokrivene poklopcima)
- inkubator sa kontrolisanom temperaturom ili mala soba; kliješta ili
- uređaj sa slabim usisnim protokom vazduha.

6.2. Priprema ispitnog zemljišta

Koristi se modifikovana vještačka zemlja (8) sa sadržajem organske materije od 5%. Kao altenativno rješenje, može se koristiti prirodna zemlja s obzirom na to da vještačka zemlja ne izgleda kao prirodna. Preporučeni sastav vještačkog zemljišta je sljedeći (na osnovu težine suve zemlje, osušene na stalnu težinu na temperaturi od 105 °C):

- 5% treseta, osušenog na vazduhu i usitnjenog (prihvatljiva je veličina čestica od 2 ± 1 mm)
- 20 % kaolinske gline (poželjan sadržaj kalionita iznad 30%)
- približno 74% na vazduhu osušenog industrijskog pijeska (u zavisnosti od potrebne količine CaCO3), pretežno sitni pijesak sa više od 50% čestica između 50 i 200 mikrona. Precizna količina pijeska zavisi od količine CaCO3 (v. gore), zajedno treba da iznose 75%.
- 1,0 % kalcijum karbonata (CaCO3, u prahu, analitičke klase) kako bi se dobila pH vrijednost od 6,0 ± 0,5; količina kalcijum karbonata koja se dodaje načelno zavisi od kvaliteta/sastava treseta.

Napomena 1: Količina potrebnog CaCO3 zavisiće od komponenti supstrata zemljišta i potrebno ju je utvrditi kroz mjerenje pH vrijednosti prethodno inkubiranih poduzoraka zemljišta neposredno prije ispitivanja.

Napomena 2: Preporuka je da se izmjeri pH vrijednost i po potrebi odnos C/N, kapacitet razmjene katjona (CEC) i sadržaj organske materije u zemljištu kako bi se omogućila normalizacija u kasnijoj fazi i rezultati bolje tumačili.

Napomena 3: Po potrebi, npr. u određene ispitne svrhe, prirodna zemlja iz nezagađenih mjesta može poslužiti kao ispitni supstrat i/ili supstrat za uzgajanje kultura. Međutiim, ukoliko se koristi prirodno zemljište, potrebno je zabilježiti barem porijeklo (mjesto sa kojeg je uzeto), pH vrijednost, tekstura (raspodjelu veličine čestica), CEC i sadržaj organskih materija i ta zemlja ne treba da bude kontaminirana. Za prirodnu zemlju, savjetuje se dokazivanje njene podobnosti za ispitivanje, kao i za ispunjavanje kriterijuma validnosti ispitivanja prije korišćenja zemlje u konačnom ispitivanju.

Suvi sastojci zemlje detaljno se miješaju (npr. u velikom labaratorijskom mikseru). Maksimalan kapacitet zadržavanja vode u vještačkoj zemlji (WHC) utvrđuje se u skladu sa pokolonama opisanim u Aneksu 5. Sadržaj vlage u ispitnom zemlljištu treba da se prilagodi kako bi se dobila rastresito porozna struktura zemljišta koja omogućava kolebolama da uĐu u pore. Ovo je obično između 40-60% maksimalnog WHC.

Suva vještačka zemlja se unaprijed kvasi dodavanjem dovoljno dejonizovane vode kako bi se dobila približno polovina konačnog sadržaja vode 2-7 dana prije početka ispitivanja u cilju izjednačavanja/stabilizacije kisjelosti. Za potrebe utvrĐivanja pH vrijednosti, koristi se mješavina zemlje i rastvora 1 M kalijum hlorida (KCl) ili 0,001 kalcijum hlorida ($CaCl_2$) u odnosu 1:5 (u skladu sa Aneksom 6). Ukoliko je zemljište kisjelije od potrebnog raspona, kisjelost se može prilagoditi kroz dodavanje odgovarajuće količine $CaCO_3$. Ukoliko je zemljište previše alkalno, može se prilagoditi kroz dodavanje neorganske kisjeline koja je bezopasna za kolembole.

Prethodno navlažena zemlja raspodjeljuje se na broj djelova koji odgovara broju ispitnih koncentracija (i referentnihi hemikalija po potrebi) i kontrolnih grupa koje se koriste za ispitivanje. Dodaju se ispitne hemikalije i sadržaj vode se prilagoĐava u skladu sa stavom 24.

6.3. Izbor i priprema ispitnih životinja

Partogenetska vrsta F. candida je preporučena vrsta jer je u prstenastom testu ispitne metode (11) ova vrsta ispunjavala kriterijume validnosti za preživljavanje češće u odnosu na vrstu F. fimetaria. Ukoliko se koristi alternativna vrsta, ona treba da ispunjava kriterijume validnosti iz stava 9. Na početku ispitivanja, životinje je potrebno dobro nahraniti i moraju biti starosti 23-26 dana za vrstu F. fimetaria i 9-12 dana za vrstu F. candida. Za svako ponavljanje, broj F. fimetaria treba da bude 10 mužjaka i 10 ženki a za F. candida je potrebno koristiti 10 ženki (v. Aneks 2 i Aneks 3). Sinhrone životinje biraju se nasumično iz posuda i provjerava se njihovo zdravlje i fizičko stanje za svaku seriju koja se dodaje za ponavljanje. Svaka grupa od 10/20 jedinki dodaje se u nasumično odabranu posudu za ispitivanje i biraju se velike ženke vrste F. fimetaria kako bi se osiguralo pravilno razlikovanje u odnosu na mužjake iste vrste.

6.4. Priprema ispitnih koncentracija

Mogu se koristiti četiri metode primjene ispitne hemikalije: 1) miješanje ispitne hemikalije u zemlju sa vodom kao nosiocem, 2) miješanje ispitne hemikalije sa zemljom sa organskim rastvorom kao nosiocem, 3) miješanje ispitne hemikalije sa zemljom sa pijeskom kao nosiocem ili 4) primjena ispitne hemikalije na površinu zemlje. Izbor odgovarajuće metode zavisi od karakteristika hemikalije i cilja ispitivanja. Uopšteno posmatrano, preporučuje se miješanje ispitne hemikalije sa zemljom. Međutiim, možda će biti potrebni postupci primjene koji su u skladu sa praktičnom upotrebom ispitne hemikalije (npr. prskanje tečne formulacije ili korišćenje posebnih formulacija pesticida kao što su granule ili sredstva za tretiranje sjemena). Zemlja se tretira prije dodavanja kolembola, osim kada se ispitna hemikalija dodaje na površinu zemlje kada kolembole treba prvo da uĐu u zemlju.

6.4.1. Ispitna hemikalija koja se rastvara u vodi

Rastvor ispitne hemikalije se priprema u dejonizovanoj vodi u količinama koje su dovoljne za sva ponavljanja jedne ispitne koncentracije. Svaki rastvor ispitne hemikalije detaljno se miješa sa jednom serijom prethodno navlažene zemlje prije dodavanja u ispitnu posudu.

Ispitna hemikalija koja se ne rastvara u vodi

Kada su u pitanju hemikalije koje se ne rastvaraju u vodi, ali se rastvaraju u organskim rastvorima, ispitna hemikalija se može rastvoriti u najmanjoj mogućoj količini odgovarajućeg rastvora (npr. acetona) istovremeno osiguravajući ispravno miješanje hemikalije sa zemljom i miješanje hemikalije sa dijelom potrebnog kvarcnog pijeska. Treba da se koriste samo isparljivi rastvori. U slučaju kada se koristi organski rastvor, sve ispitne koncentracije i dodatna negativna kontrolna grupa za rastvor treba da sadrže istu minimalnu količinu rastvora. Posude je potrebno ostaviti nepokrivene određeni vremenski period kako bi se omogućilo da rastvor povezan sa primjenom ispitne hemikalije ispari, osiguravajući da se toksična hemikalija u tom periodu ne rasipa.

6.4.2. Ispitna hemikalija koja se slabo rastvara u vodi i organskim rastvorima

Kada je riječ o hemikalijama koje se slabo rastvaraju u vodi i organskim rastvorima, kvarcni pijesak, koji treba da bude dio ukupnog pijeska koji se dodaje zemlji, miješa se sa određenom količinom ispitne hemikalije kako bi se dobila željena ispitna koncentracija. Ova mješavina kvarcnog pijeska i ispitne hemikalije dodaje se prethodno navlaženoj zemlji i detaljno se miješa nakon dodavanja odgovarajuće količine dejonizovane vode kako bi se dobio potreban sadržaj vlage. Konačna mješavina se dijeli u ispitne posude. Postupak se ponavlja za svaku ispitnu koncentraciju, a priprema se i odgovarajuća kontrolna grupa.

6.4.3. Primjena ispitne hemikalije na površinu zemlje

Kada ispitna hemikalija predstavlja pesticid, možda će biti potrebno da se primijeni na površinu zemlje prskanjem. Zemlja se tretira nakon dodavanja kolembola. Ispitne posude se prvo pune nakvašenim supstratom zemlje i dodaju se životinje, a zatim se ispitne posude vagaju. U cilju izbjegavanja svakog direktnog izlaganja životinja ispitnoj hemikaliji direktnim kontaktom, ispitna hemikalija se nanosi najmanje pola sata nakon dodavanja kolembola.

Ispitna hemikalija treba da se nanese na površinu zemlje što je ravnodnosnije uz pomoć labaratorijske prskalice kako bi se simuliralo prskanje na polju. Nanošenje treba da se obavi pri temperaturi koja može da varira do ± 2 °C, a za vodene rastvore, emulzije ili disperzije zajedno sa primjenom količine vode u skladu sa preporukama za procjenu rizika. Količina treba da se provjeri uz pomoć odgovarajuće kalibracione tehnike. Posebne formulacije kao što su granule ili sredstva za tretiranje sjemena mogu da se primijene na način koji je u skladu sa poljoprivrednom upotrebom. Hrana se dodaje nakon prskanja.

7. POSTUPAK

7.1. Uslovi ispitivanja

Prosječna ispitna temperatura treba da iznosi 20 ± 1 °C sa opsegom temperature od 20 ± 2 °C. Ispitivanje se sprovodi u skladu sa kontrolisanim ciklusima svijetla i tame (poželjno je 12 sati svijetla i 12 sati tame) sa osvjetljenjem jačine 400 do 800 luksa u dijelu u kojem se nalaze ispitne posude.

U cilju provjere vlažnosti zemlje, posude se vagaju na početku, sredini i na kraju ispitivanja. Gubitak težine od > 2 % nadoknađuje se kroz dodavanje dejonizovane vode. Potrebno je napomenuti da se gubitak vode može smanjiti održavanjem visoke vlažnosti vazduha ((> 80 %) u ispitnom inkubatoru.

PH vrijednost treba da se izmjeri na početku i na kraju testa za određivanje oblasti koncentracija i konačnog ispitivanja. Mjerenja treba da se obave u jednom dodatnom kontrolnom uzorku i jednom dodatnom uzorku tretiranih (sve koncentracije) uzoraka zemlje koji su pripremljeni i održavani na isti način kao ispitne kulture, ali bez dodavanja kolembola.

7.2. Ispitni postupak i mjerenja

Za svaku ispitnu koncentraciju, količina ispitne zemlje koja odgovara 30 g svježe mase stavlja se u ispitnu posudu. TakoĐe se pripremaju kontrolne grupe sa vodom vode, bez ispitne hemikalije. Ukoliko se za primjenu ispitne hemikalije koristi sredstvo, pored ispitnih serija, potrebna je i jedna kontrolna serija koja sadrži samo to sredstvo. Koncentracija rastvora ili raspršivača treba da bude ista kao ona koja se koristi u ispitnim posudama koje sadrže ispitnu hemikaliju.

Pojedinačne kolembole pažljivo se prenose u svaku ispitnu posudu (nasumično se raspoređuju u ispitne posude) i stavljaju na površinu zemlje. U cilju efikasnog prenosa životinja, može se koristiti uređaj sa slabim usisnim protokom vazduha. Broj ponavljanja za ispitne koncentracije i kontrolne grupe zavisi od metode ispitivanja koja se koristi. Ispitne posude se nasumično raspoređuju u ispitni inkubator i svake nedjelje im se nasumično mijenja položaj.

Za ispitivanje vrste F. fimetaria, u svakoj ispitnoj posudi treba da se koristi dvadeset odraslih jedinki, 10 mužjaka i 10 ženki, starosti od 23 do 26 dana 21 dana, kolembole se vade iz zemlje i broje. Za vrstu F. fimetaria pol jedinki se razlikuje po veličini u sinhronoj seriji životinja koje se koriste za ispitivanje. Ženke su značajno veće od mužjaka.

Za ispitivanje vrste F. candida, u svakoj ispitnoj posudi treba da se koristi 10 mladih jedinki starosti od 9 do 12 dana. Kolembole se vade iz zemlje i broje 28. dana.

Kao odgovarajući izvor hrane, dovoljna količina, npr. 2-10 mg suvog pekarskog kvasca u granulama, koji je na rapolaganju na tržištu za kućnu upotrebu, dodaje se svakoj posudi na početku ispitivanja nakon otprilike 2 nedjelje.

Na kraju ispitivanja, procjenjuje se smrtnost i reprodukcija. Nakon tri nedjelje (za vrstu F. fimetaria) ili 4 nedjelje (za vrstu F. candida) kolembole se vade iz ispitne zemlje (v. Aneks 4) i broje (12). Kolembola se smatra uginolom ako nije prisutna prilikom ekstrakcije. Potrebno je utvrditi validnost metode ekstrakcije i prebrojavanja. Validnost uključuje efikasnost ekstrakcije mladih jedinki koja je veća od 95%, npr. kroz dodavanje poznatog broja zemlji. Praktični sažetak i vremenski raspored ispitnog postupka opisani su u Aneksu 2.

7.3. Način ispitivanja

7.3.1. Test za određivanje oblasti koncentracija

Kada je potrebno, sprovodi se test za određivanje oblasti koncentracija sa, na primjer, pet koncentracija ispitne hemikalije od 0,1, 1,0, 10, 100, i 1 000 mg/kg suve mase zemlje i dva ponavljanja za svaki tretman i kontrolnu grupu. Dodatne informacije, iz ispitivanja sa sličnim hemikalijama ili iz literature, o smrtnosti ili reprodukciji kolembola (Collembola) takoĐe mogu biti korisne prilikom donošenja odluke o opsegu koncentracija koje se koriste prilikom testa za određivanje oblasti koncentracija.

Trajanje testa za određivanje oblasti koncentracija za vrstu F. fimetaria je dvije nedjelje, a za vrstu F. candida je tri nedjelje kako bi se obezbijedila proizvodnja jednog legla mladih jedinki.

Na kraju ispitivanja procjenjuje se smrtnost i reprodukcija kolembola. Potrebno je zabilježiti broj odraslih jedinki i pojavu mladih jedinki.

7.3.2. Konačno ispitivanje

U cilju utvrĐivanja ECx (npr. EC10, EC50) potrebno je ispitati dvanaest koncentracija. Preporučuju je najmanje dva ponavljanja za svaki tretman ispitne koncentracije i šest kontrolnih ponavljanja. Faktor razmaka može da varira u zavisnosti od strukture reakcije na dozu.

U cilju utvrĐivanja NOEC/LOEC, potrebno je ispitati najmanje pet koncentracija u geometrijskom nizu. Preporučuju se četiri ponavljanja svakog tretmana ispitne koncentracije plus osam kontrola. Faktor razmaka koncentracija ne treba da iznosi više od 1,8.

Kombinovanim pristupom omogućava se utvrĐivanje vrijednosti NOEC/LOEC i ECx. Za ovaj kombinovani pristup, potrebno je koristiti osam tretmana koncentracija u geometrijskom nizu.

Preporučuju se četiri ponavljanja svakog tretmana plus osam kontrola. Faktor razmaka koncentracija ne treba da iznosi više od 1,8.

U slučaju da se ne zapaze efekti pri najvećim koncentracijama tokom testa za određivanje oblasti koncentracija (npr. 1 000 mg/kg), kao granično ispitivanje može se ssprovesti ispitivanje reprodukcije uz pomoć ispitnih koncentracija od 1 000 mg/kg i kontrolne grupe. Graničnim ispitivanjem će se obezbijediti mogućnost da se dokaže da ne postoji statistički značajan efekat pri graničnoj koncentraciji. Treba koristiti osam ponavljanja za tretiranu zemlju i za kontrolnu grupu.

8. PODACI I IZVJEŠTAVANJE

8.1. Obrada rezultata

Reproduktivni ishod je glavni parametar praćenja (npr. broj mladih jedinki proizveden u svakoj ispitnoj posudi). Statistička analiza npr. postupci ANOVA, poređenje obrada u skladu sa Studentovim t- testom (Student t-test), Danetovim testom ili Vilijamsovim testom. Intervali pozdanosti od 95% iizračunavaju se za pojedinačne prosječne vrijednosti obrada.

Broj preživjelih odraslih jedinki kod netretiranih kontrolnih grupa je veoma važan kriterijum validnosti i potrebno ga je dokumentovati. Kao u testu za određivanje oblasti koncentracija, potrebno je zabilježiti sve druge štetne znake i u završnom izvještaju.

8.1.1. LCx and ECx

Vrijednosti ECx, uključujući sa njima povezane donje i gornje granice pouzdanosti od 95% za parametar, iizračunavaju se kroz odgovarajući statistički metod (npr. logističku ili Veibulovu (Weibull) funkciju, skraćeni metod Spirman-Karber (Spearman-Karber) ili jednostavnu interpolaciju). Vrijednosti ECx dobijaju se uvođenjem vrijednosti koja dogovara x% kontrole srednje vrijednosti u pronaĐenu jednačinu. Kako bi se izračunala vrijednost EC50 ili bilo koja druga ECx vrijednost, cijeli niz podataka treba da se podvrgne regresionoj

analizi. Vrijednost LC50 obično se procjenjuje kroz analizu vjerovatnoće ili sličnu analizu kojom se u obzir uzimaju binomno distribuirani podaci o smrtnosti.

8.1.2. NOEC/LOEC

Ukoliko statističkom analizom treba da se utvrde vrijednosti NOEC/LOEC, potrebni su statistički podaci za svaku posudu (pojedinačne posude se smatraju ponavljanjima). Treba koristiti odgovarajuće statističke metode u skladu sa Dokumentom 54 OECD o postojećim pristupima statističke analize podataka o ekološkoj toksičnosti: Smjernice za primjenu (9). Uopšteno gledano, negativni efekti ispitne hemikalije u poređenju sa kontrolom istražuju se uz pomoć jednosmjernog testiranja hipoteze pri $p \leq 0,05$.

Uobičajena raspodjela i homogenost varijanse može se ispitivati koz odovarajući statistički test npr. Šapiro-Vilkov test odnosno Levenov test ($p \leq 0,05$). Mogu se ssprovesti jednosmjerna analiza varijanse (ANOVA) i naknadni testovi sa višestrukim poređenjem. Višestruka poređenja (npr. Danetov test ili testovi trenda postepenog snižavanja (Vilijamsov test) mogu se koristiti kako bi se izračunalo da li postoje značajne razlike ($p \leq 0,05$) između kontrolnih grupa i raznih koncentracija ispitne hemikalije (izbor preporučenog testa u skladu sa Dokumentom 54 OECD (9)). U suprotnom, neparametaraske metode (npr. BonferonijevU test (Bonferroni-U-test) u skladu sa Holmovim ili Jonker-Terpstrinim (Jonckheere-Terpstra) testom trenda mogu se koristiti za utvrđivanje vrijednosti NOEC i LOEC.

8.1.3. Granično ispitivanje

Ukoliko je ssprovedeno granično ispitivanje (poređenje kontrole i samo jednog tretmana) i preduslovi postupaka parametarskih testova su ispunjeni, metrički odgovori se mogu procijeniti Studentovim testom (t-test). Ukoliko ti preduslovi nisu ispunjeni može se koristiti ttest nejednake varijanse (Velčov (Welch) t-test) ili ne-parametarski test, kao što je MenVitnijev-U test.

Kako bi se utvrdile značajne razlike između kontrolnih grupa (kontrolne grupe i kontrolne grupe sa rastvorom), ponavljanja svake kontrole mogu se testirati kao što je opisano u graničnom ispitivanju. Ukoliko se ovim testovima ne otkriju značajne razlike, sva ponavljanja kontrolnih grupa i kontrolnih grupa sa rastvorom mogu se objedniti. U suprotnom, svi tretmani treba da se uporede sa kontrolnom grupom sa rastvorom.

8.2. Izvještaj o ispitivanju

Izveštaj o ispitivanju treba da sadrži najmanje sljedeće informacije:

8.2.1. <u>Ispitna hemikalija</u> identitet ispitne hemikalije, serija, partija, broj CAS, čistoća;

- fizičke i hemijske karakteristike ispitne hemikalije (npr. log Kow, rastvorljivost u vodi, pritisak pare, Henrijeva konstanta (H), a poželjne su informacije o sudbini ispitne hemikalije u zemlji, ako su na rapolaganju;
- treba navesti formulaciju ispite hemikalije i aditive ako se ispituje hemikalija koja nije čista;

8.2.2. <u>Ispitni organizmi</u>

- identifikacija vrste i dobavljača ispitnih organizama, opis uslova uzgoja i opseg starosti ispitih organizama;

8.2.3. <u>Uslovi ispitivanja</u>

- opis plana eksperimenta i postupka;

- pripremni detalji za ispitnu zemlju; detaljna specifikacija ukoliko se koristi prirodna zemlja (porijeklo, istorija, distribucija veličine čestica, pH vrijednost, sadržaj organske materije)
- kapacitet zadržavanja vode u zemlji;
- opis tehnika koje se koriste za primjenu ispitne hemikalije u zemlji;
- uslovi ispitivanja: intenzitet svjetlosti, trajanje ciklusa svijetlost-tame, temperatura;
- opis režima hranjenja, vrsta i količina hrane koja se koristi tokom ispitivanja, datumi hranjenja;
- pH vrijednost i sadržaj vode u zemlji na početku i na kraju ispitivanja (kontrolna grupa i svaki tretman)
- detaljan opis metode ekstrakcije i efikasnosti ekstrakcije;

8.2.4. <u>Rezultati ispitivanja</u>

- broj mladih jedinki utvrĐen u svakoj ispitnoj posudi na kraju ispitivanja;
- broj odraslih jedinki i njihova smrtnost (%) u svakoj ispitnoj posudi na kraju ispitivanja;
- opis očiglednih fizioloških ili patoloških simptoma ili očiglednih promjena ponašanja;
- rezultati dobijeni sa referentnom ispitnom hemikalijom;
- vrijednosti NOEC/LOEC, LCx za smrtnost i ECx za reprodukciju (uglavnom LC50, LC10, EC50, i EC10) zajedno sa intervalima pouzdanosti od 95 %. Grafikon prilagoĐenog modela koji je korišćen za iizračunavanje, njegova funkcionalna jednačina i njegovi parametri (v. (9));
- sve informacije i zapažanja korisna za tumačenje rezultata;
- snaga stvarnog ispitivanja ako se vrši ispitivanje hipoteze (9);
- odstepena od postupka opisana u ovoj ispitnoj metodi i sve neobične pojave tokom ispitivanja;
- validnost ispitivanja;
- kada se procjenjuje, minimalna uočljiva razlika za vrijednost NOEC.

Glavne radnje i vremenski raspored za sprovođenje ispitivanja na kolembolama

Ispitne aktivnosti se mogu sažeti kako slijedi:

Vrijeme (dan)	Aktivnost
– 23. do – 26.	Priprema sinhronih kultura vrste *F. fimetaria*
– 14.	Priprema vještačke zemlje (miješanje suvih sastojaka) Provjeravanje pH vrijednosti vještačke zemlje i prilagoĐavanje Mjerenje maksimalnog WHC zemlje
– 9. do – 12.	Priprema sinhronih kultura vrste *F. candida*
– 2. do – 7.	Prethodno navlažena zemlja
– 1.	Raspoređivanje mladih jedinki u serije Priprema rastvora i primjena ispitne hemikalije ukoliko je potreban rastvor

0.	Priprema rastvora i primjena ispitne hemikalije ukoliko je potrebna čvrsta hemikalija, rastvorljiva u vodi ili površinska primjena Mjerenje pH vrijednosti zemlje i vaganje posuda Dodavanje hrane. Uvođenje kolembola.
14.	Test za određivanje oblasti koncentracija za vrstu *F. fimetaria*: prekinuti ispitivanje, ekstrakcija životinja, mjerenje pH vrijednosti zemlje i gubitak vode (težina) Glavno ispitivanje: mjerenje sadržaja vlage i dodavanje vode i dodavanje 2-10 mg kvasca
21.	Glavno ispitivanje vrste *F. fimetaria*: završetak ispitivanja, ekstrakcija životinja, mjerenje pH vrijednosti zemlje i gubitak vode (težina) Test za određivanje oblasti koncentracija za vrstu *F. candida*: završetak ispitivanja, ekstrakcija životinja, mjerenje pH vrijednosti zemlje i gubitak vode (težina)
28.	Glavno ispitivanje vrste *F. candida*: završetak ispitivanja, ekstrakcija životinja, mjerenje pH vrijednosti zemlje i gubitak vode (težina)

Aneks 3

Smjernice za uzgajanje i sinhronizaciju vrsta *F. fimetaria* i *F. candida*

Vrijeme i trajanje navedeno u ovim smjernicama treba provjeriti u odnosu na posebnu vrstu kolembola kako bi se osigurao povoljan trenutak za dovoljan broj sinhronizovanih mladih jedinki. U osnovi, kroz učestalost polaganja jaja nakon prenosa odraslih jedinki u svjež supstrat i izlijeganje jaja utvrđuje se odgovarajući dan za sakupljanje jaja i sakupljanje sinhronih mladih jedinki.

Preporučuje se držanje trajne matične kulture koja se sastoji od npr. 50 posuda/petrijevih posuda. Matična kultura treba da se čuva u dobrim uslovima tako što se svake nedjelje hrani, zaliva vodom i uklanjaju se stara hrana i izumrle životinje. Premali broj kolembola u supstratu može dovesti do inhibicije kroz veći razvoj gljivica. Ukoliko se matična kultura prečesto koristi za proizvodnju jaja, ista se može umoriti. Znaci umora su mrtve odrasle jedinke i buĐ na supstratu. Preostala jaja iz proizvodnje sinhronih životinja mogu se iskoristiti za podmlaĐivanje kulture.

U sinhronoj kulturi *F. fimetaria*, mužjaci se razlikuju od ženki prvenstveno po veličini. Mužjaci su vidljivo manji od ženki i brzina hoda mužjaka je brža od ženki. Potrebno je malo iskustva za pravilan izbor pola i isti se može potvrditi mikroskopskom analizom genitalne oblasti (13).

1. Uzgajanje

1.1. Priprema supstrata za uzgajanje kulture

Supstrat za uzgajanje kulture je pečeni gips (kalcijum sulfat) sa aktivnim ugljenikom. Na ovaj način se obezbjeđuje vlažan supstrat, u kojem ugljenik ima mogućnost apsorpcije otpadnih gasova i izlučevina (14) (15). Razni oblici ugljenika mogu se koristiti kako bi se olakšalo posmatranje kolembola. Na primjer, ugljenik u prahu se koristi za vrste *F. candida* i *F. fimetaria* (koji proizvodi crni-sivi gips):

Sastav supstrata:

- 20 ml of aktivnog ugljenika
- 200 ml destilovane vode
- 200 ml gipsa

Ili

- 50 g aktivnog usitnjenog ugljenika - 260-300 ml destilovane vode - 400 g gipsa.

Prije upotrebe smješa se ostavlja da se odstoji.

1.2. Razmnožavanje

Kolembole se čuvaju u posudama kao što su petrijeve posude (90 mm × 13 mm), čije je dno prekriveno slojem od 0,5 cm supstrata gipsa/ugljenika. Jedinke se čuvaju na 20 ± 1 °C u ciklusima svijetlosti-tame od 12-12 sati (400-800 luksa). Vlažnost posuda se stalno održava i osigurava da relativna vlažnost vazduha u posudama iznosi 100%. To se može postići kroz prisustvo vode u poroznom gipsu ali treba izbjegavati stvaranje vodenog sloja na površini gipsa. Gubitak vode može se izbjeći kroz obezbjeĐivanje vlažnog vazduha u očvrstenju. Svaka mrtva jedinka treba da se ukloni iz posuda, kao i većina buĐave hrane. U cilju stimulisanja proizvodnje jaja, potrebno je da se odrasle jedinke premjeste u petrijeve posude sa novim pripremljenim suspstratom gipsa/ugljenika.

1.3. Izvor hrane

Suvi pekarski kvasac u granulama koristi se kao jedini izvor hrane za vrste *F. candida* i *F. fimetaria*. Svježa hrana se daje jednom ili dva puta nedjeljno kako bi se izbjegla pojava buĐi. Hrana se stavlja direktno na gips u maloj gomili. Količina pekarskog kvasca treba da se prilagodi broju kolembola, ali je opšte pravilo da je dovoljno 2-15 mg.

2. Sinhronizacija

Ispitivanje treba da se obavi sa sinhronim životinjama kako bi se dobile homogene ispitne životinje iste faze razvoja i veličine. Uz to, sinhronizacijom se omogućava razlikovanje mužjaka i ženki vrste *F. fimetaria* starosti od 3 nedjelje nadalje na osnovu polnog dimorfizma tj. razlike u veličini. Postupak koji slijedi je predlog načina na koji se mogu dobiti sinhrone životinje (praktični koraci nisu obavezni)

2.1. Sinhronizacija

- Pripremiti posude sa slojem od 0,5 cm supstrata gipsa/ugljenika.
- Za polaganje jaja, 150-200 odraslih jedinki vrste *F. fimetaria* i 50-100 jedinki vrste *F. candida* iz najboljih 15-20 posuda matične kulture sa supstratom starim 4-8 nedjelja prenijeti u posude i nahraniti ih sa 15 mg pekarskog kvasca. Izbjegavati spajanje

mladih jedinki sa odraslima jer prisustvo mlađih jedinki može usporiti proizvodnju jaja.

- Kulturu čuvati na temperaturi 20 ± 1 °C (prosječna temperatura treba da bude 20 °C) i u ciklusu svijetlosti-tame od 12-12 sati (400-800 luksa). Osigurati dostupnost svježoj hrani i zasićenost vazduha vodom. Nedostatak hrane može uzrokovati da životinje izbacuju izmet po jajima što može dovesti do razvoja gljivica na jajima ili da vrsta *F. candida* pojede svoja jaja. Nakon 10 dana, jaja se pažljivo sakupljaju iglom i špatulom i prenose na „papir za jaja— (komadići filter papira umočeni u smješu gipsa/ugljenika) koji se postavlja u posudu sa svježim supstratom gipsa/ugljenika. Nekoliko granula kvasca dodaje se supstratu kako bi se privukle mlade jedinke i natjerale da napuste papir sa jajima. Važno je da su papir sa jajima i supstrat vlažni ili će jaja dehidrirati. Kao alternativno rješenje, odrasle jedinke mogu se ukloniti iz kulture za usklađivanje nakon dva ili tri dana polaganja jaja.
- Nakon tri dana, većina jaja na papiru za jaja će se izleći, a ispod papira za jaja mogu se naći mlade jedinke.
- Kako bi se dobile mlade jedinke iste starosti, papir za jaja sa jajima koja se nisu izlegla uklanja se iz petrijeve posude kliještima. Mlade jedinke, sada starosti 0-3 dana, ostaju u posudi i hrane se pekarskim kvascem. Jaja koja se nisu izlegla se uklanjaju.
- Jaja i izležene mlade jedinke uzgajaju se na isti način kao odrasle jedinke. Potrebno je preduzeti sljedeće mjere posebno za vrstu *F. fimetaria*: osigurati dovoljno svježe hrane, uklanjati buđavu hranu, podijeliti mlade jedinke nakon jedne nedjelje u nove petrijeve posude pod uslovom da njihova gustina prekoračuje 200.

2.2. Rukovanje kolembolama na početku ispitivanja

- Jedinke vrste *F. candida* starosti 9-12 dana i *F. fimetaria* starosti 23-26 dana sakupljaju se npr. usisavanjem i premještaju u malu posudu sa vlažnim supstratom gipsa/ugljenika i njihovo fizičko stanje se provjerava dvogledom (povrijeđene ili oštećene životinje se uklanjaju). Svi koraci treba da se sprovedu dok su kolembole u vlažnom okruženju kako bi se izjegao stres uzrokovan isušivanjem, npr. korišćenjem nakvašenih površina, itd.
- Posudu okrenuti naopačke i kucnuti po njoj kako bi se kolembole prenijele na zemlju. Potrebno je neutralisati statički elektricitet, inače životinje mogu jednostavno odletjeti u vazduh ili se zalijepiti za ivicu posude i isušiti. Za neutralizaciju se mogu koristiti jonizator ili vlažna krpa ispod posude.

- Hranu je potrebno rasporediti po površini zemlje i ne treba je ostaviti samo na jednoj gomili.
- Tokom prenošenja i perioda ispitivanja treba izbjegavati lupkanje ili fizičko remećenje ispitnih posuda, jer se tako može povećati sabijanje zemlje i spriječiti interakcija kolembola.

3. Alternativne vrste kolembola

Druge vrste kolembola mogu se odabrati za ispitivanje u skladu sa ovom ispitnom metodom kao što su vrste *Proisotoma minuta, Isotoma viridis, Isotoma anglicana, Orchesella cincta, Sinella curviseta, Paronychiurus kimi, Orthonychiurus folsomi, Mesaphorura macrochaeta.* Potrebno je ispuniti određen broj preduslova prije korišćenja alternativnih vrsta:

- One se moraju biti nedvosmisleno identifikovati;
- Potrebno je dati obrazloženje za izbor određene vrste;
- Potrebno je osigurati da se reproduktivna biologija uključi u fazu testiranja kako bi predstavljala potecijalan cilj prilikom izlaganja;
- Potrebno je poznavanje informacija o životu vrste: starost prilikom sazrijevanja, trajanje razvoja jaja i faze razvoja vrste koja se izlaže;
- Optimalni uslovi za rast i reprodukciju treba da se obezbijede koz ispitni supstrat i ishranu;
- Varijabilnost treba da bude dovoljno niska za preciznu i tačnu procjenu toksičnosti.

Aneks 4

Ekstrakcija i utvrĐivanje broja životinja

1. **Mogu se ssprovesti dvije metode ekstrakcije**

Prva metoda: može se koristiti uređaj za ekstrakciju sa kontrolisanim gradijentom temperature zasnovan na načelima Mekfadijen (*MacFadyen*). Toplota dolazi iz elementa za grijanje na vrhu kutije za ekstrakciju (koja se reguliše pomoću termistora koji se nalazi na površini uzorka zemlje). Temperatura u ohlaĐenoj tečnosti koja okružuje posudu reguliše se pomoću termistora koji se nalazi na površini kutije za ekstrakciju (nalazi se ispod jezgra zemlje). Termistori su povezani programabilnom kontrolnom jedinicom koja podiže temperaturu u skladu sa unaprijed programiranim rasporedom. Životinje se sakupljaju u ohlaĐenu kutiju za ekstrakciju (2 °C) na čijem dnu se nalazi sloj gipsa/ugljenika. Ekstrakcija počinje na temperaturi od 25 °C nakon čega se temperatura automatski povećava svakih 12 sati za po 5 °C tokom ukupnog trajanja ekstrakcije od 48 sati. Ekstrakcija se završava nakon 12 sati na temperaturi od 40 °C.

Druga metoda: nakon eksperimentalnog perioda inkubacije, broj mladih jedinki kolembola koji je prisutan procjenjuje se na osnovu plutanja. U tom cilju, ispitivanje se vrši u posudama približne zapremine 250 ml. Na kraju ispitivanja dodaje se približno 200 ml destilovane vode. Zemlja se blago miješa mekom četkicom kako bi se kolembolama omogućilo da plutaju na površini vode. Mala količina, približno 0,5 ml crne Kentmer (*Kentmere*) boje za fotografije može se dodati u vodu kao pomoć pri brojaju čime će se povećati kontrast između vode i bijelih kolembola. Boja nije otrovna po kolembole.

Brojanje: Brojanje se može izvršiti golim okom ili pod svjetlosnim mikroskopom uz pomoć rešetke koja se stavlja preko posude za plutanje ili putem fotografisanja površine svake posude i kasnijeg brojanja kolembola na velikim formatima slika ili slajdovima. Brojanje se takoĐe može obaviti uz pomoć tehnika za digitalnu obradu slike (12). Sve tehnike je potrebno potvrditi.

Aneks 5

UtvrĐivanje maksimalnog WHC zemlje

Metoda koja slijedi za utvrĐivanje maksimalnog kapaciteta zadržavanja vode (WHC) u zemlji smatra se odgovarajućim. Opisana je u Aneksu C ISO DIS 11268-2 (Kvalitet zemlje – uticaj zagaĐujućih supstanci na gliste (vrsta *Eisenia fetida*). Drugi dio: UtvrĐivanje efekata na reprodukciju).

Prikupiti određenu količinu (npr. 5 g) supstrata zemlje za ispitivanje pomoću odgovarajućeg alata za uzimanje uzoraka (npr. spiralnom cjevčicom, itd.). Prekriti dno cjevčice mokrim komadićem filter papira, a zatim ga staviti na stalak u vodeno kupatilo. Cjevčicu treba postepeno prastvarati dok nivo vode ne pređe površinu zemlje. Potom je treba ostaviti u vodi otprilike tri sata. S obzirom da kapilari zemlje ne mogu da apsorbuju svu vodu, uzorak zemlje treba da se ostavi da se ocijedi postavljanjem cjevčice na podlogu od veoma vlažnog usitnjenog kvarcnog pijeska koji se nalazi u pokrivenoj posudi (kako bi se spriječilo isušivanje). Uzorak zatim treba da se izvaga i osuši do konstantne težine na temperaturi od 105 °C. Kapacitet zadržavanja vode treba da se izračuna na sljedeći način:

$$\mathrm{WHC}\,(\text{u \% suve mase}) = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Pri čemu je:

S = paper supstrat zasićen vodom + masa cjevčice + masa filter papira

T = tara (masa cjevčice + masa filter papira)

D = suva masa supstrata

Aneks 6

UtvrĐivanje pH vrijednosti zemlje

Metod koji slijedi za utvrĐivanje pH vrijednosti zemlje zasnovan je na opisu datom u ISO DIS 10390: Kvalitet zemlje – utvrĐivanje pH vrijednosti.

Određena količina zemlje suši se na sobnoj temperaturi najmanje 12 sati. Zatim se pravi suspenzija zemlje (koja sadrži najmanje 5 g zemlje) petostruke zapremine u 1 M rastvora analitički čistog kalijum hlorida (KCl) ili 0,01 M rastvora analitički čistog kalcijum hlorida ($CaCl_2$). Suspenzija se zatim detaljno protresa u trajanju od pet minuta nakon čega se ostavlja da se slegne najmanje 2 sata, ali ne duže od 24 sata. PH vrijednost tečne faze se nakon toga mjeri pomoću mjerača pH vrijednosti koji je kalibrisan prije svakog mjerenja uz pomoć odgovarajućeg niza puferovanih rastvora (npr. pH 4,0 i 7,0).

C.40. TOKSIKOLOŠKO ISPITIVANJE ŽIVOTNOG CIKLUSA KOMARCA (CHIRONOMIDAE) U SISTEMU SEDIMENT-VODA KORIŠĆENJEM VODE ILI SEDIMENTA OBOGAĆENIH HEMIKALIJOM

1. UVOD

Ovaj ispitni metod podudara se sa Smjernicama OECD za ispitivanje (TG) 233 (2010). Svrha ove metode je da se procijeni uticaj cjeloživotog izlaganja hemikalijama kod slatkovodnih dvokrilaca *Chironomus sp.* koja obuhvata u potpunosti prvu generaciju (parentalnu generaciju) i rani dio druge generacije (prvu filijalnu generaciju). Ona predstavlja proširenje postojećih ispitnih metoda C.28 (1) ili C.27 (15) pri kojoj se koristi scenario izlaganja u vodi ili sedimentu obogaćenih hemikalijom. U obzir se uzimaju postojeći protokoli ispitivanja toksičnosti za vrste *Chironomus riparius* i *Chironomus dilutus* (prethodnog naziva *C. tentans* (2)) koji su razvijeni u Evropi i Sjevernoj Americi i naknadno testirani u prstenastom testu. Mogu se koristiti i druge vrste komaraca koje su dobro dokumentovane npr. *Chironomus yoshimatsui*. Ukupno trajanje izlaganja je približno 44 dana za vrste *C. riparius* and *C.*

yoshimatsui i približno 100 dana za vrstu *C. dilutus.*

U ovoj ispitnoj metodi opisana su oba scenarija, izlaganje u vodi i izlaganje u sedimentu. Izbor odgovarajućeg scenarija izlaganja zavisi od namjijenjene primjene ispitivanja. Namjena scenarija izlaganja u vodi, dodavanja hemikalije vodenom stubu namijenjen je simulaciji dogaĐaja prilikom kojeg dolazi do slučajnog prskanja pesticidom i obuhvata početne najveće koncentracije na površinskim vodama. Korišćenje vode obogaćene hemikalijom je takoĐe korisno za druge vrste izlaganja (uključujući izlivanje hemikalija) ali ne i za akumulacione procese u sedimentu koji traju duže od ispitnog vremenskog perioda. U tom slučaju, kao i u slučaju kada je oticanje vode glavni način na koji pesticidi dospijevaju u vodu, prikladniji bi možda bio metod izlaganja sedimentu obogaćenom hemikalijom. Ukoliko se pokažu važnim drugi načini izlaganja, ispitni postupak se lako može prilagoditi. Na primjer, ukoliko nismo zainteresovani za raspodjelu ispitne hemikalije između vodene faze i sloja sedimenta i potrebno je na najmanju moguću mjeru smanjiti adsorpciju na sediment, može se razmotriti korišćenje zamjenskog vještačkog sedimenta (npr. kvarcnog pijeska).

Hemikalije čiji efekat je potrebno ispititati kod organizama koji žive u sedimentu mogu se nalaziti u sedimentu tokom dužeg vremenskog perioda. Organizmi koji žive u sedimentu mogu se izložiti na nekoliko načina. Relativna važnost svakog načina izlaganja i vrijeme koje je potrebno da svaki od njih doprinese sveukupnom toksičnom efektu zavisi od fizičkih i hemijskih karakteristika hemikalije. Za hemikalije koje karakteriše snažna adsorpcija ili hemikalije sa kovalentnim vezama sa sedimentom, unos kontaminirane hrane može predstavljati značajan način izlaganja. Kako se ne bi podcijenila toksičnost visoko lipofilnih hemikalija, može se razmotriti dodavanje hrane sedimentu prije dodavanja ispitne hemikalije (v. stav 31). Iz tog razloga, moguće je uključiti sve načine izlaganja i sve životne faze.

Parametri praćenja koji se prate su ukupan broj preobraženih odraslih jedinki (prve i druge generacije), brzina razvoja (prve i druge generacije), odnos polova potpuno preobraženih i živih odraslih jedniki (prve i druge generacije), broj grupa jaja po ženki (samo prve generacije) i plodnosti grupa jaja (samo prve generacije).

Snažno se preporučuje formulisani sediment. On ima nekoliko prednosti u odnosu na prirodne sedimente, kako slijedi:

- eksperimentalna varijabilnost smanjuje se jer se njime formira obnovljiva „standardizovana matrica— i potreba za pronalaženjem nekontaminiranog čistog sedimenta se eliminiše;
- ispitivanje se može započeti u bilo kom trenutku bez nailaženja na sezonske varijabilnosti u ispitnom sedimentu i nema potrebe za prethodnim tretiranjem sedimenta u cilju uklanjanja autohtone faune;
- smanjeni troškovi u poreĐenju sa sakupljanjem dovoljnih količina na terenu potrebnih za ispitivanje;
- formulisani sediment omogućava poređenje toksičnosti po studijama i u skladu sa tim, rangiranje hemikalija (3).

Značenje izraza korišćenih u ovom dijelu prikazano je u Aneksu 1.

2. NAČELO ISPITIVANJA

Larve komaraca u prvoj fazi razvoja izlažu se nizu koncentracija ispitne hemikalije u sistemu sediment-voda. Ispitivanje počinje tako što se larve u prvoj fazi razvoja (prva generacija)

stavljaju u ispitne labaratorijske čaše koje sadrže sediment sa hemikalijom ili se ispitna hemikalija dodaje u vodu nakon dodavanja larvi. Procjenjuje se preobražaj komaraca, vrijeme do njihovog preobražaja i odnos potpuno preobraženih i živih komarčića. Preobražene odrasle jedinke se prenose u kaveze za uzgajanje u cilju olakšanja rojenja, parenja i polaganja jaja. Procjenjuje se broj proizvedenih grupa jaja i njihova plodnost. Iz ovih grupa jaja, dobija se prva faza larvi druge generacije. Ove larve se stavljaju u svježe pripremljene labaratorijske čaše (procedura dodavanja hemikalije kao kod prve generacije) u cilju utvrĐivanja održivosti druge generacije kroz procjenu njihovog preobražaja, vremena potrebnog za preobražaj i odnosa polova potpuno preobraženih i živih komarčića (šematski prikaz životog ciklusa prikazan je u Aneksu 5). Svi podaci se analiziraju putem modela regresije kako bi se procijenile koncentracije koje bi uzrokovale X % smanjenja u određenom parametru praćenja ili kroz testiranje hipoteze kako bi se utvrdila najveća koncentracija bez vidljivog efekta (NOEC). Za drugo pomenutu analizu potrebno je poređenje reakcija na tretman sa odgovarajućim kontrolnim reakcijama kroz korišćenje statističkih testova. Potrebno je napomenuti da se u scenariju u kojem se koristi voda obogaćena hemikalijom, u slučaju hemikalija koje se brzo razgrađuju, kasniji stadijumi razvoja svake generacije (npr. faza lutke) mogu izložiti značajno nižim nivoima koncentracija u vodi iznad sedimenta u odnosu na larve u prvom stadijumu razvoja. Ukoliko je to problematično i potreban je uporedni nivo izlaganja u svakom životnom stadijumu, mogu se razmotriti sljedeće izmjene ispitne metode:

- paralelna ispitivanja izlaganja hemikaliji u raznim životnim stadijumima ili
- ponovljeno izlaganje hemikaliji (ili obnavljanje vode iznad sedimenta) u ispitnom sistemu tokom obije ispitne faze (prva i druga generacija), pri čemu se intervali dodavanja hemikalije (obnavljanje) prilagoĐavaju karakteristikama ponašanja ispitne hemikalije.

Ove izmjene su moguće jedino u slučaju scenarija u kojem se koristi voda obogaćena hemikalijom, ali ne u slučaju scenarija u kojem se koristi sediment obogaćen hemikalijom.

3. INFORMACIJE ISPITNOJ HEMIKALIJI

Potrebno je poznavati informacije o rastvorljivosti ispitne hemikalije u vodi, pritisku pare i log Kow, izmjerenoj ili izračunatoj raspodjeli u sedimentu i stabilnost u vodi i sedimentu. Na rapolaganju je potrebno imati pouzdan analitički metod za kvantifikaciju ispitne hemikalije u vodi iznad sedimeta, pornoj vodi i sedimentu sa poznatom i zabilježenom preciznošću i ograničenjem detekcije. Korisne informacije uključuju strukturnu formulu i čistoću ispitne hemikalije. TakoĐe su korisne karakteristike ponašanja ispitne hemikalije (npr. rasipanje, abiotičko i biotičko razlaganje, itd). Dalje smjernice za ispitivanje hemikalija sa fizičkim i hemijskim karakteristikama zbog kojih se ispitivanje teško obavlja su date pod brojem (16).

4. REFERENTNE HEMIKALIJE

Referentne hemikalije se mogu periodično ispitivati kao način osiguranja da se osjetljivost labaratorijske populacije nije promijenila. Kao u slučaju vodenih buva, bilo bi dovoljno da se obavi 48-satno ispitivanje akutne toksičnosti (nakon stava 17). Međutiim, dok ne bude dostupna validna smjernica za akutnu toksičnost, u obzir se može uzeti ispitivanje hronične toksičnosti u skladu sa Poglavljem C.28 ovog Aneksa. Primjeri referentnih toksičih supstanci koje se uspješno koriste u prstenastim testovima i validacionim studijama su:lindan, trifluralin, pentahlorofenol, kadmijum hlorid i kalijum hlorid.

5. VALIDNOST ISPITIVANJA

Kako bi ispitivanje bilo validno važe sljedeći uslovi:

- prosječna uspješnost preobražaja u kontrolnim grupama treba da bude najmanje 70% na kraju perioda izlaganja za obije generacije;
- za vrste *C. riparius* i C*. yoshimatsui*, 85% ukupnih odraslih komarčića treba da bude preobraženo u kontrolnoj grupi u obije generacije u periodu između 12. do 23. dana nakon stavljanja prvih larvi u prvom stadijumu razvoja u posude; za vrstu *C. dilutus*, prihvatljiv je period od 20 do 60 dana;
- prosječan odnos polova potpuno preobraženih i živih odraslih jedinki (kao odnosa ženki ili mužjaka) u kontrolnoj grupi obije generacije treba da bude najmanje 0,4 ali ne veći od 0,6;
- za svaki kavez za uzgajanje, broj grupa jaja u kontrolnim grupama prve generacije treba da bude najmanje 0,6 po ženki koja je dodata u kavez;
- udio plodnih grupa jaja u svakom kavezu za uzgajanje u kontrolnim grupama prve generacije treba da bude najmanje 0,6;
- na kraju perioda izlaganja za obije generacije, u svakoj posudi treba da se izmjeri pH vrijednost i koncentracija rastvorenog kiseonika. Koncentracija kiseonika treba da iznosi najmanje 60% vrijednosti zasićenosti kiseonikom (ASV ([63])), a pH vrijednost vode iznad sedimenta treba da bude između 6 i 9 u svim ispitnim posudama;
- temperatura vode ne treba da odstupa za više od ± 1,0 °C.

6. OPIS METODE ISPITIVANJA

6.1. Ispitne posude i kavezi za uzgajanje

Larve se izlažu u labaratorijskim čašama zapremine 600 ml i približnog prečnika 8,5 cm.

Mogu se koristiti i druge posude ali treba osigurati odgovarajuću dubinu vode iznad sedimenta i samog sedimenta. Površina sedimenta treba da bude dovoljno velika kako bi se obezbijedila površina od 2 do 3 cm^2 po larvi. Odnos dubine sedimentnog sloja u odnosu na dubinu vode iznad sedimenta treba da bude približno 1:4. Treba da se koriste kavezi za uzgajanje (najmanje 30 cm za sve tri dimenzije) sa gazom (gustine približno 1mm) na vrhu i najmanje sa jedne strane kaveza. U svakom kavezu se postavlja po 21 posuda za kristalizaciju za polaganje jaja koja sadrži ispitnu vodu i sediment. TakoĐe, kada je riječ o posudama za kristalizaciju, odnos dubine sedimentnog sloja u odnosu na dubinu vode iznad sedimenta treba da bude otprilike 1:4. Nakon što se grupe jaja pokupe iz posuda za kristalizaciju, stavljaju se na mikrotitarsku ploču sa 12 bunarčića (jedna grupa jaja po bunarčiću koji sadrži najmanje 2,5 ml vode obogaćene hemikalijom iz posude za kristalizaciju) nakon čega se uzorci pokrivaju poklopcem kako bi se spriječilo značajno isparavanje. Mogu se koristiti i druge posude adekvatne za čuvanje grupa jaja. Uz izuzetak mikrotitarskih ploča, sve ispitne posude i drugi uređaji koji dolaze u kontakt sa ispitnim sistemom treba da budu izraĐeni od stakla ili drugog hemijski intertnog materijala (npr. politetrafluoretilen).

6.2. Izbor vrsta

Poželjna vrsta za ispitivanje je *Chironomus riparius*. Vrsta *C. yoshimatsui* se takoĐe može korisititi. Vrsta *C. dilutus* je takoĐe odgovarajuća, ali se njome teže rukuje i za ispitivanje je potreban dug vremenski period. Detalji o metodama uzgajanja kultura dati su u Aneksu 2 za

[63] Na temperaturi od 20 °C pod standardnim atmosferskim pritiskom, ASV u slatkoj vodi iznosi 9,1 mg/l (60% iznosi 5,46 mg/l)

vrstu *C. riparius*. Informacije o uslovima uzgajanja kulture su takoĐe na rapolaganju za vrste *C. dilutus* (5) i *C. yoshimatsui* (14). Identifikacija vrsta mora da se potvrdi prije ispitivanja, ali nije potrebna prije svakog ispitivanja ako organizmi potiču od kulture uzgojene u laboratorijai.

6.3. Sediment

Poželjno je korišćenje formulisanog sedimenta (naziva se i obraĐeni, vještački ili sintetički sediment). Međutiim, ukoliko se koristi prirodni sediment, potrebno je utvrditi određene karakteristike (najmanje pH vrijednost, sadržaj organskog ugljenika, a takoĐe se preporučuje utvrĐivanje drugih parametara kao što je odnos C/N i granulometrija) i sediment ne smije biti kontaminiran niti se u njemu smiju nalaziti drugi organizmi koji mogu biti konkurencija larvama komaraca ili ih mogu pojesti. TakoĐe se preporučuje, prije ispitivanja, da se sediment, u ispitnim uslovima, priprema sedam dana. Preporučuje se sljedeći formulisani sediment (1) (20) (21), kako je opisano pod (1):

a) 4-5 % (suve mase) treseta: što moguća bliža pH vrijednost od 5,5 do 6,0; važno je da se koristi treset u praškastom obliku, fino usitnjen (veličina čestica ≤ 1 mm) koji je osušen samo na vazduhu;
b) 20 % (suve mase) kaolinske gline (poželjan sadržaj kalionita iznad 30%)
c) 75-76 % (suve mase) kvarcnog pijeska (uglavnom sitni pijesak sa više od 50% čestica između 50 i 200 µm);

d) Dejonizovana voda se dodaje kako bi se postigla vlažnost konačne smješe u opsegu od 30-50%;
e) Kalcijum karbonat hemijski čistog kvaliteta ($CaCO_3$) dodaje se kako bi se pH vrijednost konačne smješe sedimenta prilagodila na 7,0 ± 0,5;
f) Sadržaj organskog ugljenika u konačnoj smješi treba da bude 2 % (± 0,5 %) i treba da se prilagoĐava korišćenjem odgovarajućih količina treseta i pijeska, u skladu sa tačkama a) i c).

Izvor treseta, kaolinske gline i pijeska treba da bude poznat. Komponente sedimenta treba da se provjere u pogledu kontaminacije hemikalijama (npr. teški metali, organohlorna jedinjenja, orgaofosforna jedinjenja). Primjer pripreme fomulisanog sedimenta opisan je u Aneksu 3. Miješanje suvih sastojaka je takoĐe prihvatljivo ako se pokaže da se nakon dodavanja vode iznad sedimenta sastojci sedimenta ne razdvajaju (npr. ne dolazi do plutanja čestica treseta) i da je treset ili sediment dovoljno prethodno pripremljen.

6.4. Voda

Sva voda koja ima hemijske karakteristike prihvatljive vode za razrjeĐivanje u skladu sa Aneksima 2 i 4 može se koristiti kao ispitna voda. Svaka odgovarajuća voda, prirodna voda (površinska ili podzemna voda), obraĐena voda (v. Aneks 2) ili voda iz vodovoda kojoj je uklonjen hlor prihvatljiva je za uzgajanje kultura i ispitivanje, ukoliko komarci mogu u njoj da prežive tokom uzgoja i ispitivanja bez znakova stresa. Na početku ispitivanja, pH vrijednost ispitne vode treba da bude između 6 i 9, a ukupna tvrdoća vode ne treba da iznosi više od 400 mg/l kao $CaCO_3$. Međutiim, ukoliko se sumnja na postojanje interakcije između jona tvrdoće i ispitne hemikalije, potrebno je koristiti vodu manje tvrdoće (i stoga, medijumum Elendt M4 ne treba koristiti u ovoj situaciji). Istu vrstu vode treba koristiti tokom trajanja cijele studije. Karakteristike kvaliteta vode navedene u Aneksu 4 mjere se najmanje dva puta godišnje ili u slučaju kada se sumnja da su se te vrijednosti značajno promijenile.

6.4.1. Osnovni rastvori – voda obogaćena hemikalijom

Izračunavanje ispitnih koncentracija vrši se na osnovu koncentracija vodenog stuba, tj. vode iznad sedimenta. Ispitni rastvori odabranih koncentracija obično se pripremaju kroz razrjeĐivanje rastvora. Poželjno je da se rastvori pripreme rastvaranjem ispitne hemikalije u ispitnoj vodi. U nekim slučajevima će korišćenje rastvarača ili raspršivača biti potrebno za dobijanje rastvora sa odgovarajućom koncentracijom. Primjeri odgovarajućih rastvarača su aceton, etilen glikol monoetil etar, etilen glikol dimetil etar, dimetilformamid i trietilen glikol.

Raspršivači koji se mogu koristiti su Cremophor RH40, Tween 80, metil-celuloza 0,01 % i HCO-40. Koncentracija sredstva za rastvaranje u konačnom ispitnom medijumumu treba da bude minimalna (tj. ≤ 0,1 ml/l) i treba da bude ista za sve tretmane. Kada se koristi sredstvo za rastvaranje, ono ne treba da ima značajan uticaj na preživljavanje kako je otkriveno u kontrolnoj grupi sa rastvorom u poreĐenju sa negativnom kontrolnom grupom (sa vodom). Međutiim, potrebno je uložiti sve napore kako bi se izjegla upotreba ovih sredstava.

6.4.2. Osnovni rastvori – sediment obogaćen hemikalijom

Sediment obogaćen hemikalijom u određenoj koncentraciji obično se priprema dodavanjem rastvora ispitne hemikalije direktno u sediment. Osnovni rastvor ispitne hemikalije rastvoren u dejonizovanoj vodi miješa se sa formulisanim sedimentom valjkastim mlinom, mikserom za hranu ili ručno. Ukoliko se slabo rastvara u vodi, ispitna hemikalija se može rastvoriti u što manjoj količini odgovarajućeg organskog rastvarača (npr. heksan, aceton ili hloroform). Ovaj rastvor se zatim miješa sa 10 gr sitnog kvarcnog pijeska za svaku ispitnu posudu. Rastvoru se omogućava da ispari i treba ga potpuno ukloniti iz pijeska; pijesak se zatim miješa sa odgovarajućom količinom sedimenta. Jedino se lako isparljiva sredstva mogu koristiti za rastvaranje, raspršivanje ili emulgaciju ispitne hemikalije.

Treba imati u vidu da pijesak koji se dobije kroz miješanje ispitne hemikalije i pijeska treba uzeti u obzir prilikom pripreme sedimenta (tj. sediment stoga treba pripremiti sa manje pijeska). Potrebno je voditi računa da je ispitna hemikalija koja se dodaje sedimentu temeljno i jednako raspoređena. Ukoliko je potrebno, mogu se analizirati poduzorci da bi se utvrdio nivo homogenosti.

7. PLAN ISPITIVANJA

Plan ispitivanja se odnosi na izbor broja i rasporeda ispitnih koncentracija, broj posuda u svakoj koncentraciji, broj larvi po posudi, broj posuda za kristalizaciju i kaveze za uzgajanje. U daljem tekstu opisani su planovi za EC_x, NOEC i granično ispitivanje.

7.1. Plan za regresionu analizu

Ispitivanjem treba da se obuhvate koncentracija koja uzrokuje reakciju (ECx) i opseg koncentracija u okviru kojeg se nalazi efekat ispitne koncentracije koji je od interesa tako da se parametar praćenja ne izvodi van granica dobijenih podataka. Treba izbjegavati ekstrapolaciju koja je znatno niža od najniže ili znatno veća od najveće koncentracije.

Preliminarni test za određivanje oblasti koncentracija u skladu sa ispitnim metodama C.27 ili C.28 mogu da pomognu prilikom izbora odgovarajućeg opsega ispitnih koncentracija.

Kada se radi o pristupu ECx, potrebno je najmanje 5 koncentracija i osam ponavljanja za svaku koncentraciju. Za svaku koncentraciju treba da se koriste dva kaveza za uzgajanje (A i B). Osam ponavljanja se dijeli na dvije grupe od po četiri ponavljanja za svaki kavez za uzgajanje. Ovo spajanje ponavljanja potrebno je zbog broja komarčića koji su potrebni u kavezu u cilju pouzdanih procjena reprodukcije. Međutiim, druga generacija opet ima osam ponavljanja koja se pokreću iz izloženih populacija u kavezima za uzgajanje. Faktor između

koncentracija ne treba da bude veći od dva (izuzetak se može napraviti u slučajevima kada se kriva reakcije na dozu se plitko nagiba). Broj ponavljanja za svaki tretman može da se smanji na šest (tri za svaki kavez za uzgajanje) ukoliko se broj ispitnih koncentracija sa različitim reakcijama poveća. Povećanje broja ponavljanja ili skraćivanje intervala ispitnih kocentracija obično dovodi do užih intervala pouzdanosti u pogledu ECx.

7.1.1. Plan za procjenu NOEC

Kada se radi o pristupu NOEC, potrebno je pet ispitnih koncentracija sa najmanje osam ponavljanja (četiri za svaki kavez za uzgajanje, A i B) i faktor između koncentracija ne teba da bude veći od dva. Broj ponavljanja treba da bude dovoljan da se osigura odgovarajuća statistička snaga kojom će se otkriti 20% razlike u odnosu na kontrolnu grupu kod nivoa značajnosti od 5% (α = 0,05). Kada se radi o brzini razvoja, potencijalnoj i stvarnoj plodnosti obično se koristi analiza varijanse (ANOVA), nakon čega slijede Danetov test ili Vilijamsov test (22-25). Kada je riječ o stepenu preobražaja i odnosu polova možda su odgovarajući Kohran-Armitidž test, Fišerov test (sa Bonferoni ispravkom) ili Mantel-Henzalov (*MantelHaentzal*) test.

7.1.2. Granično ispitivanje

Granično ispitivanje može da se vrši (jedna ispitna koncentracija i jedna kontrolna grupa/ili više njih) ukoliko se ne uoče efekti kod proizvoljnog preliminarnog ispitivanja opsega pri najvećim koncentracijama. Svrha graničnog ispitivanja je da se ukaže na to da su svi toksični efekti ispitne hemikalije utvrĐeni na nivoima koji su veći od nivoa granične koncentracije. Predlaže se 100 mg/l za vodu i 1 000 mg/kg (suve mase) za sediment. Obično je potrebno najmanje osam ponavljanja za tretman i kontrolnu grupu. Odgovarajuća statistička snaga kojom će se otkriti 20% razlike u odnosu na kontrolnu grupu kod nivoa značajnosti od 5% (α = 0,05) treba da se pokaže. Kod metričkih reakcija (npr. stopa razvoja), t-test je odgovarajući statistički metod ukoliko podaci ispunjavaju uslove ovog testa (normalnost, homogene varijanse). T-test nejednake varijanse ili neparametarski test kao što su Vilkoks Men Vitnijev test mogu se koristiti ukoliko ovi uslovi nisu ispunjeni. Za stepen preobražaja odgovarajući je Fišerov test.

8. POSTUPAK

8.1. Uslovi izlaganja

8.1.1. Priprema sistema voda-sediment (voda obogaćena hemikalijom)

Formulisani sediment dodaje se u svaku ispitnu posudu i posudu za kristalizaciju u debljini od najmanje 1,5 cm (kod posuda za kristalizaciju ovaj sloj može biti tanji), ali maksimalno 3 cm. Voda dodaje se tako da odnos dubine sedimentnog sloja i dubine vode ne prelazi 1:4. Nakon pripreme ispitnih posuda, sistem sediment_voda se ostavlja na mjestu sa blagom aeracijom, približno sedam dana prije dodavanja larvi u prvoj fazi razvoja prve i druge generacije (v. stav 14 i Aneks 3). Tokom ispitivanja nije potrebna aeracija sistema sediment voda u posudama za kristalizaciju jer nije potrebno podržavanje preživljavanja larvi (grupe jaja se sakupljaju prije izlijeganja). U cilju izbjegavanja razdvajanja sastojaka sedimenta i ponovne suspenzije sitnih čestica, tokom dodavanja ispitne vode u vodeni stub, sediment se može pokriti plastičnim diskom dok se na njega sipa voda. Disk se odmah nakon toga uklanja. Mogu se koristiti i druga sredstva u ovu svrhu.

8.1.2. Priprema sistema voda-sediment (sediment obogaćen hemikalijom)

Sediment obogaćen hemikalijom u skladu sa stavom 16b stavlja se u posude, kao i u posudu za kristalizaciju nakon čega se dodaje voda iznad sedimenta kako bi se dobio odnos sedimenta-vode od 1:4. Dubina sloja sedimenta treba da iznosi od 1,5 do 3 cm (u posudi za kristalizaciju može biti nešto tanji sloj). Kako bi se izbjeglo razdvajanje sastojaka sedimenta i ponovna suspenzija sitnih čestica tokom dodavanja ispitne vode u ispitni stub, sediment se može pokriti plastičnim diskom dok se na njega sipa voda. Disk se odmah nakon toga uklanja. Mogu se koristiti i druga sredstva u ovu svrhu. Kada su sediment u obogaćen hemikalijom i sloj vode iznad njega pripremljeni, poželjno je da se omogući raspodjela ispitne hemikalije iz sedimenta u vodenu fazu. Poželjno je da se to uradi u uslovima temperature i aeracije koji su primijenjeni tokom ispitivanja. Odgovarajuće vrijeme postizanja ravnoteže zavisi od sedimenta i hemikalije i može se kretati od nekoliko sati do nekoliko dana, a u

rijetkim slučajevima čak do pet nedjelja. S obzirom da bi se time omogućilo vrijeme za razgradnju mnogih hemikalija, ne čeka se postizanje ravnoteže već se preporučuje period za postizanje iste od 48 sati. Međutiim, u slučaju kada je poznato da je vrijeme polurazgradnje hemikalije u sedimentu dugo (v. stav 8), vrijeme za postizanje ravnoteže se može produžiti.

Na kraju ovog dodatnog vremena, potrebno je izmjeriti koncentraciju ispitne hemikalije u vodi iznad sedimenta, pornoj vodi i sedimentu, barem u najvećoj i najmanjoj koncentraciji. Ovim analitičkom odreĐivanjima ispitne hemikalije omogućava se iizračunavanje bilansa mase i izražavanje rezultata na osnovu izmjerenih koncentracija.

Ispitne posude treba da se pokriju (npr. staklenim pločicama). Ukoliko je potrebno, tokom studije, voda može da se dosipa do prvobitne količine kako bi se nadoknadilo isparavanje. Destilovana ili dejonizovana voda treba da se dosipa kako bi se spriječilo nagomilavanje soli. Posude za kristalizaciju u kavezima za uzgajanje nisu pokrivene i mogu ali ne moraju da se dopunjavaju usljed gubitka vode tokom ispitnog perioda jer su grupe jaja jedino u kontaktu sa vodom tokom jedog dana, a posude se koriste samo u kratkoj fazi tokom ispitivanja.

8.1.3. Dodavanje ispitnih organizama

Četiri do pet dana prije dodavanja larvi u prvoj fazi razvoja prve generacije, grupe jaja treba da se izvade iz kulture i stave u male posude u podlogu za uzgajanje kulture. Mogu se koristiti stara podloga za uzgajanje iz matične kulture ili svježe pripremljena podloga. U oba slučaja, mala količina hrane, npr. nekoliko kapi filtrata iz sitno mljevenih pahuljica hrane za ribe treba da se dodaju u podlogu za uzgajanje. Treba koristiti samo svježe položene grupe jaja. Obično, izleganje larvi počinje nekoliko dana nakon polaganja jaja (2 do 3 dana za vrstu *C. riparius* na temperaturi od 20 °C i 1 do 4 dana za vrste *C. dilutus* na temperaturi od 23 °C i *C. yoshimatsui* na temperaturi od 25 °C), a rast larvi se odvija u četiri stadijuma razvoja, od kojih svaki traje 4 do 8 dana. Za ispitivanje treba da se koriste larve u prvom stadijumu razvoja (najviše 48 sati nakon izlijeganja). Stadijum razvoja larvi potencijalno može da se provjeri uz pomoć širine čaure glave (7).

Dvadeset larvi u prvom stadijumu razvoja prve generacije nasumično se raspodjeljuju u svaku ispitnu posudu koja sadrži sistem sediment–voda, uz pomoć tupe pipete. Aeracija vode se zaustavlja prilikom dodavanja larvi u ispitnu posudu i tako treba da ostane naredna 24 časa nakon dodavanja larvi. U skladu sa planom ispitivanja koji se koristi (v. st. 19 i 20), broj larvi koji se koristi za svaku koncentraciju je najmanje 120 (6 ponavljanja po koncentraciji) za ECx pristup i 160 za NOEC pristup (8 ponavljanja po koncentraciji). U planu ispitivanja sa sedimentom obogaćenim hemikalijom, izlaganje počinje dodavanjem larvi.

8.1.4. Dodavanje hemikalije u vodu iznad sedimenta

Dvadeset četiri časa nakon dodavanja larvi u prvom stadijumu razvoja prve generacije, ispitna hemikalija se dodaje u vodeni stub iznad sedimenta i obavlja se blaga aeracija (za moguće izmjene plana ispitivanja v. stav 7). Manje količine osnovnih rastvora ispitne hemikalije dodaju se ispod površine vode uz pomoć pipete. Voda iznad sedimenta nakon toga treba pažljivo da se promiješa kako se sediment ne bi umiješao u vodu. Kod primjene plana ispitivanja sa vodom obogaćenom hemikalijom, izlaganje počinje dodavanjem hemikalije u vodu (odnosno prvog dana nakon dodavanja larvi).

8.1.5. Sakupljanje preobraženih odraslih jedinki

Preobraženi komarčići prve generacije sakupljaju se najmanje jednom, ali poželjno je dva puta dnevno (v. tačku 36) iz ispitnih posuda uz pomoć aspiratora, sisaljke ili sličnog uređaja (v. Aneks 5). Posebno treba voditi računa da se odrasle jedinke ne povrijede. Sakupljeni komarčići iz četiri ispitne posude u jednom tretmanu prenose se u kavez za uzgajanje za koji su unaprijed određene. Na dan prvog (mužjak) preobražaja, u posude za kristalizaciju dodaje se hemikalija pomoću dodavanja male količine osnovnog rastvora ispitne hemikalije pipetom ispod površine vode (plan ispitivanja sa vodom obogaćenom hemikalijom). Vodu iznad sedimenta zatim treba pažljivo izmiješati kako se sediment ne bi pomiješao. Koncentracija ispitne hemikalije u posudi za kristalizaciju nominalno je jednaka onoj u ispitnim posudama koje su opredijeljene tom kavezu za uzgajanje. Kada se radi o planu sa sedimentom kojem je dodata hemikalija, posude za kristalizaciju se pripremaju otprilike 11 dana nakon početka izlaganja (odnosno dodavanja larvi prve generacije) kako bi se postigla ravnoteža tokom 48 sati prije polaganja prvih grupa jaja.

Grupe jaja se iz posude za kristalizaciju iz kaveza za uzgajanje sakupljanju pincetama ili tupom pipetom. Svaka grupa jaja stavlja se u posudu koja sadrži podlogu za uzgajanje

kutlure iz posude za kristalizaciju iz koje je sakupljena (npr. iz bunarčića mikrotitarske ploču sa 12 uzoraka zajedno sa najmanje 2,5 ml podloge). Posude zajedno sa grupama jaja pokrivaju se poklopcem da bi se spriječilo značajno isparavanje. Grupe jaja se čuvaju radi posmatranja najmanje šest dana nakon polaganja kako bi se klasifikovala kao plodna ili neplodna.

Za početak druge generacije, najmanje tri, ali je poželjno šest plodnih grupa jaja biraju se iz svakog kaveza za uzgajanje i zajedno sa hranom omogućava im se izlijeganje. Ove grupe jaja su trebale da se proizvedu na vrhuncu njihovog polaganja koje se obično događa tokom 19. dana ispitivanja u kontrolnim grupama. U idealnom slučaju, druga generacija svih tretmana pokreće se istog dana, ali usljed efekata na razvoj larvi povezanih sa hemikalijom, ovo možda nije uvijek moguće. U tom slučaju, grupe sa većim koncentracijama mogu se pokrenuti kasnije u odnosu na grupe sa nižim koncentracijama i kontrolnim (rastvor) grupama.

U planu ispitivanja sa vodom obogaćenom hemikalijom, sistem sediment–voda za drugu generaciju se priprema dodavanjem ispitne hemikalije u vodeni stub iznad sedimenta približno jedan sat prije dodavanja larvi u prvom stadijumu razvoja u ispitne posude. Male količine rastvora ispitne hemikalije dodaju se ispod površine vode uz pomoć pipete. Zatim je vodu iznad sedimenta potrebno pažljivo promiješati kako se sediment ne bi izmiješao. Nakon dodavanja hemikalije, obavlja se blaga aeracija.

U planu ispitivanja sa sedimentom obogaćenim hemikalijom, posude za izlaganje koje sadrže sistem sediment–voda za drugu generaciju pripremaju se na isti način kao za prvu generaciju.

Dvadeset larvi u prvom stadijumu razvoja (48 sati nakon izlijeganja) druge generacije nasumično se raspodjeljuju u svaku ispitnu posudu koja sadrži sistem sediment–voda, uz pomoć tupe pipete. Aeracija vode treba da se zaustavi prilikom dodavanja larvi u prvom stadijumu razvoja u ispitne posude i tako treba da ostane naredna 24 časa nakon dodavanja larvi . U skladu sa planom ispitivanja koji se koristi (v. st. 19 i 20), broj larvi koji se koristi za svaku koncentraciju je najmanje 120 (6 ponavljanja po koncentraciji) za ECx pristup i 160 za NOEC pristup (8 ponavljanja po koncentraciji).

8.1.6. Hrana

Neophodno je da se larve u ispitnim posudama hrane, po mogućnosti svakog dana ili najmanje tri puta nedjeljno. Hrana za ribe (suspenzija u vodi ili sitno samljevena hrane npr. Tetra-Min ili Tetra-Phyll; za detalje v. Aneks 2) u količini od 0,25 - 0,5 mg (0,35 - 0,5 mg za vrstu *C. yoshimatsui*) po larvi svakog dana odgovarajuća je količina hrane za mlade larve tokom prvih 10 dana njihovog razvoja. Nešto više hrane može biti potrebno za starije larve: 0,5 - 1,0 mg po larvi svakog dana treba da bude dovoljno tokom trajanja ostatka ispitivanja. Porcije hrane treba da se smanje u svim grupama i kontrolnoj grupi ako se u kontrolnim grupama primijeti razvoj gljivica ili smrtnost. Ukoliko se razvoj gljivica ne može zaustaviti, ispitivanje treba ponoviti.

Toksikološka relevantnost izlaganja gutanjem obično je veća kod hemikalija sa većim afinitetom prema organskom ugljeniku ili hemikalijama koje se kovalentnim vezama vežu za sediment. Stoga, prilikom ispitivanja hemikalija sa takvim svojstvima, može se dodati količina hrane potrebna kako bi se osiguralo preživljavanje i prirodan razvoj larvi u formulisani sediment prije perioda stabilizacije, u zavisnosti od regulatornih potreba. U cilju sprečavanja pogoršanja kvaliteta vode, umjesto riblje hrane treba da se koristi biljni materijal npr. dodavanje 0,5% (suve mase) sitno mljevenog lišća koprive (*Urtica dioica*), duda (*Morus alba*), bijele djeteline (*Trifolium repens*), spanaća (*Spinacia oleracea*) ili drugog biljnog materijala (*Cerophyl* ili α-celuloza). Dodavanje cijele porcije izvora organske hrane u sediment prije dodavanja hemikalije nije beznačajno u pogledu kvaliteta vode i biološkog učinka (21) niti predstavlja standardizovan metod, ali su najnovije studije ukazale na to da ova metoda funkcioniše (19) (26). Odraslim komarčićima u kavezima za uzgajanje obično ne treba hrana ali se potencijalna i stvarna plodnost poboljšavaju kada se jastučići vate natope zasićenim šećernim rastvorom i daju kao izvor hrane preobraženim odraslim jedinkama (34).

8.1.7. Uslovi inkubacije

Blaga aeracija vode iznad sedimenta u ispitnim posudama obavlja se 24 sata nakon dodavanja larvi u prvom stadijumu razvoja obije generacije i nastavlja se tokom trajanja ispitivanja (potrebno je voditi računa da se koncetracija rastvorenog kiseonika ne spusti ispod 60% ASV). Aeracija se obavlja kroz staklenu Pasterovu *(Pasteur)* pipetu kod koje je vrh pričvršćen 2-3 cm iznad sloja sedimenta otpuštanjem nekoliko mjehurića po sekundi. Prilikom ispitivanja lako isparljivih hemikalija, potrebno je razmotriti izbjegavanje aeracije u sistemu sediment voda, dok istovremeno validacioni kriterijum od najmanje 60% ASV (stav 10) treba ispuniti. Dalje smjernice se mogu naći pod.

Ispitivanje sa vrstom *C. riparius* sprovodi se na konstantnoj temperaturi od 20 °C (± 2 °C). Za vrste *C. dilutus* i *C. yoshimatsui*, preporučene temperature su 23 °C odnosno 25 °C (± 2 °C). Potreban je fotoperiod u trajanju od 16 sati i intenzitet svijetla treba da bude između 500 do 1 000 luksa. Još jedan sat zore ili sumraka može se uključiti za kaveze za uzgajanje.

8.1.8. Trajanje izlaganja

Plan ispitivanja sa vodom obogaćenom hemikalijom: Period izlaganja prve generacije počinje kada se ispitna hemikalija doda u vodu iznad sedimenta u ispitnim posudama (što je jedan dan nakon dodavanja larvi – za moguće izmjene plana izlaganja, v. stav 7). Izlaganje druge generacije larvi počinje odmah jer se one dodaju u sistem sediment-voda u koji je hemikalija već dodata. Maksimalno trajanje izlaganja za prvu generaciju je 27 dana, a za drugu generaciju 28 dana (larve prve generacije provode jedan dan u posudama bez izlaganja) za vrste *C. riparius* i *C. yoshimatsui*. S obzirom na preklapanje, ukupno trajanje ispitivanja je približno 44 dana. Za vrstu *C. dilutus*, maksimalno trajanje izlaganja je 64 i 65 dana, za prvu odnosno za drugu generaciju. Ukupno trajanje je približno 100 dana.

Plan ispitivanja sa sedimentom obogaćenim hemikalijom: izlaganje počije dodavanjem larvi i traje najviše 28 dana za obije generacije vrsta *C. riparius* i *C. yoshimatsui* i najviše 65 dana za obije generacije vrste *C. dilutus*.

8.2. Zapažanja *8.2.1. Preobražaj*

Utvrđuje se vrijeme razvoja i ukupan broj potpuno preobraženih i živih muških i ženskih komarčića. Mužjaci se lako prepoznaju po svojoj perastoj anteni i tankom tijelu.

Ispitne posude obije generacije treba da se posmatraju najmanje tri puta nedjeljno kako bi se izvršila vizuelna procjena svakog neuobičajenog ponašanja larvi (npr. napuštanje sedimenta, neobično plivanje) u poređenju sa kontrolnom grupom. Tokom perioda preobražaja, koji počinje približno 12 dana nakon dodavanja larvi za vrste *C. riparius* i *C. yoshimatsui* (nakon 20 dana za vrstu *C. dilutus*), preobraženi komarčići se broje i utvrđuje se njihov pol najmanje jednom, a poželjno je dva puta dnevno (rano uveče i kasno popodne). Nakon identifikacije, komarčići prve generacije pažljivo se uklanjaju iz posuda i prenose u kaveze za uzgajanje. Komarčići druge generacije uklanjaju se i ubijaju nakon identifikacije. Sve grupe jaja položene u ispitnim posudama prve generacije treba pojedinačno da se sakupe i prenesu u najmanje 2,5 ml vode iz koje su sakupljene na mikroploče sa 12 bunarčića (ili drugu odgovarajuću posudu) koje su pokrivene poklopcem kako bi se spriječilo značajno isparavanje. Broj mrtvih larvi i vidljivih lutki koje se nisu preobrazile takođe treba zabilježiti. Primjeri kaveza za uzgajanje, ispitne posude i sisaljke navedeni su u Aneksu 5.

8.2.2. Razmnožavanje

Efekti na razmnožavanje procjenjuju se kroz broj grupa jaja koje položi prva generacija komarčića i plodnost tih grupa jaja. Jedom dnevno, grupe jaja sakupljaju se iz posude za kristalizaciju koja se nalazi u svakoj posudi za razmnožavanje. Grupe jaja treba da se sakupe i prenesu sa najmanje 2,5 ml vode iz koje su sakupljena na mikroploču sa 12 bunarčića (jedna grupa jaja u svakom bunarčiću) ili drugu odgovarajuću posudu, koji su pokrivene poklopcem da bi se spriječilo značajno isparavanje. Karakteristike koje slijede dokumentuju se za svaku grupu jaja: dan nastanka, veličina (normalna, odnosno 1,0 ± 0,3 cm ili mala; obično ≤ 0,5 cm) i struktura (normalna=oblik banane sa spiralnim nizom jaja ili abnormalna, npr. nespiralni niz jaja) i polodnost (plodna ili neplodna). Tokom perioda od šest dana nakon nastanka, procjenjuje se plodnost grupe jaja. Grupa jaja smatra se plodnom kada se izlegne najmanje jedna trećina jaja. Ukupan broj ženki koje su stavljene u kavez za uzgajanje koristi se da se izračuna broj grupa jaja za svaku ženku i broj plodnih grupa jaja za svaku ženku. Po potrebi, broj jaja u jednoj grupi jaja može da se procijeni na način kojim se ta jaja neće uništiti kroz metodu brojanja prstena (detaljnije objašnjeno u st. 32 i 33).

8.3. Analitička mjerenja

8.3.1. Koncentracija ispitne hemikalije

U najmanjoj mjeri potrebno je analizirati uzorke vode iznad sedimenta, porne vode i sedimenta na početku izlaganja (u slučaju vode obogaćene hemikalijom poželjno je jedan sat nakon dodavanja) i na kraju ispitivanja, u najvećim i najmanjim koncentracijama. Ovo se odnosi na posude obije generacije. Iz posuda za kristalizaciju iz kaveza za uzgajanje analizira se samo voda iznad sedimenta s obzirom da su grupe jaja sa njom došle u dodir (za plan ispitivanja sedimenta obogaćenog hemikalijom, može se uzeti u obzir analitička potvrda koncentracije sedmenta). Po potrebi se mogu ssprovesti dalja mjerenja sedimenta, porne vode ili vode iznad sedimenta tokom ispitivanja. Ovim utvrĐivanjima koncentracije ispitne hemikalije pružaju se infromacije o ponašanju/raspodjeli ispitne hemikalije u sistemu voda-sediment. Uzorkovanje sedimenta i porne vode na početku i tokom ispitivanja (v. stav 39) zahtijeva dodatne ispitne posude kako bi se obavila analitička utvrĐivanja. Mjerenja u sedimentu u planu ispitivanja sa vodom obogaćenom hemikalijom možda neće biti potrebno ukoliko je raspodela ispitne hemikalije između vode i sedimenta jasno utvrĐena u studiji voda/sediment u uporednim uslovima (npr. odnos sedimenta prema vodi, vrsta primjene, sadržaj organskog ugljenika u sedimentu) ili ako su izmjerene koncentracije u vodi iznad sedimenta u opsegu od 80% do 120% nominalnih ili izmjerenih početnih koncentracija.

Kada se izvrše prelazna mjerenja (npr. 7. i/ili 14. dana) i ukoliko su za analizu potrebni veliki uzorci koji se ne mogu uzeti iz ispitnih posuda bez uticaja na ispitni sistem, vrše se analitička utvrĐivanja na uzorcima iz dodatnih ispitnih posuda koje su tretirane na isti način (uključujući prisustvo ispitnih organizama), ali se ne koriste za biološka zapažanja.

Preporučeni postupak za izolovanje intersticijalne (=porne) vode je centrifugiranje na npr. 10 000g na temperaturi od 4 °C 30 minuta. Međutiim, ukoliko je pokazano da se ispitna hemikalija ne adsorbuje na filtere, filtracija može biti prihvatljiva. U nekim slučajevima možda neće biti moguće da se analiziraju koncentracije u pornoj vodi jer veličina uzorka može biti premala.

8.3.2. Fizičko-hemijski parametri

PH vrijednost, rastvoreni kiseonik u vodi i temperatura vode u ispitnoj posudi i posudama za kristalizaciju treba da se mjere na odgovarajući način (v. stav 10). Tvrdoća i amonijak treba da se mjere u kontrolnim grupama, jednoj ispitnoj posudi i jednoj posudi za kristalizaciju pri najvećoj koncentraciji na početku i na kraju ispitivanja.

9. PODACI I IZVJEŠTAVANJE

9.1. Obrada rezultata

Svrha ovog ispitivanja životnog ciklusa je da se utvrdi uticaj ispitne hemikalije na razmnožavanje i, za dvije generacije, stopa razvoja i ukupan broj potpuno preobraženih i živih mužjaka i ženki komarčića. Podatke mužjaka i ženki treba objediniti kako bi se izračunao odnos preobražaja. Ukoliko ne postoje statistički značajne razlike između osjetljivosti kod brzine razvoja suprotnih polova, za statističku analizu mogu se objediniti rezultati mužjaka i ženki.

Koncentracije koje uzrokuju reakciju izražene kao koncentracije u vodi iznad sedimenta (za vodu obogaćenu hemikalijom) ili sedimentu (za sediment obogaćen hemikalijom) iizračunavaju se obično na osnovu izmjerenih koncentracija na početku izlaganja (v. stav 38). Stoga, za vodu obogaćenu hemikalijom, iizračunava se prosjek koncentracija koje se obično mjere na početku izlaganja u vodi iznad sedimenta posuda za obije generacije i onih u posudama za kristalizaciju za svaki tretman. Kada se radi o sedimentu obogaćenom hemikalijom, iizračunava se prosjek koncentracija koje se obično mjere na početku izlaganja

u posudama za obije generacije (i po mogućnosti onih u posudama za kristalizaciju) za svaki tretman.

U cilju iizračunavaja procjene vrijednosti, odnosno vrijednosti ECx, kao stvarna ponavljanja mogu se koristiti statistički podaci za svaku posudu i svaki kavez za uzgajanje. Prilikom izračunavanja intervala pouzdanosti za svaku vrijednost ECx, potrebno je uzeti u obzir varijabilnost između posuda ili treba pokazati da je ova varijabilnost tako mala da se može zanemariti. Kada se model prilagoĐava metodi najmanjeg kvadrata, potrebno je primijeniti transformaciju na statističke podatke za svaku posudu kako bi se unaprijedila homogenost varijanse. Međutiim, vrijednosti ECx treba da se izračunaju nakon što se izvrši transformacija odgovora u prvobitnu vrijednost (31).

Kada je cilj statističke analize utvrĐivanje vrijednosti NOEC kroz testiranje hipoteze, potrebno je uzeti u obzir varijabilnost između posuda, koja je zagarantovana korišćenjem metoda ANOVA (npr. Vilijamsov ili Danetov test). Vilijamsov test bi bio odgovarajući kada se u teoriji očekuje reakcija na monotonu dozu, a Danetov test bi bio odgovarajući kada se hipoteza o monotoničnosti ne može održati. Kao alternativno rješenje, odgovarajući mogu biti i jači testovi (27) u situacijama kada postoje kršenja uobičajenih pretpostavki ANOVA.

9.1.1. Odnos preobražaja

Odnosi preobražaja su kvantalni podaci i mogu se analizirati Kohran-Armitidžovim testom koji se primjenjuje postupnim snižavanjem kada se očekuje reakcija na monotoničnu dozu i kada su ovi podaci u skladu sa tim očekivanjem. Ukoliko to nije slučaj, može se koristiti Fišerov ili Mantel-Henzalov test sa Bonferoni-Holm prilagoĐenim p-vrijednostima. Ukoliko postoje dokazi o većoj varijabilnosti između ponavljanja u okviru iste koncentracije nego što bi se na to ukazalo binomnom distribucijom (često se naziva i „ekstra-binomna— varijansa) potrebno je ssprovesti strogi Kohran-Armitidž ili Fišerov test kao što je predloženo pod (27).

Utvrđuje se ukupan broj preobraženih živih komarčića (mužjaka i ženki) u svakoj posudi, n_e, i dijeli se brojem uvedenih larvi, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

gdje je:

ER = odnos preobražaja

n_e = broj preobraženih živih komarčića po posudi

n_a = broj uvedenih larvi po posudi (obično 20)

Kada je n_e veće od n_a (odnosno kada se nenamjerno uvede više od predviĐenog broja larvi), n_a treba da se izjednači sa n_e.

Alternativni pristup koji je najbolji za velike uzorke, kada postoji ekstra binomna varijansa, je da se odnos preobražaja tretira kao kontinuirana rekacija i da se koriste postupci u u skladu sa tim ER podacima. Veliki uzorak se ovdje definiše kao broj preobraženih i broj nepreobraženih komarčića koji je veći od pet, po ponavljanju (posudi).

U cilju primjene metoda ANOVA, vrijednosti ER treba prvo da se transformišu kroz transformaciju arkus sinus kvadratni korijen ili Tuki-Frimenovu (*Tukey-Freeman*) transformaciju kako bi se dobila približna normalna distribucija i izjednačile varijanse. Kohran-Armitidž, Fišerov (Bonferoni) ili Mantel-Henzalov test mogu se primjenjivati prilikom korišćenja apsolutnih frekvencija. Transformacija arkus sinus kvadratni korijen primjenjuje se kroz inverzni sinus (sin-1) kvadratnog korijena ER.

Za odnose preobražaja vrijednosti ECx obračunavaju se uz pomoć regresione analize (probit, logit ili Veibulove modele) (28). Ukoliko je regresiona analiza neuspješna (npr. kada se dobiju dva djelimična odgovora), druge neparametarske metode mogu se koristiti kao što je pokretni prosjek ili jednostavna interpolacija.

9.1.2. Brzina razvoja

Srednje vrijeme razvoja predstavlja srednji vremenski period između uvođenja larvi (0. dan ispitivanja) i preobražaja eksperimentalne grupe komarčića (za iizračunavanje stvarnog vremena razvoja, u obzir treba da se uzme starost larve u vrijeme uvođenja). Stopa razvoja (jedinica: 1/dan) je recipročna vremenu razvoja i predstavlja onaj dio razvoja larve koji se događa svakog dana. Brzina razvoja je poželjnija za procjenu ovih studija toksičnosti sedimenta jer je njena varijansa niža, homogenija je i bliža normalnoj raspodjeli u poređenju sa vremenom razvoja. Stoga, snažniji postupci parametarskih ispitivanja mogu se koristiti kod brzine razvoja za razliku od vremena razvoja. Za stopu razvoja kao kontinuiranog odgovora, vrijednosti ECx mogu se procijeniti kroz regresionu analizu. Vrijednost NOEC za srednju brzinu razvoja može se utvrditi kroz ANOVA metode, npr. Vilijamsov ili Danetov test. S obzirom da se mužjaci preobraze brže u odnosu na ženke, tj. imaju veću brzinu razvoja, logično je da se stopa razvoja za svaki pol iizračunava odvojeno pored izračunavanja brzine razvoja ukupnog broja komarčića.

Za statističko ispitivanje, za broj komarčića koji se posmatraju na dan pregleda *x* pretpostavlja se da su se preobrazili u vremenskom intervalu između dana x i dana x-1

(1=trajanje intervala pregleda, obično jedan dan). Srednja stopa razvoja po posudi ($\overline{x}$) obračunava se prema:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i X_i}{n_e}$$

gdje je:

$\overline{x}$: srednja stopa razvoja po posudi i : indeks intervala pregleda m : maksimalan broj intervala pregleda f_i : broj preobraženih komarčića tokom intervala pregleda *i* n_e : ukupan broj preobraženih komarčića na kraju eksperimenta (= Σf_i) x_i : brzina razvoja komarčića preobraženih u intervalu *i*

$$x_i = 1/dan_i - \frac{l_i}{2}$$ gdje je:

dan_i : dan pregleda (dani od uvođenja larvi) l_i : dužina intervala pregleda i (dani, obično 1 dan)

9.1.3. Odnos polova

Odnosi polova su kvantalni podaci pa ih stoga treba procijeniti uz pomoć Fišerovog testa ili uz pomoć nekih drugih odgovarajućih metoda. Prirodan odnos polova za vrstu *C. riparius* je jedan, tj. jednak broj mužjaka i ženki. Za obije generacije, podacima o odnosu polova treba jednako da se postupa. S obzirom da je maksimalan broj komarčića po posudi (tj. 20) premali za značajnu statističku analizu, sabira se ukupan broj potpuno preobraženih i živih komarčića za svaki pol u svim posudama tokom jednog tretmana. Ovi sirovi podaci se

ispituju u odnosu na podatke iz (rastvor) kontrolne grupe ili sumirane podatke iz kontrolnih grupa u tabeli kontigencije 2 x 2.

9.1.4. Razmnožavanje Razmnožavanje, kao potecijalna plodnost, obračunava se kao broj grupa jaja po ženki. Konkretnije, ukupan broj grupa jaja koje se proizvedu u kavezima za uzgajanje dijeli se ukupnim brojem živih i neoštećenih ženki koje su dodate tom kavezu. Vrijednost NOEC za potencijalnu plodnost može se utvrditi kroz metode ANOVA, npr.Vilijamsov ili Danetov test.

Stvarna plodnost grupa jaja koristi se za određivanje broja plodnih grupa jaja po ženki. Ukupan broj plodnih grupa jaja proizvedenih u kavezu za uzgajanje dijeli se ukupnim brojem živih i neoštećenih ženki koje su tom kavezu dodate. Vrijednost NOEC za stvarnu plodnost može se utvrditi kroz metode ANOVA, npr. Vilijamsov ili Danetov test.

9.2. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju treba da sadrži informacije koje slijede:

9.2.1. Ispitna hemikalija:

- fizička priroda i fizička i hemijska svojstva (rastvorljivost u vodi, pritisak pare, log Kow, koeficijent raspodjele u zemlji (ili u sedimentu ako je na rapolaganju), stabilnost u vodi i sedimentu, itd.);
- hemijski identifikacioni podaci (opšti naziv, hemijski naziv, strukturna formula, broj CAS, itd.) uključujući čistoću i analitičku metodu kvanitifkacije ispitne hemikalije.

9.2.2. Ispitne vrste:

- korišćeni ispitni organizmi: vrste, naučni naziv, izvor organizama i uslovi uzgajanja;
- informacije o načinu na koji je postupano sa grupama jaja i larvama;
- informacije o postepenu sa preobraženim odraslim jedinkama prve generacije uz pomoć sisaljke, itd. (v. Aneks 5)
- starost ispitnih organizama u vrijeme stavljanja prve i druge generacije u prve ispitne posude.

9.2.3. *Uslovi ispitivanja*:

- korišćeni sediment, odnosno prirodni ili formulisani (vještački) sediment;
- prirodni sediment: mjesto i opis mjesta iz kojeg je uzet uzorak, uključujući kada je primjenjivo, informacije o prethodnoj kontaminaciji; karakteristike sedimenta: pH vrijednost, sadržaj ugljenika, odnos C/N i granulometrija (ako je primjenjivo).
- formulisani sediment: priprema, sastojci i karakteristike (sadržaj organskog ugljenika, pH vrijednost, vlaga, itd. izmjereni na početku ispitivanja);
- priprema ispitne vode (ako se koristi obraĐena voda) i karakteristike (koncentracija kiseonika, pH vrijednost, tvrdoća, itd. izmjereni na početku ispitivanja);
- dubina sedimenta i vode iznad sedimenta za ispitne posude i posude za kristalizaciju;
- zapremina vode iznad sedimenta i porne vode, masa mokrog sedimenta sa i bez porne vode u ispitnim posudama i posudama za kristalizaciju;
- ispitne posude (materijal i veličina);
- posude za kristalizaciju (materijal i veličina);

- kavezi za uzgajanje (materijal i veličina);
- metoda pripreme osnovnih rastvora i ispitnih koncentracija za ispitne posude i posude za kristalizaciju;
- dodavanje ispitne hemikalije u ispitne posude i posude za kristalizaciju: ispitne koncentracije, broj ponavljanja i rastvori, po potrebi;
- uslovi inkubacije za ispitne posude: temperatura, ciklus svijetlosti i jačina, aeracija (mjehurića po sekundi);
- uslovi inkubacije za kaveze za uzgajanje i posude za kristalizaciju: temperatura, ciklus svjetlosti i jačina;
- uslovi inkubacije za grupe jaja u mikro pločama (ili drugim posudama): temperatura, ciklus svjetlosti i intenzitet;
- detaljne informacije o ishrani uključujući vrstu hrane, pripremu, količinu i režim hranjenja.

9.2.4. Rezultati:

- nominalne ispitne koncentracije, izmjerene ispitne koncentracije i rezultati svih analiza u cilju utvrĐivanja koncentracije ispitne hemikalije u ispitnim posudama i posudama za kristalizaciju;
- kvalitet vode u ispitnim posudama i posudama za kristalizaciju, odnosno pH vrijednost, temperatura, rastvoreni kiseonik, tvrdoća i amonijak;
- dodavanje vode usljed isparavanja ispitne vode u ispitnim posudama, ako potrebno;
- broj preobraženih komarčića mužjaka i ženki po posudi po danu za prvu i drugu generaciju;
- odnos polova potpuno preobraženih i živih komarčića po tretmanu za prvu i drugu generaciju;
- broj nepreobraženih larvi kao komarčića po posudi za prvu i drugu generaciju;
- procenat/udio preobražaja po ponavljanju i ispitnoj koncentraciji (za komarčiće mužjaka i ženki zajedno) za prvu i drugu generaciju;
- srednja stopa razvoja potpuno preobraženih i živih komarčića po ponavljanju i brzini tretmana (odvojeno za komarčiće mužjaka i ženki i zajedno) za prvu i drugu generaciju;
- broj grupa jaja položenih u posude za kristalizaciju po kavezu za uzgajanje i danu:
- karakteristike svake grupe jaja (veličina, oblik i plodnost);
- potencijalna plodnost- ukupan broj grupa jaja po ukupnom broju ženki dodatih u kavez za uzgajanje;
- stvarna plodnost – ukupan broj plodnih grupa jaja po ukupnom broju ženki dodatih u kavez za uzgajanje;
- procjena toksičnih parametara praćenja, npr. ECx (i sa tim povezani intervali pouzdanosti), NOEC i statističke metode koje se koriste za utvrĐivanje ovih vrijednosti;
- razmatranje rezultata, uključujući svaki uticaj na ishod ispitivanja koji nastaje usljed odstepena od ove ispitne metode.

Aneks 1

Značenje izraza

Značenje izraza koje slijedi važi za ovu ispitnu metodu :

Hemikalija je supstanca ili smješa.

Formulisani sediment ili obrađeni, vještački ili sintetički sediment je smješa materijala koji se koriste kao imitiacija fizičkih komponenti prirodnog sedimenta.

Voda iznad sedimenta je voda koja se nalazi iznad sedimenta u ispitnoj posudi.

Intersticijalna voda ili porna voda je voda koja se nalazi u prostoru između sedimenta i čestica zemlje.

Voda obogaćena hemikalijom je ispitna voda u koju se dodaje hemikalija.

Ispitna hemikalija je svaka supstanca ili smješa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

Aneks 2

Preporuke za uzgoj kulture *Chironomus riparius*

Larve vrste *Chironomus* mogu se uzgajati u posudama za kristalizaciju ili velikim kontejnerima. Sitni kvarcni pijesak nanosi se u tankom sloju debljine 5 do 10 mm na dnu kontejnera. Dijatomejska zemlja takođe se pokazala kao odgovarajući supstrat (dovoljan je tanak sloj od samo nekoliko milimetara). Zatim se dodaje odgovarajuća voda dubine od nekoliko cm. Nivo vode treba da se dopunjava po potrebi kako bi se nadoknadio gubitak usljed ispravanja i spriječilo isušivanje. Voda se po potrebi može zamijeniti. Potrebno je obezbijediti blagu aeraciju. Posude za uzgajanje larvi treba da se čuvaju u odgovarajućim kavezima kojim će se spriječiti bijeg preobraženih odraslih jedinki. Kavez treba da bude dovoljno velik kako bi se omogućilo rojenje preobraženih odraslih jedinki, jer u suprotnom neće doći do parenja (najmanje oko 30 × 30 × 30 cm).

Kavezi treba da se čuvaju na sobnoj temperaturi ili u prostoriji sa istim očvrstenjem na temperaturi od 20 ± 2 °C sa fotoperiodom od 16 sati svjetlosti (jačine oko 1000 luksa) i 8 sati mraka. Informacije ukazuju na to da vlažnost vazduha ispod 60% relativne vlažnosti može nepovoljno da utiče na razmnožavanje.

1. Voda za razređivanje

Svaka odgovarajuća voda ili sintetička voda može da se koristi. Obično se koriste izvorska voda, voda iz vodovoda i vještački medijumum (npr. Elendt „M4‖ ili „M7‖, v. dolje). Potrebna je aeracija vode prije upotrebe. Ukoliko je potrebno, voda za uzgoj kulture može se obnoviti pažljivim izlivanjem ili sipanjem kroz sifon korišćene vode iz posuda za uzgoj kulture prilikom čega se cjevčice sa larvama ne smiju uništiti.

2. Hranjenje larvi

Larve vrste *Chironomus* treba da se hrane pahuljicama hrane za ribe (Tetra Min®, Tetra Phyll® ili neka druga slična vrsta hrane za ribe), približno 250 mg po posudi dnevno. Ovo se može dati kao suvi mljeveni prah ili kao suspenzija u vodi: 1,0 g pahuljica dodaje se u 20 ml vode za razređivanje i i miješa se da se dobije homogena smješa. Ova smješa se može davati u količini od 0,5 ml po posudi svakog dana (protresti prije upotrebe). Većim larvama može se dati više hrane.

Ishrana se prilagođava u zavisnosti od kvaliteta vode. Ukoliko podloga za uzgajanje kulture postane „mutna—, treba smanjiti hranu. Dodavanje hrane treba pažljivo da se prati. Premalo hrane će uzrokovati prenos larvi ka vodenom stubu, a previše hrane će uzrokovati povećanu aktivnost mikroba i smanjiti koncentracije kiseonika. Oba ova uslova mogu dovesti do smanjenja brzine ravoja.

Neke ćelije zelenih algi (npr. *Scenedesmus subspicatus, Chlorella vulgaris*) takoĐe se mogu dodati kada se postave nove posude za uzgajanje kultura.

3. Ishrana preobraženih odraslih jedinki

Nekim eksperimentima je ukazano da jastučići vate natopljeni zasićenim šećernim rastvorom mogu poslužiti kao izvor hrane za preobražene odrasle jedinke

4. Preobražaj

Pri temperaturi od 20 ± 2 °C odrasle jedinke će početi preobražaj u posudama za uzgoj larvi nakon približno 13-15 dana. Mužjaci se lako razlikuju od ženki po perastoj anteni i tankom tijelu.

5. Grupe jaja

Kada se u kavez za uzgajanje pojave odrasle jedinke, sve posude za uzgajanje larvi treba provjeravati tri puta nedjeljno u pogledu prisustva želatinastih grupa jaja. Ukoliko su prisutne, grupe jaja treba pažljivo ukloniti. Potrebno je da se prenesu na manju posudu koja sadrži uzorak vode za uzgajanje. Grupe jaja se koriste za početak uzgajanja kulture u novoj posudi (npr. 2-4 grupe jaja/posudi) ili se koriste za ispitivanje toksičnosti.

Larve u prvom stadijumu razvoja treba da se izlegu nakon 2-3 dana.

6. Postavljanje novih posuda za uzgajanje kulture

Kada se kulture razviju, treba da postoji mogućnost da se postavi nova posuda za uzgajanje kulture svake nedelje ili rjeĐe, u zavisnosti od potreba ispitivanja, prilikom čega se uklanjaju sve starije posude nakon preobražaja larvi u odrasle komarčiće. Uz pomoć ovog sistema, proizvodi se redovna zaliha odraslih jedinki uz minimalno upravljanje.

7. Priprema ispitnih rastvora „M4— i „M7‖

Elendt (1990) opisao je medijumum „M4‖ . Medijumum „M7‖ priprema se kao medijumum „M4‖ osim sa supstance iz tabele 1 , za koje su koncentracije četiri puta manje kod „M7‖ u odnosu na koncentracije kod „M4‖ . Ispitni rastvor ne treba da se priprema u odnosu na Elendt i Bias (1990) jer koncentracije $NaSiO3 \cdot 5H2O$, $NaNO3$, $KH2PO4$ i $K2HPO4$ navedene za pripremu osnovnih rastvora nisu odgovarajuće.

8. Priprema medijumuma „M7‖

Svaki osnovni rastvor (I) priprema se posebno, a kombinovani osnovni rastvor (II) priprema se iz tih osnovnih rastvora (I) (v. tabelu 1). Za pripremu medijumuma „M7—, pedeset mililitara kombinovanog osnovnog rastvora (II) miješa se sa količinama svakog makronutrijenta osnovnog rastvora koji su prikazani u Tabeli 2 do jednog litra dejonizovane vode. Vitaminski osnovni rastvor priprema se tako što se tri vitamina dodaju u dejonizovanu vodu, u skladu sa tabelom 3, i 0,1 ml kombinovanog vitaminskog osnovnog rastvora dodaje se konačnom medijumumu „M7— odmah prije upotrebe. Vitaminski osnovni rastvor čuva se zamrznut u malim porcijama. Potrebna je aeracija i stabilizacija medijumuma.

*Tabela :***Osnovni rastvori elemenata u tragovima za medijumum M4 i M7**

Osnovni rastvori (I)	Količina (mg) do 1 litra dejonizovane vode	Za pripremu osnovnog rastvora (II): izmiješati sljedeće količine (ml) osnovnog rastvora	Konačne koncentracije u ispitnim rastvorima (mg/l)

		(l) u maksimalno jedom litru dejonizovane vode			
		M4	M7	M4	M7
H3BO3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ([1])	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl ([1])	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl ([1])	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$ ([1])	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr ([1])	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ([1])	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ([1])	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ ([1]) ([2])	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ([1]) ([2])	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249
(1) Ove supstance se razlikuju kod M4 i M7, kao što je gore prikazano.					
(2) Ovi rastvori se pripremaju pojedinačno, zatim se sipaju zajedno i odmah autoklaviraju.					

*Tabela 2:***Osnovni rastvori makronutrijenata za medijumum M4 i M7**

	Količina koja se miješa do 1 litra dejonizovane vode (mg)	Količina osnovnih rastvora makronutrijenata koja se dodaje za pripremu medijumuma M4 i M7(ml/l)	Konačne koncentracije u ispitnim rastvorima M4 i M7(mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

Tabela 3: **Vitaminski osnovni rastvor za medijumume M4 i M7**

Sva tri vitaminska rastvora kombinuju se u jedan vitaminski osnovni rastvor.

	Količina koja se miješa do 1 litra dejonizovane vode (mg)	Količina vitaminskog osnovnog rastvora koja se dodaje za pripremu medijumuma M4 i M7(ml/l)	Konačne koncentracije u ispitnim rastvorima M4 i M7(mg/l)
Tiamin-hidrohlorid	750	0,1	0,075
Cianokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

Aneks 3

Priprema formulisanog sedimenta

SASTAV SEDIMENTA

Sastav formulisanog sedimenta treba da bude sljedeći:

Sastojak	Karakteristike	% suve mase sedimenta
Treset	Treset, što moguće bliže pH vrijednosti od 5,5 do 6,0; bez vidljivih ostataka biljaka, fino usitnjen (veličina čestice ≤ 1 mm) i osušen na vazduhu	4-5
Kvarcni pijesak	Veličina zrna: > 50 % čestica treba da bude u opsegu 50-200 µm	75-76
Kaolinska glina	Sadržaj kaolinita ≥ 30 %	20
Organski ugljenik	PrilagoĐava se dodavanjem treseta i pijeska	2 (± 0,5)
Kalcijum karbonat	CaCO3, u prahu, hemijski čist	0,05 - 0,1
Voda	Provodljivost ≤ 10 µS/cm	30 - 50

PRIPREMA

Treset se suši na vazduhu i usitnjava u fini prah. Suspenzija potrebne količine praha treseta u dejonizovanoj vodi priprema se uz pomoć uređaja za homogenizaciju visokog učinka. PH vrijednost ove suspenzije prilagoĐava se na 5,5 ± 0,5 sa $CaCO_3$. Suspenzija se priprema najmanje dva dana uz blago miješanje na temperaturi od 20 ± 2 °C, kako bi se pH vrijednost stabilizovala i uspostavila stabilna mikrobna komponenta. PH vrijednost se opet mjeri i treba da bude 6,0 ± 0,5. Zatim se suspenzija treseta miješa sa ostalim sastojcima (pijeskom i kaolinskom glinom) i dejonizovanom vodom kako bi se dobio homogeni sediment sa sadržajem vode u opsegu od 30-50 % suve mase sedimenta. PH vrijednost konačne smješe se opet mjeri i prilagoĐava se na 6,5 do 7,5 sa $CaCO_3$, ukoliko je potrebno.

SKLADIŠTENJE

Suvi sastojci za pripremu vještačkog sedimenta mogu se čuvati na suvom i hladnom mjestu na sobnoj temperaturi. Formulisani (vlažni) sediment ne treba da se skladišti prije njegove upotrebe u ispitivanju. Treba da iskoristi odmah nakon pripremnog perioda od 7 dana kojim se završava priprema.

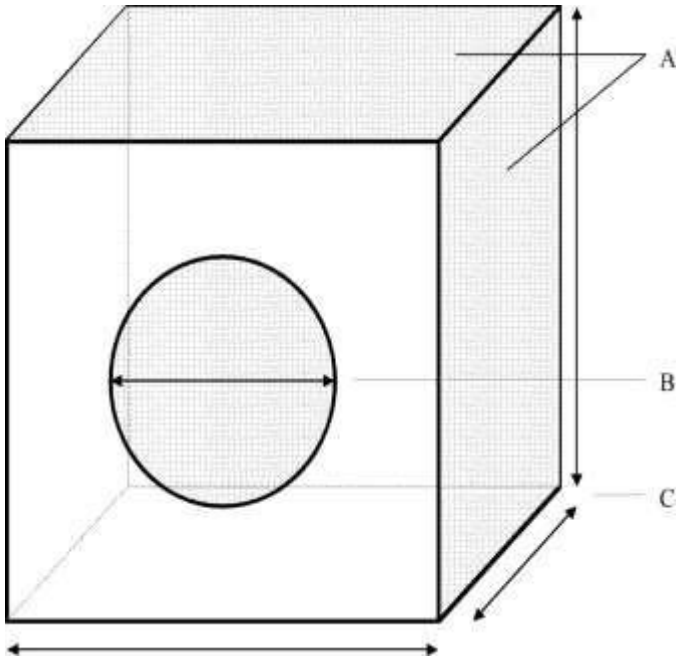
Aneks 4

Hemijske karakteristike prihvatljive vode za razređivanje

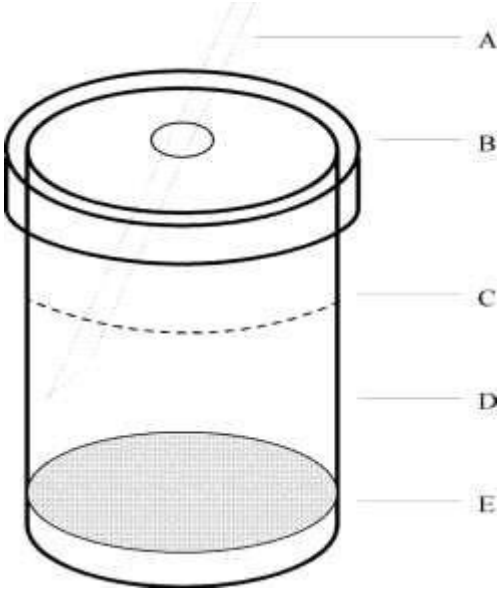
SASTOJAK	KONCENTRACIJE
Čestice	< 20 mg/l
Ukupan organski ugljenik	< 2 mg/l
Nejonizovani amonijak	< 1 µg/l
Tvrdoća kao $CaCO_3$	< 400 mg/l (27) (*)
Preostali hlor	< 10 µg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
Ukupni organofosforni pesticidi sa polihlorovanim bifenilima	< 50 ng/l
Ukupan organski hlor	< 25 ng/l
(*) Međutiim, treba napomenuti da ukoliko se sumnja na postojanje interakcije između jona tvrdoće i ispitne hemikalije, potrebno je koristiti vodu manje tvrdoće (i stoga, medijumum Elendt M4 ne treba koristiti u ovoj situaciji).	

Aneks 5

Smjernice za sprovođenje ispitivanja Primjer kaveza za uzgajanje:

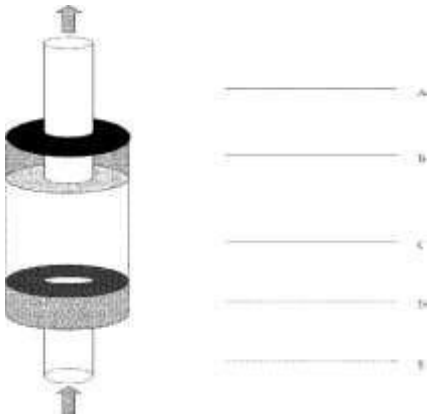


A. gaza na vrhu i najmanje sa jedne strane kaveza (gustine približno 1 mm)
B. otvor za stavljanje preobraženih odraslih jedinki u kavez za uzgajanje i uklanjanje grupa jaja iz posuda za kristalizaciju (nije prikazano na ovoj slici)
C. kavez za uzgajanje minimalnih dimenzija: 30 cm dužina, 30 cm visina i 30 cm dubina Primjer ispitne posude:



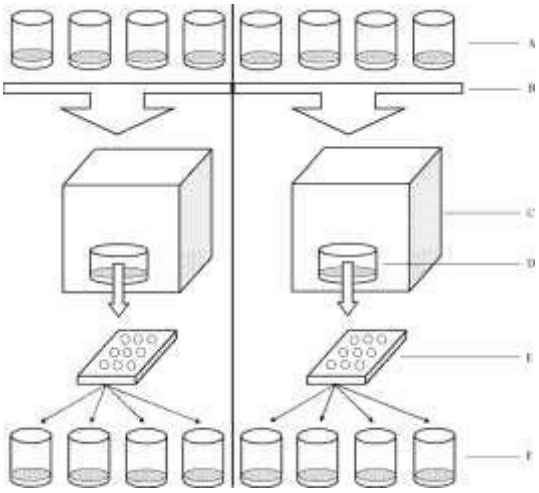
A. pasterova pipeta za dovod vazduha u vodu iznad sedimenta
B. stakleni poklopac za sprečavanje bijega preobraženih komarčića
C. površinski sloj vode
D. ispitna posuda (staklena labaratorijska čaša zapremine najmanje 600 ml)
E. sloj sedimenta

Primjer sisaljke za hvatanje odraslih komarčića (strelice pokazuju smjer protoka vazduha):



A. staklena cjevčica (unutrašnjeg prečnika približno 5 mm) povezana sa samousisnom pumpom
B. poklopac od vulkanizovane gume, probušen staklenom cjevčicom (A). Sa unutrašnje strane, otvor staklene cjevčice (A) prekriven je pamukom i gazom (gustine približno 1mm) kako bi se spriječila povreda komarčića prilikom uvlačenja u sisaljku
C. providna posuda (plastična ili staklena, dužine približno 15 cm) za hvatanje komarčića
D. poklopac od vulkanizovane gume, probušen cjevčicom (E). Za oslobaĐanje komarčića u kavez za uzgajanje, poklopac D se skida sa posude C
E. cjevčica (plastična ili staklena, unutrašnjeg prečnika približno 8 mm) za sakuplanje odraslih komarčića iz posude

Šematski prikaz ispitivanja životnog ciklusa:



A. prva generacija —ispitne posude sadrže sistem sediment-voda, osam ponavljanja, 20 larvi u prvom stadijumu razvoja po posudi
B. četiri ispitne posude za svaki kavez za uzgajanje, A i B
C. kavezi za uzgajanje (A i B) za rojenje, parenje i polaganje jaja
D. posude za kristalizaciju za polaganje grupa jaja
E. mikrotitarske ploče, jedan bunarčić za svaku grupu jaja
F. druga generacija —ispitne posude sadrže sistem sediment-voda, osam ponavljanja, 20 larvi u prvom stadijumu razvoja po posudi

C.41. ISPITIVANJE POLNOG RAZVOJA RIBA

1. UVOD

Ova ispitna metoda poklapa se sa Smjernicama za ispitivanje OECD(TG) 234 (2011).

Zasnovana je na odluci iz 1998. godine o razvoju novih i ažuriranju postojećih metoda za skrining i ispitivanje potencijalnih endokrinih disruptora. Ispitivanje polnog razvoja riba

(FSDT) identifikovano je kao obećavajuća ispitna metoda kojom su obuhvaćeni osjetljivi životni stadijumi riba koji su imali reakciju na hemikalije slične estrogenu i androgenu. Sprovedena je međulabaratorijska validaciona vježba za ovu ispitnu metodu, u perodu od

2006. do 2010. godine u okviru koje je izvršena validacija japanske medake (*Oryzias latipes*), zebrice (*Danio rerio*) i gregorca (*Gasterosteus aculeatus*) i djelimična validacija velikoglavog klijena (*Pimephales promelas*) (41) (42) (43). Ovaj protokol uključuje japansku medaku, gregorca i zebricu. Protokol u načelu predstavlja unapređenje Smjernica OECD TG 210 „Ribe, ispitivanje toksičnosti u ranim životnim stadijumima— (1), u kojima se izlaganje nastavlja dok se ne izvrši diferencijacija riba prema polu, tj. približno 60 dana nakon izleganja (dph) za japansku medaku, gregorca i zebricu (period izlaganja može biti duži ili kraći za druge vrste za koje se u budućnosti izvrši validacija) i dodaju se endokrino osjetljivi parametri praćenja. FSDT se procjenjuju efekti u ranim stadijumima razvoja i potencijalne negativne posledice navodnih endokrino disruptivnih hemikalija (npr. estrogeni, androgeni i inhibitori steroidogeneze) na polni razvoj. Kombinacijom dva osnovna endokrina parametra praćenja, koncentracije vitelogenina (VTG) i odnosa fenotipskih polova, omogućava se da se ispitivanjem ukaže na načine djelovanja ispitne hemikalije. Usljed promjene odnosa fenotipskih polova koji su važni za populaciju, FSDT se može koristiti za procjenu opasnosti i rizika. Međutiim, ukoliko se ispitivanje koristi za procjenu opasnosti ili procjenu rizika, gregorac ne treba da se koristi jer validacioni podaci koji su do sada na rapolaganju ukazuju na to da za ovu vrstu promjene odnosa fenotipskih polova usljed ispitne hemikalije nisu uobičajene.

Protokol se zasniva na ribama koje se izlažu hemikaliji putem vode tokom perioda nestabilnog pola u kojem se očekuje da je riba najosjetljivija na efekte endokrino disruptivnih hemikalija koje utiču na polni razvoj. Mjere se dva osnovna parametra praćenja kao indikatori odstepena u razvoju povezanih sa endokrinim sistemom, koncentracije VTG i odnos polova (odnos polova), koji se utvrĐuju kroz histologiju gonade. Histopatologija polnih žlijezda (procjena i utvrĐivanje stadijuma oocita i spermatogenih ćelija) je proizvoljna. Uz to, genetski pol se utvrđuje kada god je moguće (npr. kod japanske medake i gregorca). Prisustvo markera genetskog pola predstavlja značajnu prednost jer se njime povećava snaga statističkih podataka o odnosu polova i omogućava se otkrivanje pojedinačne promjene fenotipskog pola. Drugi apikalni parametri praćenja koji treba da se mjere uključuju stopu polaganja jaja, preživljanjanje, dužinu i masu tijela. Ispitna metoda bi se mogla prilagoditi drugim vrstama osim onih koje su pomenute gore, pod uslovom da se druge vrste podvrgnu validacionoj analizi koja je jednaka analizi koja je izvršena za japansku medaku, gregorca i zebricu, da se na kraju ispitivanja izvrši diferencijacija pola kontrolnih riba, da su nivoi VTG dovoljno visoki da se otkriju značajne varijacije povezane sa hemikalijom i da se osjetljivost ispitnog sistema utvrdi kroz endokrino aktivne referentne hemikalije ((anti)estrogene, (anti)-androgene, inhibitore aromataze, itd.). Uz to, OECD treba da analizira svaki izvještaj(e) o validaciji kojim se upućuje na podatke FSDT sa drugim vrstama i ishod validacije treba da se smatra zadovoljavajućim.

1.1. Početna razmatranja i ograničenja

VTG obično proizvodi jetra ženke jajonosnih kičmenjaka kao reakcije na cirkularni endogeni estrogen (2). On je preteča proteina žumanceta i, kada se proizvede u jetri, putuje krvotokom do jajnika, gdje ga preuzimaju i modifikuju jaja u razvoju. Sinteza VTG je veoma ograničena, iako ju je moguće otkriti, kod nezrelih riba i odraslih mužjaka riba jer nemaju dovoljno cirkularnog estrogena. Međutiim, jetra može da sintetiše i izluči VTG kao reakciju na stimulaciju eksternim estrogenom (3) (4) (5).

Mjerenjem VTG otkrivaju se hemikalije sa estrogenim, anti-estrogenim, i androgenim načinima djelovanja i hemikalije koje utiču na steroidogenezu, kao na primjer inhibitori aromataze. Otkrivanje estrogenih hemikalija je moguće kroz mjerenje indukcije VTG kod mužjaka riba i dokumentovano je u dovoljnoj mjeri kroz naučno-stručnu literaturu. Indukcija VTG je takoĐe dokazana kroz izlaganje androgenima koji mogu da aromatizuju (6) (7). Smanjenjem cirkularnih nivoa estrogena kod ženki, na primjer kroz inhibiciju aromataze kojom se endogeni androgen pretvara u prirodni estogen estradiol 17β uzrokuje se smanjenje koncentracija VTG, koji se koristi za otkrivanje hemikalija koje imaju karakteristike inhibitora aromataze ili šireg inhibitora steroidogeneze (33). Biološka važnost reakcije VTG nakon estrogene inhibicije/inhibicije aromataze utvrĐena je i u velikoj mjeri dokumentovana (8) (9). Međutiim, moguće je da na proizvodnju VTG kod ženki takoĐe utiču opšta toksičnost i ne-endokrini toksični načini djelovanja.

Nekoliko metoda mjerenja uspješno je razvijeno i standardizovano za rutinsku upotrebu kod kvantifikacije VTG u uzorcima u krvi, jetre, cjelog tijela i homogenata glave/repa sakupljenih iz pojedinačnih riba. Ovo je slučaj kod zebrice, gregorca i medake i djelimično validirane vrste velikoglavog klijena; dostupne su metode imunoenzimskog testa za određenu vrstu kroz korišćenje imunohemije za kvantifikaciju VTG. Kod medake i zebrice, postoji dobra korelacija između VTG izmjerenog u uzorcima krvne plazme, jetre i homogenata, iako homogenati pokazuju nešto niže vrijednosti u odnosu na plazmu. Preporučeni postupak za sakupljanje uzoraka za VTG analizu prikazan je u Aneksu 5.

Promjene u odnosu fenotipskih polova (odnosima polova) je parametar praćenja koji ukazuje na promjenu pola. Načelno, estrogeni, anti-estrogeni, androgeni, anti-androgeni i

hemikalijeinhibitori steroidogeneze mogu uticati na odnos polova kod riba u razvoju (20). Pokazalo se da je se promjena pola može djelimično povratiti kod zebrice (21) nakon izlaganja hemikaliji sličnoj estrogenu, dok je promjena pola nakon izlaganja hemikaliji sličnoj androgenu trajna (30). Pol se utvrđuje kao ženski, muški, međupol (oociti i spermatogenetske ćelije u jednoj gonadi) ili nediferencijalan i kod pojedinačnih riba utvrđuje se histološkom analizom gonada. Smjernice su navedene u Aneksu 7 i Smjernicama OECD o dijagnozi histopatološke analize gonada riba povezane sa endokrinim sistemom (22).

Genetski pol analizira se kroz genetske markere kada postoje kod date riblje vrste. Kod japanske medake, ženka XX ili mužjak XY mogu se odrediti lančanom reakcijom polimeraze (PCR) ili se može analizirati gen iz DM domena povezan sa hormozomom Y (DMY) (negativan ili pozitivan DMY) kako je opisano pod (23) (24). Kod gregorca, postoji ekvivalenta metoda PCR za utvrĐivanje genetskog pola koja je opisana u Aneksu 10. Kada se genetski pol može pojedinačno povezati sa fenotipskim polom, snaga ispitivanja se unapreĐuje i stoga, genetski pol treba da se utvrdi kod vrsta sa dokumentovanim markerima genetskog pola.

Dva osnovna endokrina ključna ishoda, VTG i odnos polova, mogu u kombinaciji dokazati endokrine načine djelovanja (MOA) hemikalije (Tabela 1). Odnos polova je relevantan biomarker (25) (26) i za neke dobro definisane načine djelovanja rezultati FSDT se mogu koristiti u svrhe procjene opasnosti i rizika kada je primjereno, u skladu sa regulatornom agencijom. Ovi načini djelovanja su trenutno estrogeni, androgeni i inhibitori steroidogeneze.

Tabela 1: **Reakcija endokrinih parametara praćenja na različite načine djelovanja hemikalija: ↑ = u porastu, ↓ = u padu, — = nije istraženo**

Način djelovanja	VTG ♂	VTG ♀	Odnos polova	Reference
Slab agonist estrogena	↑	↑	↑♀ ili ↑neizdiferencirano	(27) (40)
Jak agonist estrogena	↑	↑	↑♀ ili ↑neizdiferencirano, bez ♂	(28) (40)
Antagonist estrogena	—	—	↓♀, ↑neizdiferencirano	(29)
Agonist androgena	↓ ili —	↓ ili —	↑ ♂, bez ♀	(28) (30)
Antagonist androgena	—	—	↑♀ ↑MeĐupol	(31)
Inhibitor aromataze	↓	↓	↓♀	(33)

Ispitivanjem polnog razvoja riba nije obuhvaćen reproduktivni životni stadijum riba i zbog toga je hemikalije za koje se pretpostavlja da utiču na reprodukciju u nižim koncentracijama od onih za polni razvoj potrebno proučiti u okviru ispitivanja kojim je obuhvaćena reprodukcija.

Definicije u smislu ove ispitne metode navedene su u Dodatku 1.

In vivo ispitivanje polnog razvoja riba namijenjeno je utvrĐivanju hemikalija s androgenim i estrogenim svojstvima kao i antiandrogenim i antiestrogenim svojstvima i svojstvima inhibicije steroidogeneze. Fazama validacije (prva i druga) ispitivanja polnog razvoja riba bile su obuhvaćene estrogene i androgene hemikalije i hemikalije kojima se inhibira

steroidogeneza. Dejstva antagonista estrogena i androgena u ispitivanju polnog razvoja riba navedena su u tabeli 1, ali ti načini djelovanja u ovom trenutku slabije su dokumentovani.

2. NAČELO ISPITIVANJA

U okviru ispitivanja ribe, u stadijumima od svježe oploĐenih jajašaca do završetka polne diferencijacije, izlažu se najmanje tri koncentracije ispitivane hemikalije rastvorene u vodi. Uslovi ispitivanja trebalo bi da obuhvataju protočni postupak, osim ukoliko to nije moguće zbog dostupnosti ili prirode (npr. ograničena rastvorljivost) ispitivane hemikalije. Ispitivanje počinje stavljanjem svježe oploĐenih jajašaca (prije brazdanja blastodiska) u ispitne komore. Punjenje komora opisano je za svaku vrstu u stavu 27. Za validirane vrste riba, odnosno za medaku, trobodlji gregorac i zebricu utvrĐeno je ispitivanje u trajanju od 60 dph. Nakon završetka ispitivanja sve ribe se usmrćuju na human način. Biološki uzorak (krvna plazma, jetra ili homogenat glave/repa) za analizu VTG prikuplja se od svake ribe, a preostali dio fiksira se za histološku procjenu polnih žlijezda radi određivanja fenotipskog pola; po potrebi se može ssprovesti histopatološka analiza (npr. određivanje stadijuma polnih žlijezda, stepen meĐupola). Biološki uzorak (analna ili leĐna peraja) za određivanje genetskog pola uzima se za vrste koje imaju odgovarajuće markere (dodaci 9 i 10).

Pregled relevantnih uslova ispitivanja specifičnih za validirane vrste, a to su medaka, trobodlji gregorac i zebrica, prikazan je u Dodatku 2.

3. INFORMACIJE O ISPITIVANOJ HEMIKALIJI

Rezultati testa akutne toksičnosti ili drugog testa kratkotrajne toksičnosti (npr. ispitna metoda C.14. (34) i Smjernica OECD TG 210 (1)), po mogućnosti sprovedenih na vrstama odabranim za ovo ispitivanje trebalo bi da budu dostupni. To znači da su rastvorljivost u vodi i napon pare ispitivane hemikalije poznati i da je raspoloživa pouzdana analitička metoda za kvantifikaciju hemikalije u ispitnim komorama s poznatom i dokumentovanom tačnošću i granicom detekcije.

Osim toga, korisno je imati ostale informacije o strukturnoj formuli, čistoći hemikalije, stabilnosti u vodi i na svjetlosti, pKa, Pow i rezultatima ispitivanja na laku biorazgradivost (ispitna metoda C.4.).

3.1. Kriterijumi prihvatljivosti ispitivanja

Da bi rezultati ispitivanja bili prihvatljivi, primjenjuju se sljedeći uslovi:

- tokom čitavog ispitivanja koncentracija rastvorenog kiseonika trebalo bi da bude najmanje 60 procenata vrijednosti zasićenosti kiseonikom (ASV),
- razlike u temperaturi vode između ispitnih komora ni u jednom trenutku tokom izlaganja ne bi trebalo da budu veće od ± 1,5 °C; temperaturu vode potrebno je održavati u okviru utvrĐenih temperaturnih opsega za ispitnu vrstu u pitanju (Dodatak 2), – na rapolaganju bi trebalo da bude validaciona metoda za analizu hemikalije izlaganja s granicom detekcije nižom od najniže nominalne koncentracije i trebalo bi da budu prikupljeni dokazi o tome da su koncentracije ispitivane hemikalije u rastvoru na zadovoljavajući način održavane u granicama ± 20 % srednjih izmjerenih vrijednosti,
- ukupno preživljavanje oploĐenih jajašaca u kontrolnim grupama i po potrebi kontrolnim grupama s rastvaračem trebalo bi da bude veće od ili jednako graničnim vrijednostima definisanim u Dodatku 2,

- kriterijumi prihvatljivosti povezani s rastom i udjelima polova na kraju ispitivanja zasnivaju se na podacima iz kontrolnih grupa (kontrola rastvarača i vode zajedno, osim ako nijesu značajno drugačiji, u tom slučaju samo kontrola rastvarača)

		Medaka	Zebrica	Trobodlji gregorac
Rast	Mokra masa ribe osušene upijajućim materijalom	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Dužina (standardna dužina)	> 20 mm	> 14 mm	> 20 mm
Odnos polova (% mužjaka ili ženki) 30 – 70 %		30 – 70 %	30 – 70 %	30 – 70 %

- Ako se upotrebljava rastvarač, on ne bi trebalo da ima nikakvog statistički značajnog dejstva na preživljavanje i ne bi trebalo da izaziva nikakva endokrina disruptivna dejstva ili druga štetna dejstva na rane stadijume života, što se otkriva kontrolnom grupom s rastvaračem.

Ako je zapaženo odstepene od kriterijuma prihvatljivosti ispitivanja, potrebno je razmotriti posljedice u odnosu na pouzdanost podataka o ispitivanju i ta razmatranja uključiti u izvještavanje.

4. OPIS ISPITNE METODE

4.1. Ispitne komore

Mogu se upotrebljavati bilo kakve staklene komore, komore od plemenitog čelika ili druge hemijski inertne komore. Komore bi trebalo da budu dovoljno velike da se omogući usklaĐenost s kriterijumima količine punjenja navedenim u nastavku. Poželjno je da se ispitne komore nasumično smješte unutar ispitnog prostora. Nasumičnom rasporedu po blokovima gdje su sve koncentracije prisutne u svim blokovima potrebno je dati prednost u odnosu na potpuno nasumični raspored. Ispitne komore treba zaštititi od neželjenog uznemiravanja.

4.2. Izbor vrste

Preporučene vrste riba navedene su u Dodatku 2. Postupci za uključivanje novih vrsta navedeni su u stavu 2.

4.3. Držanje roditeljskih riba

Pojedinosti o držanju roditeljskih riba pod zadovoljavajućim uslovima mogu se naći u Smjernici OECD TG 210 (1). Roditeljske ribe potrebno je hraniti odgovarajućom hranom jednom ili dva puta dnevno.

4.4. Rukovanje embrionima i larvama

Na početku, embrioni i larve mogu se izlagati polaganjem u manje staklene komore ili komore od plemenitog čelika smještene u glavnoj komori opremljene mrežastim stranicama odnosno krajevima kojima se omogućava protok ispitivane hemikalije kroz komoru.

Neturbulentno strujanje kroz navedene male komore može se postići tako da se komore objese o polugu pomoću koje se komore podnosaju gore-dolje, ali tako da ispitni organizmi ostanu čitavo vrijeme prastvoreni.

Ako se za držanje jajašaca unutar glavne ispitne komore upotrebljavaju posude za jajašca, rešetke ili mreže, njih je potrebno ukloniti nakon što se larve izlegu, osim mreža, koje je potrebno zadržati kako bi se onemogućio bijeg riba. Ako larve treba premjestiti, ne bi trebalo da se izlažu vazduhu; ribe iz posude za jajašca ne bi trebalo vaditi mrežicom. Vrijeme prenosa različito je u zavisnosti od vrste, s tim da prenos nije uvijek ni potreban.

4.5. Voda

Svaka voda u kojoj je kontrolna vrijednost preživljavanja ispitne vrste najmanje na nivou jednakom onom u vodi opisanoj u dodacima 2 i 3 pogodna je kao ispitna voda. Ona bi trebalo da bude konstantnog kvaliteta tokom perioda ispitivanja. Kako voda za razblaživanje ne bi neprimjereno uticala na rezultat ispitivanja (na primjer reagovanjem s ispitivanom hemikalijom) ili imala negativan uticaj na uspješnost uzgojnog jata, potrebno je u određenim intervalima uzimati uzorke na analizu. Potrebno je mjeriti ukupni organski ugljenik, provodljivost, pH-vrijednost i suspendovane čvrste materije na primjer svaka tri mjeseca ako je poznato da je voda za razblaživanje relativno konstantnog kvaliteta. Teške metale (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), glavne anjone i katjone (npr. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}) i pesticide potrebno je mjeriti ako je kvalitet vode pod znakom pitanja. Pojedinosti o hemijskoj analizi i skupljanju vode navedene su u stavu 34.

4.6. Ispitni rastvori

Ako je to izvodivo u praksi, potrebno je primjenjivati protočni sistem. Kod protočnih ispitivanja za dostavljanje niza koncentracija u ispitne komore potreban je sistem koji stalno odmjerava i razblažuje osnovni rastvor ispitivane hemikalije (npr. dozirna pumpa, proporcionalni razblaživač, saturator). Brzine protoka osnovnih rastvora i vode za razblaživanje potrebno je provjeravati u određenim intervalima tokom ispitivanja i one tokom ukupnog trajanja ispitivanja ne smiju odstupati više od 10 %. Pokazalo se da je pogodna brzina protoka koja odgovara najmanje petorostrukoj zapremini ispitne komore u 24 sata (1). Potrebno je obratiti pažnju na to da se ne upotrebljavaju plastične cijevi ili drugi materijali, od kojih neki mogu sadržati biološki aktivne hemikalije ili mogu adsorbovati ispitivanu hemikaliju.

Osnovni rastvor potrebno je po mogućnosti pripremiti bez primjene rastvarača jednostavnim miješanjem ili mućkanjem ispitivane hemikalije u vodi za razblaživanje mehaničkim sredstvima (npr. miješanjem ili ultrazvukom). Ako se ispitivana hemikalija teško rastvara u vodi, potrebno je pratiti postupke opisane u Smjernici OECD za ispitivanje toksičnosti teških materija i smješa u vodi (36). Potrebno je izbjegavati upotrebu rastvarača, ali oni će u nekim slučajevima možda biti potrebni kako bi se dobio odgovarajuće koncentrisani osnovni rastvor. Primjeri odgovarajućih rastvarača navedeni su pod (36).

Potrebno je izbjegavati polustatične uslove ispitivanja, osim iz opravdanih razloga koji se odnose na ispitivanu hemikaliju (npr. stabilnost, ograničena dostupnost, visoki troškovi ili opasnost). Kod polustatičnog postupka mogu se primjenjivati dva različita postupka obnavljanja. Pripremaju se novi ispitni rastvori u čistim komorama i preživjela jajašca i larve nježno se prenose u nove komore ili se ispitni organizmi zadržavaju u ispitnim komorama dok se dio ispitne vode (najmanje dvije trećine) mijenja svakog dana.

5. POSTUPAK

5.1. Uslovi izlaganja

5.1.1. Prikupljanje jajašaca i trajanje

Kako bi se izbjeglo uticanje na izbor genetskog materijala, jajašca se skupljaju od najmanje tri uzgojna para ili grupe, miješaju i nasumično biraju prije početka ispitivanja. V. opis vještačke oplodnje u Dodatku 11 za trobodlji gregorac. Ispitivanje je potrebno početi što je prije moguće nakon oplodnje jajašaca, pri čemu je potrebno po mogućnosti embrione prastvoriti u ispitne rastvore ili što je prije moguće nakon početka brazdanja blastodiska, a najkasnije 12 sati nakon oplodnje. Ispitivanje je potrebno nastaviti do završetka polne diferencijacije u kontrolnoj grupi (60 dph za medaku, trobodlji gregorac i zebricu).

5.1.2. Punjenje

Broj oploĐenih jajašaca na početku ispitivanja trebalo bi da iznosi najmanje 120 po koncentraciji raspoređeno na najmanje četiri ponavljanja (za kontrolu je prihvaćena raspodjela po metodi kvadratnog korjena). Jajašca je potrebno nasumično rasporediti (primjenom statističkih tabela za nasumičan izbor) između ispitnih komora. Količina punjenja (v. definiciju u Dodatku 1) trebalo bi da bude dovoljno niska da se koncentracija rastvorenog kiseonika može održati najmanje na nivou 60 % ASV bez direktne aeracije komora. Preporučena količina punjenja kod protočnih ispitivanja iznosi najviše 0,5 g/l u 24 sata i najviše 5 g/l rastvora u bilo kojem trenutku. Najkasnije 28 dana nakon oplodnje broj riba po ponavljanju potrebno je ponovno rasporediti tako da broj riba u svakom ponavljanju bude što je moguće sličniji. U slučaju pojavljivanja smrtnosti povezane s izlaganjem broj ponavljanja potrebno je na odgovarajući način smanjiti kako bi gustina riba između nivoa obrade bila što je moguće sličnija.

5.1.3. Svjetlo i temperatura

Period svjetla i tame i temperaturu vode potrebno je prilagoditi ispitnoj vrsti (v. Dodatak 2 u vezi s uslovima eksperimenta za ispitivanje polnog razvoja riba).

5.1.4. Hranjenje

Hrana i hranjenje kritični su i bitno je za svaki stadijum obezbijediti pravilnu hranu u odgovarajućim vremenskim razmacima i na nivoima dovoljnim za normalan rast. Hranjenje bi trebalo da bude *ad libitum* vodeći računa o tome da višak bude minimalan. Kako bi se postigla dovoljna stopa rasta, ribe je potrebno hraniti najmanje dva puta dnevno (vikendom je prihvatljivo jedanput dnevno) uz razmak od najmanje tri sata između svakog hranjenja. Suvišnu hranu i izmet potrebno je po potrebi ukloniti kako bi se izbjeglo nagomilavanje otpada. Na osnovu stečenog iskustva hrana i režimi hranjenja neprestano se unapreĐuju u cilju optimizacije rasta i poboljšanja preživljavanja. Stoga je potrebno nastojati da se od priznatih stručnjaka dobije potvrda za predloženi režim. Hranjenje je potrebno prekinuti 24 sata prije završetka ispitivanja. Primjeri odgovarajuće hrane navedeni su u Dodatku 2 (v. i Okvir za ispitivanje riba OECD) (39).

5.2. Ispitne koncentracije

Ispitivane hemikalije potrebno je rasporediti kako je opisano u Dodatku 4. Potrebno je upotrijebiti minimum tri ispitne koncentracije u najmanje četiri ponavljanja. Pri izboru raspona ispitnih koncentracija potrebno je uzeti u obzir krivu zavisnosti LC_{50} od vremena izlaganja

kod dostupnih istraživanja akutne toksičnosti. Ako se podaci upotrebljavaju za procjenu rizika, preporučuje se pet ispitnih koncentracija.

Nije potrebno ispitivati koncentracije hemikalije iznad 10 % LC_{50} kod akutne toksičnosti za odrasle ribe ili 10 mg/l, zavisno od toga što je manje. Maksimalna ispitna koncentracija trebalo bi da bude 10 % LC50 po životnom stadijumu larve/juvenilne ribe.

5.3. Kontrolne grupe

Uz ispitne koncentracije potrebno je ssprovesti jednu kontrolnu grupu s vodom za razblaživanje (≥ 4 ponavljanja) i po potrebi jednu kontrolnu grupu s rastvaračem. U ispitivanju je potrebno upotrebljavati samo rastvarače za koje je ispitivanjem utvrĐeno da nemaju statistički značajan uticaj na parametre praćenja ispitivanja.

Ako se upotrebljava rastvarač, njegova konačna koncentracija ne bi trebalo da bude veća od 0,1 ml/l (36) i koncentracija bi trebalo da bude jednaka u svim ispitnim komorama, osim u slučaju kontrole s vodom za razblaživanje. Međutiim, potrebno je uložiti sve napore da se izbjegne upotreba takvih rastvarača ili bi koncentracije rastvarača trebalo da budu minimalne.

5.4. Učestalost analitičkih određivanja i mjerenja

Hemijsku analizu koncentracije ispitivane hemikalije potrebno je ssprovesti prije početka ispitivanja kako bi se provjerila usklaĐenost s kriterijumima prihvatljivosti. Sva ponavljanja potrebno je analizirati pojedinačno na početku i kraju ispitivanja. Jedno ponavljanje po ispitnoj koncentraciji potrebno je analizirati najmanje jedanput sedmično tokom ispitivanja uz sistemsku izmjenu ponavljanja (1, 2, 3, 4, 1, 2….). Ako se uzorci čuvaju za kasniju analizu, metoda čuvanja uzoraka trebalo bi prethodno da bude validirana. Uzorke je potrebno filtrirati (npr. primjenom veličine pora 0,45 μm) ili centrifugirati kako bi se obezbijedila određivanja hemikalije u pravom rastvoru.

Rastvoreni kiseonik, pH-vrijednost, ukupnu tvrdoću, provodljivost, salinitet (po potrebi) i temperaturu potrebno je mjeriti u svim ispitnim komorama tokom ispitivanja. Rastvoreni kiseonik, salinitet (po potrebi) i temperaturu potrebno je mjeriti najmanje jedanput sedmično, a pH-vrijednost, provodljivost i tvrdoću na početku i na kraju ispitivanja. Temperaturu je po mogućnosti potrebno neprekidno pratiti u najmanje jednoj ispitnoj komori.

Rezultati bi trebalo da se zasnivaju na izmjerenim koncentracijama. Međutiim, ako se koncentracija ispitivane hemikalije u rastvoru tokom čitavog ispitivanja na zadovoljavajući način održava u granicama ± 20 % nominalne koncentracije, rezultati se mogu zasnivati na nominalnim ili izmjerenim vrijednostima.

5.5. Opažanja i mjerenja

5.5.1. Stadijum embrionalnog razvoja

Izlaganje bi trebalo započeti što je moguće prije nakon oplodnje i prije početka brazdanja blastodiska, a najkasnije 12 sati nakon oplodnje kako bi se obezbijedilo izlaganje tokom ranog embrionalnog razvoja.

5.5.2. Izlijeganje i preživljavanje

Izlijeganje i preživljavanje potrebno je posmatrati najmanje jedanput dnevno i relevantne brojeve dokumentovati. Mrtve embrione, larve i juvenilne ribe potrebno je ukloniti čim se uoče jer se mogu brzo raspasti i druge ribe ih mogu raskidati svojim aktivnostima. Prilikom uklanjanja mrtvih jedinki neophodan je krajnji oprez kako bi se izbjegli udarci ili fizičko povreĐivanje susjednih jajašaca/larvi, koji su izuzetno nježni i osjetljivi. Kriterijumi za utvrĐivanje smrti razlikuju se zavisno od životnog stadijuma:

- za jajašca: naročito u ranim stadijumima, izraežen gubitak prozirnosti i promjena boje zbog koagulacije i/ili taloženja proteina, što rezultira bjelkasto-mutnim izgledom,
- za larve i juvenilne ribe: nepokretnost i/ili odsutnost pokreta disanja i/ili odsutnost srčanog ritma i/ili bijela mutna boja centralnog nervnog sistema i/ili izostanak reakcije na mehaničke nadražaje.

5.5.3. Neuobičajeni izgled

Potrebno je zabilježiti broj larvi ili riba kod kojih su vidljive nepravilnosti u obliku tijela i opisati izgled i vrstu nepravilnosti. Važno je napomenuti da je pojava abnormalnih embriona i larvi prirodna i da ih kod nekih vrsta u kontroli/kontrolama može biti i više procenata. Abnormalne životinje potrebno je ukloniti iz ispitnih komora tek nakon smrti. Međutiim, u skladu s Direktivom Evropskog parlamenta i Savjeta 2010/63/EU od 22. septembra 2010. godine o zaštiti životinja koje se koriste u naučne svrhe, ako nepravilnosti prouzrokuju bol, patnju, stres ili trajno oštećenje i ako se smrt može pouzdano predvidjeti, životinje je potrebno anestezirati i usmrtiti kako je opisano u stavu 44 i obraditi kao smrtnost u analizi podataka.

5.5.4. Neuobičajeno ponašanje

Nepravilnosti, npr. hiperventilaciju, nekoordinisano plivanje, atipičnu mirnoću i atipično ponašanje pri hranjenju potrebno je zabilježiti kada se pojave.

5.5.5. Masa

Na kraju ispitivanja potrebno je usmrtiti (anestezirati ako je potrebno uzeti uzorke krvi) sve preživjele ribe i izmjeriti pojedinačnu mokru masu riba (osušenih upijajućim materijalom).

5.5.6. Dužina

Na kraju ispitivanja potrebno je izmjeriti pojedinačne dužine (standardne dužine).

Na osnovu navedenih opažanja dobiće se svi ili neki od sljedećih podataka koji se upotrebljavaju u izvještavanju:

- kumulativna smrtnost,
- broj zdravih riba na kraju ispitivanja, vrijeme do početka izlijeganja i kraja
- izlijeganja, dužina i masa preživjelih životinja, broj deformisanih larvi, broj riba koje
- pokazuju neuobičajeno ponašanje.
-
-

5.6. Uzorkovanje riba

Uzorkovanje riba sprovodi se nakon završetka ispitivanja. Uzorkovanu ribu potrebno je usmrtiti npr. primjenom MS-222 (100 – 500 mg po litru puferisano s 200 mg NaHCO3 po litru) ili FA-100 (4-alil-2-metoksifenol: eugenol) i pojedinačno izmjeriti i izvagati kao mokru

masu ribe (osušene upijajućim materijalom) ili anestezirati ako je potrebno uzeti uzorak krvi (v. stav 49).

5.7. **Uzorkovanje za analizu VTG i određivanje pola histološkom procjenom** Sve ribe potrebno je uzorkovati i pripremiti za analizu pola i VTG. Sve ribe potrebno je histološki analizirati kako bi im se odredio pol. Za mjerenje VTG prihvata se poduzorkovanje najmanje 16 riba iz svakog ponavljanja. Potrebno je analizirati više riba za VTG ako se rezultati poduzorkovanja pokažu nejasnim. Postupak uzorkovanja za VTG i određivanje pola zavise od metode analize VTG.

5.7.1. Metoda homogenata glave/repa za analizu VTG

Ribe se usmrćuju. Glava i rep svake ribe skalpelom se odvajaju od tijela ribe rezovima neposredno iza prsnih peraja i neposredno iza leĐnog peraja (v. sliku 1). Glava i rep svake ribe se spajaju, vagaju i pojedinačno označavaju brojem, zamrzavaju tečnim azotom i čuvaju na – 70 ° ili manje za analizu VTG. Tijelo ribe označava se brojem i fiksira u odgovarajućem fiksativu za histološku procjenu (22). Primjenom ove metode VTG i histopatološka analiza ocjenjuju se za svaku jedinku i stoga se svaka promjena nivoa VTG može povezati s fenotipskim polom ribe ili genetskim polom (medaka i trobodlji gregorac) ribe. V. smjernicu za homogenizaciju (Dodatak 5) i smjernicu za kvantifikaciju VTG (Dodatak 6) za više informacija.

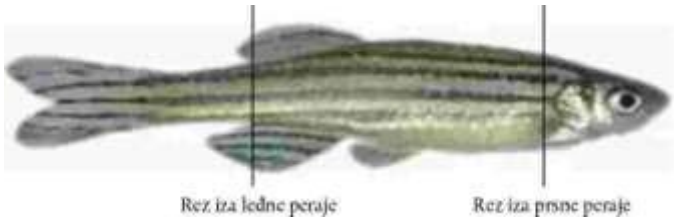
5.7.2. Metoda homogenata jetre za analizu VTG

Ribe se usmrćuju. Jetra se secira i čuva na ili ispod – 70 °C. Preporučeni postupci za eksciziju i prethodnu obradu jetre navedeni su u Smjernici OECD TG 229 (37) ili poglavlju C.37 ovog aneksa (38). Zatim se jetra pojedinačno homogenizuje kako je opisano u Smjernici OECD TG 229 ili poglavlju C.37 ovog aneksa. Prikupljeni supernatant upotrebljava se za mjerenje VTG homolognom ELISA tehnikom (v. Dodatak 6 za primjer kvantifikacije u slučaju zebrica ili Smjernicu OECD TG 229 (37) za medaku). Primjenom tog pristupa moguće je dobiti i podatke o VTG i histološkoj analizi polnih žlijezda za pojedinačne ribe.

5.7.3. Metoda krvne plazme za analizu VTG

Krv se prikuplja iz riba pod anestezijom punkcijom srca, iz kaudalne vene ili rezanjem repa i centrifugira na 4 °C za prikupljanje plazme. Plazma se čuva na ili ispod – 70 °C. Sve ribe usmrćuju se i fiksiraju za histološku analizu. Uzorci plazme i ribe pojedinačno se označavaju brojevima kako bi se nivoi VTG povezali sa polom riba.

Slika : **Kako rezati ribu za mjerenje VTG u homogenatu glave/repa i histološkoj procjeni srednjeg dijela**



5.7.4. Određivanje genetskog pola

Biološki uzorak za određivanje genetskog pola uzima se iz pojedinačnih riba kod vrsta koje imaju odgovarajuće markere. U slučaju medake uzima se analno ili leÐno peraje. U Dodatku 9 naveden je detaljan opis uključujući uzorkovanje tkiva i određivanje pola metodom PCR. Isto tako, u Dodatku 10 opisano je uzorkovanje tkiva i određivanje pola metodom PCR za trobodlji gregorac.

5.8. Mjerenje VTG

Mjerenje VTG trebalo bi da se zasniva na kvantitativnoj i analitički provjerenoj metodi. Informacije bi trebalo da budu dostupne na osnovu varijabilnosti metode upotrijebljene u odgovarajućoj laboratorijai tokom testa i između testova. Izvor varijabilnost unutar testa i između testova (najvjerovatnije) zasniva se na različitim razvojnim stadijumima populacije riba. Uzimajući u obzir varijabilnost mjerenja VTG, koncentracije bez vidljivog efekta (NOEC) koje se zasnivaju samo na tom parametru praćenja potrebno je obraditi s velikom pažnjom.

Dostupne su različite metode za procjenu proizvodnje VTG u ribljim vrstama koje se razmatraju u ovom ispitivanju. Mjerna tehnika koja je relativno osjetljiva i specifična je određivanje koncentracija proteina enzimskim imunoadsorpcionim testom (ELISA). Trebalo bi upotrebljavati homologna antitijela (na VTG iste vrste) i najvažnije homologne standarde.

5.9. Određivanje pola

Zavisno od postupka uzorkovanja VTG, cijela riba ili preostali srednji dio svake ribe stavlja se u prethodno označenu kasetu za obradu i fiksira u odgovarajućem fiksativu za histološko određivanje pola (po izboru i za procjenu stadijuma razvoja polnih žlijezda). Smjernica za fiksiranje i uklapanje navedena je u Dodatku 7 i Smjernici OECD za dijagnozu histopatološke analize polnih žlijezda riba povezane s endokrinim sistemom (22). Nakon obrade ribe se uklapaju u parafinske blokove. Jedinke se polažu longitudinalno u parafinski blok. Od svake jedinke uzima se najmanje šest longitudinalnih sekcija (debljine 3 – 5 μm) u prednjoj ravni uključujući tkivo obje polne žlijezde. Razmak između navedenih sekcija trebalo bi da bude oko 50 μm za mužjake i 250 μm za ženke. Međutiim, s obzirom na to da će svaki blok često sadržati mužjake i ženke (ako je u svaki blok uklopljeno više jedinki), razmak između sekcija iz navedenih blokova trebalo bi da bude oko 50 μm dok se ne dobije najmanje šest sekcija polnih žlijezda od svakog mužjaka. Nakon toga razmak između sekcija može se povećati na oko 250 μm za ženke. Sekcije se boje hematoksilinom i eozinom i ispituju svjetlosnom mikroskopijom s fokusom na pol (muški, ženski, meÐupol, neizdiferenciran). MeÐupol je definisan kao prisutnost više od jedne jajne ćelije u testisu u šest analiziranih sekcija ili spermatogenih ćelija (da/ne) u jajnicima. Histopatološka analiza i određivanje stadijuma jajnika i testisa nijesu obavezni, ali ako se ispituju, rezultate je potrebno statistički analizirati i navesti u izvještaju. Potrebno je navesti da određene riblje vrste prirodno nemaju potpuno razvijen par polnih žlijezda i da može biti prisutna samo jedna polna žlijezda (to je npr. slučaj kod medake i povremeno kod zebrice). Sva takva opažanja potrebno je zabilježiti.

Određivanje genetskog pola kod pojedinačnih medaki zasniva se na prisutnosti ili odsutnosti gena kojim se određuje muški pol medake, DMY, a smješten je na hromozomu Y. Genotipski pol medake može se odrediti sekvenciranjem gena DMY iz DNK ekstrahovanog iz, na primjer, komada analnog peraja ili prsnog peraja. Prisutnost gena DMY ukazuje na jedinku XY (mužjaka) bez obzira na fenotip, dok njegova odsutnost ukazuje na jedinku XX (ženku) bez obzira na fenotip (23). Smjernica za pripremu tkiva i metodu PCR navedena je u Dodatku 9. Kod pojedinačnih trobodljih gregoraca pol se isto tako određuje metodom PCR kako je opisano u Dodatku 10.

Pojavu meÐupola (v. definiciju u Dodatku 1) potrebno je navesti u izvještaju.

5.10. Sekundarne polne karakteristike

Kod vrsta kao što je medaka sekundarne polne karakteristike pod kontrolom su endokrinog sistema; stoga, opažanja povezana s fizičkim izgledom riba potrebno je po mogućnosti ssprovesti nakon završetka izlaganja. Kod ženki medake papilarna formacija na zadnjem dijelu analnog peraja osjetljiva je na androgen. U poglavlju C.37 ovog aneksa (38) nalaze se relevantne fotografije sekundarnih polnih karakteristika mužjaka i androgenizovanih ženki.

6. PODACI I IZVJEŠTAVANJE

6.1. Obrada rezultata

Važno je da se parametar praćenja odredi najjačim važećim statističkim ispitivanjem. Ponavljanje je eksperimentalna jedinica, ali u statističko ispitivanje potrebno je uključiti i varijabilnost unutar ponavljanja. Dodatak 8 sadrži dijagram toka odlučivanja kao pomoć pri izboru najodgovarajućeg statističkog ispitivanja na osnovu svojstava podataka dobijenih ispitivanjem. Nivo statističkog značaja iznosi 0,05 za sve uključene parametre praćenja.

6.2. Udjeli polova i genetski pol

Udjele polova trebalo bi analizirati u pogledu značajnog efekta (pristup NOEC/LOEC (najniža koncentracija vidljivog efekta)) izlaganja Jonker-Terpstrin testom (testom trendova) ako postoji monotonična reakcija na dozu. Ako se utvrdi nepostojanje monotoničnosti, potrebno je primijeniti test parova. Danetov test upotrebljava se ako se mogu postići normalnost i homogena varijansa. Tamhen-Danetov test upotrebljava se ako je prisutna heterogena varijansa. U suprotnom, upotrebljava se Men-Vitnijev test s Bonferoni-Holm korekcijom. Dijagram toka kojim su opisani statistički podaci o udjelima polova prikazan je u Dodatku 8. Udjele polova potrebno je prikazati u tabelama kao udjele koncentracija ± standardno odstepene ženki, mužjaka, međupolova i neizdiferenciranih.

Potrebno je istaći statistički značaj. Primjeri su prikazani u izvještaju o validaciji druge faze ispitivanja polnog razvoja riba (42). Genetski pol potrebno je navesti kao procenat promjene fenotipskog pola mužjaka, ženki, međupolova i neizdiferenciranih.

6.3. Koncentracije VTG

Koncentracije VTG trebalo bi analizirati u pogledu značajnog efekta (pristup NOEC/LOEC) izlaganja. Prednost se daje Danetovom testu u odnosu na t-test s Bonferonijevom korekcijom. Ako se upotrebljava Bonferonijeva korekcija, prednost se daje Bonferoni-Holm korekciji. Potrebno je predvidjeti logaritamsku transformaciju VTG za postizanje normalnosti i homogenosti varijanse. Pored toga, ako je reakcija na koncentraciju u skladu s monotoničnošću, prednost se daje Jonker-Terpstrinovom testu u odnosu na sve prethodno navedene. Ako se upotrebljavaju t-testovi ili Danetov test, nema potrebe za značajnim Ftestom analize varijanse (ANOVA) kako bi se nastavilo dalje. Pojedinosti su prikazane u dijagramu toka u Dodatku 8. Rezultati u tabelama navode se kao srednje vrijednosti koncentracija ± standardno odstepene naročito za mužjake, ženke, međupol i neizdiferencirane. Potrebno je istaći statistički značaj za fenotipske ženke i fenotipske mužjake. Primjeri su prikazani u izvještaju o validaciji druge faze ispitivanja polnog razvoja riba (42).

6.4. Stvarne koncentracije ispitivane hemikalije

Stvarne koncentracije ispitivane hemikalije u posudama potrebno je analizirati učestalošću opisanom u stavu 34. Rezultati u tabelama navode se kao srednje vrijednosti koncentracija

± standardno odstepene na osnovu ponavljanja i na osnovu koncentracije, pri čemu se ističu informacije o broju uzoraka i netipične vrijednosti iz srednje koncentracije obrade ± 20 %. Primjeri se mogu pronaći u izvještaju o validaciji druge faze ispitivanja polnog razvoja riba (42).

6.5. Tumačenje rezultata

Rezultate je potrebno tumačiti s oprezom ako se izmjerene koncentracije ispitivane hemikalije u ispitnim rastvorima nalaze blizu granice detekcije analitičke metode.

6.6. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju trebalo bi da sadrži sljedeće podatke:

6.6.1. Ispitivanu hemikaliju

relevantna fizičko-hemijska svojstva, podatke za identifikaciju hemikalije, uključujući podatke o čistoći i analitičkoj metodi za kvantifikaciju ispitivane hemikalije,

6.6.2. Uslove ispitivanja

- primijenjeni postupak ispitivanja (npr. protočni polustatični / obnavljanje), plan ispitivanja uključujući ispitne koncentracije, način pripreme osnovnih rastvora (u Aneksu), učestalost obnavljanja (ako se primjenjuju, potrebno je navesti sredstvo za rastvaranje i njegovu koncentraciju),
- nominalne ispitne koncentracije, srednje izmjerene vrijednosti i njihova standardna odstepena u ispitnim komorama i metodu kojom su dobijene (upotrijebljena analitička metoda trebalo bi da bude prikazana u Aneksu), dokaze da se mjerenja odnose na koncentracije ispitivane hemikalije u pravom rastvoru,
- kvalitet vode u ispitnim komorama: pH-vrijednost, tvrdoću, temperaturu i koncentraciju rastvorenog kiseonika,
- detaljne informacije o hranjenju (npr. vrstu (vrste) hrane, izvor, količinu date hrane i učestalost hranjenja i po potrebi analize sprovedene radi utvrĐivanja zagaĐivača (npr. polihlorisanih bifenila (PCB), policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAH) i organofosfornih pesticida),

6.6.3. Rezultate

- dokaze o usklaĐenosti kontrola s validacionim kriterijumima: podatke o stopi izlijeganja u tabelama potrebno je navesti kao procenat po ponavljanju i po koncentraciji. Potrebno je istaći netipične vrijednosti u odnosu na kriterijume prihvatljivosti (u kontrolama). Preživljavanje je potrebno prikazati kao procenat po ponavljanju i po koncentraciji. Potrebno je istaći netipične vrijednosti u odnosu na validacione kriterijume (u kontrolama),
- jasno navoĐenje rezultata dobijenih u vezi s različitim opaženim parametrima praćenja: preživljavanje embriona i uspješnost izlijeganja, poljne nepravilnosti, dužinu i masu, mjerenja VTG (ng/g homogenata, ng/ml plazme ili ng/mg jetre), histološku analizu polnih žlijezda, odnos polova, podatke o genetičkom polu, učestalost svih neuobičajenih reakcija kod riba i sve vidljive efekte nastale kao posljedica ispitivane hemikalije.

Rezultate je potrebno prikazati kao srednje vrijednosti ± standardno odstepene ili standardna greška. Statistički podaci navode se najmanje kao NOEC i LOEC i intervali pouzdanosti. Potrebno je pratiti statistički dijagram toka (Dodatak 8).

Dodatak 1

Skraćenice i definicije

Apikalni parametar praćenja: izaziva dejstvo na nivou populacije

ASV: vrijednost zasićenosti kiseonikom

Biomarker: izaziva dejstvo na nivou jedinke

Hemikalija: supstanca ili smješa

Dph: dana poslije izlijeganja

DMY: gen iz DM-domena specifičan za hromozom Y i potreban za razvoj mužjaka medake

ELISA: enzimski imunoadsorpcioni test

Masa ribe: mokra masa ribe (osušene upijajućim materijalom)

FSDT: ispitivanje polnog razvoja riba

Osa HPG: osa hipotalamus-hipofiza-gonade

MeĐupolna riba: riba s više od jedne jajne ćelije u testisu u šest analiziranih sekcija ili sa spermatogenim ćelijama u jajnicima (da/ne)

Masa riba u odnosu na prostor: mokra masa riba u odnosu na određenu količinu vode

MOA: način djelovanja

RT-PCR: lančana reakcija polimeraze u reverznoj transkriptazi

Ispitivana hemikalija: bilo koja supstanca ili smješa ispitivana primjenom ove ispitne metode

Neizdiferencirana riba: riba sa polnim žlijezdama bez raspoznatljivih ćelija zametka **VTG**: vitelogenin

Dodatak 2

Uslovi eksperimenta za ispitivanje polnog razvoja riba (slatkovodne vrste)

1. Preporučene vrste	Medaka (Oryzias latipes)	Zebrica (Danio rerio)	Trobodlji gregorac (Gasterostreus aculeatus)
2. Vrsta ispitivanja	Protočno ili polustatično	Protočno ili polustatično	Protočno ili polustatično
3. Temperatura vode	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Kvalitet osvjetljenja	Fluorescentne sijalice (široki spektar)	Fluorescentne sijalice (široki spektar)	Fluorescentne sijalice (široki spektar)
5. Jačina svjetla	10 – 20 µE/m2/s, 540 – 1 080 luksa ili 50 – 100 ft-c (nivoi u laboratorijaskim uslovima)	10 – 20 µE/m2/s, 540 – 1 080 luksa ili 50 – 100 ft-c (nivoi u laboratorijaskim uslovima)	10 – 20 µE/m2/s, 540 – 1 080 luksa ili 50 – 100 ft-c (nivoi u laboratorijaskim

			uslovima)
6. Period svjetla i tame	12 – 16 h svjetlo, 8 – 12 h tama	12 – 16 h svjetlo, 8 – 12 h tama	16 h svjetlo, 8 h tama
7. Minimalna veličina komore	Pojedinačne komore trebalo bi da sadrže minimum 7 l zapremine vode	Pojedinačne komore trebalo bi da sadrže minimum 7 l zapremine vode	Pojedinačne komore trebalo bi da sadrže minimum 7 l zapremine vode
8. Zamjene zapremine ispitnih rastvora	Minimum pet dnevno	Minimum pet dnevno	Minimum pet dnevno
9. Starost ispitnih organizama na početku izlaganja	Svježe oploĐena jajašca (stadijum rane blastule)	Svježe oploĐena jajašca (stadijum rane blastule)	Svježe oploĐena jajašca
10. Broj jajašaca po obradi	Minimum 120	Minimum 120	Minimum 120
11. Broj obrada	Minimum tri (plus odgovarajuće kontrole)	Minimum tri (plus odgovarajuće kontrole)	Minimum tri (plus odgovarajuće kontrole)
12. Broj ponavljanja po obradi	Minimum četiri (osim raspodjele po metodi kvadratnog korjena za kontrole)	Minimum četiri (osim raspodjele po metodi kvadratnog korjena za kontrole)	Minimum četiri (osim raspodjele po metodi kvadratnog korjena za kontrole)
13. Režim hranjenja	Živa *Artemia*, smrznuti odrasli slani škampi, pahuljasta hrana itd. Preporučuje se hranjenje dvaput dnevno.	Posebna suva hrana, živa *Artemia*, smrznuti odrasli slani škampi, pahuljasta hrana itd. Preporučuje se hranjenje dvaput dnevno.	Živa *Artemia*, smrznuti odrasli slani škampi, pahuljasta hrana itd. Preporučuje se hranjenje dvaput dnevno.
14. Aeracija	Bez aeracije, osim ukoliko koncentracija rastvorenog kiseonika ne padne na manje od 60 % zasićenosti	Bez aeracije, osim ukoliko koncentracija rastvorenog kiseonika ne padne na manje od 60 % zasićenosti	Bez aeracije, osim ukoliko koncentracija rastvorenog kiseonika ne padne na manje 70 % zasićenosti
15. Voda za razblaživanje	Čista površina, izvorska ili obraĐena voda	Čista površina, izvorska ili obraĐena voda	Čista površina, izvorska ili obrađena

			voda
16. Trajanje izlaganja ispitivanoj hemikaliji	60 dph	60 dph	60 dph
17. Biološki parametar praćenja	Uspješnost izlijeganja, preživljavanje, mahromorfologija, VTG, histološka analiza polnih žlijezda, genetski pol, odnos polova	Uspješnost izlijeganja, preživljavanje, mahromorfologija, VTG, histološka analiza polnih žlijezda, odnos polova	Uspješnost izlijeganja, preživljavanje, mahromorfologija, VTG, histološka analiza polnih žlijezda, odnos polova
18.Kriterijumi prihvatljivosti ispitivanja za udružena ponavljanja kontrola	Uspješnost izlijeganja > 80 %	Uspješnost izlijeganja > 80 %	Uspješnost izlijeganja > 80 %
	Preživljavanje nakon izlijeganja ≥ 70 %	Preživljavanje nakon izlijeganja ≥ 70 %	Preživljavanje nakon izlijeganja ≥ 70 %
	Rast (mokra masa ribe osušene upijajućim materijalom) > 150 mg	Rast (mokra masa ribe osušene upijajućim materijalom) > 75 mg	Rast (mokra masa ribe osušene upijajućim materijalom) > 120 mg
	Dužina (standardna dužina) > 20 m	Dužina (standardna dužina) > 14 mm	Dužina (standardna dužina) > 20 mm
	Odnos polova (% mužjaka ili ženki) 30 % – 70 %	Odnos polova (% mužjaka ili ženki) 30 % – 70 %	Odnos polova (% mužjaka ili ženki) 30 % – 70 %

Dodatak 3

Hemijska svojstva prihvatljive vode za razblaživanje

SASTOJAK	KONCENTRACIJA
Čestice	< 20 mg/l
Ukupni organski ugljenik	< 2 mg/l
Nejonizovani amonijak	< 1 µg/l
Rezidualni hlor	< 10 µug/l
Ukupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
Ukupni organofosforni pesticidi plus polihlorovani bifenili	< 50 ng/l
Ukupni organski hlor	< 25 ng/l

Dodatak 4

Iz ispitne metode C.14 / Smjernica za ispitne koncentracije

Kolona (broj koncentracija između 100 i 10 ili između 10 i 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56

3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0
(*) Iz kolone se može odabrati niz od tri uzastopne koncentracije (ili više njih). U koloni (2× + 1) navedene su srednje tačke između koncentracija iz kolone (×). Navedene vrijednosti koncentracija mogu predstavljati zapreminske ili masene procente (mg/l ili µg/l). Vrijednosti se po potrebi mogu množiti ili dijeliti bilo kojom potencijom broja 10. Kolona 1 se može primjenjivati ako postoji velika nesigurnost po pitanju nivoa toksičnosti.						

Dodatak 5

Smjernica za homogenizaciju glave i repa juvenilne zebrice, debeloglave gavčice, trobodljeg gregorca i medake

Cilj ovog odsjeka je da se opišu postupci koji prethode kvantifikaciji koncentracije VTG. Mogu se primjenjivati i drugi postupci čiji su rezultati uporedivi s kvantifikacijom VTG. Određivanje koncentracije VTG u krvnoj plazmi ili jetri umjesto u homogenatu glave/repa nije obavezno.

Postupak

1. Ribe se anesteziraju i usmrćuju u skladu s opisom ispitivanja.

2. Glava i rep ribe režu se u skladu s opisom ispitivanja. **Važno**: sve instrumente za seciranje i ploču za rezanje potrebno je pravilno isprati i očistiti (npr. 96 %-tnim etanolom) između postepena sa svakom pojedinačnom ribom kako bi se spriječilo „zagaĐenje VTG— sa ženki ili **indukovanih mužjaka na neindukovane** mužjake.

3. Zajednička masa glave i repa svake ribe mjeri se s tačnošću do miligrama.

4. Nakon vaganja djelovi se stavljaju u odgovarajuće cijevi (npr. u Ependorf epruvetu od 1,5 ml) i zamrzavaju na – 80 °C do homogenizacije ili se direktno homogenizuju na ledu s dva plastična tučka. (Mogu se primjenjivati i druge metode ako se sprovode na ledu i ako je rezultat homogena masa) **Važno**: *Cijevi bi trebalo da budu pravilno označene brojevima tako da se glava i rep ribe mogu povezati s odgovarajućom sekcijom tijela upotrijebljenom za histološku analizu polnih žlijezda.*

5. Nakon dobijanja homogene mase dodaje se ledeno hladni **pufer za homogenizaciju**[64] u količini koja odgovara 4 – 10 puta masi tkiva (razblaživanje se bilježi). Nastavlja se rad s tučcima dok smješa ne postane homogena. **Važna napomena**: *Za svaku ribu upotrebljavaju se novi tučci*.

6. Uzorci se stavljaju na led do centrifugiranja na **4 °C** i na 50 000 g tokom 30 minuta.

7. Pipetom se odmjeravaju količine od 20 do [65] µl (količina se bilježi) supernatanta **u najmanje dvije** cijevi umakanjem vrha pipete ispod sloja masti na površini i pažljivim usisavanjem supernatanta bez djelova masti ili peleta.

8. Cijevi se čuvaju na – 80 °C do upotrebe.

Napomena: Pufer za homogenizaciju potrebno je upotrijebiti na dan njegove izrade. Tokom primjene stavlja se na led.

Dodatak 6

Smjernica za kvantifikaciju vitelogenina iz homogenata glave i repa zebrice (*Danio rerio*) (izmijenjena u odnosu na Holbeh i drugi (Holbech et al.), 2001.). Mogu se primjenjivati drugi postupci u kojima se primjenjuju homologna antitijela i drugi standardi

Mikrotitracione pločice (sertifikovani Maxisorp F96, Nunc, Roskild, Danska), na koje se prethodno nanosi 5 µg/ml antitijela na lipovitelin-IgG zebrice, odmrzavaju se i ispiraju tri puta puferom za ispiranje (*).

Standard pročišćenog vitelogenina zebrice[66] serijski se razblažuje na 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 i 20 ng/ml u puferu za razblaživanje (**) a uzorci se razblažuju najmanje 200 puta (kako bi se spriječilo dejstvo matrice) u puferu za razblaživanje i nanose na pločice. Kontrola testa sprovodi se dva puta. U svaki bunarčić stavlja se 150 µl. Standardi se primjenjuju dva puta, a uzorci tri puta. Inkubira se tokom noći na 4 °C na mućkalici.

Pločice se ispiraju pet puta puferom za ispiranje (*).

Peroksidaza rena (HRP) povezana s dekstranskim lancem (npr. AMDEX A/S, Danska) i konjugovana antitijela razblažuju se u puferu za ispiranje; stvarno razblaživanje razlikuje se po seriji i starosti. U svaki bunarčić stavlja se 150 µl i pločice se inkubiraju sat vremena na sobnoj temperaturi na mućkalici.

Pločice se ispiraju pet puta puferom za ispiranje (*) i dno pločica pažljivo se čisti etanolom.

---

[64] *Pufer za homogenizaciju*:

[65] mM Tris-HCl pH-vrijednost 7,4; 1 % koktela inhibitora proteaze (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH-vrijednost 7,4 + 120 µl koktela inhibitora proteaze (ili ekvivalentnih koktela inhibitora proteaze).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Koktel inhibitora proteaze: iz proizvoda Sigma (za tkivo sisavaca) broj **P 8340**.

[66] Battelle AP4.6.04 (1,18 mg/ml (AAA)), prečišćeno u skladu s: Denslow, N. D., Chow, M.C., Kroll, K. J., Green, L. (1999.). Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. Ecotoxicology 8: 385. – 398.

U svaki bunarčić stavlja se 150 µl tetrametil benzidina (TMB) plus (***). Pločica se zaštićuje od svjetla aluminijumskom folijom i prati se razvoj boje u mućkalici.

Nakon što je potpuno razvijena standardna kriva, zaustavlja se djelovanje enzima dodavanjem 150 µl 0,2 M H2SO4 u svaki bunarčić.

Apsorbancija se mjeri na 450 nm (npr. na čitaču pločica Molecular Devices Thermomax). Podaci se analiziraju povezanim softverom (npr. Softmaxom).
(*) Pufer za ispiranje:

PBS – osnovni rastvor (****)	500,0	ml
goveĐi serumski albumin (BSA)	5,0	g
Tween 20	5,0	ml

Podesiti pH-vrijednosti na 7,3 i dodati millipore H_2O do 5 l. Čuvati na 4 °C.

(**) Pufer za razblaživanje:

PBS – osnovni rastvor (****)	100,0	ml
BSA	3,0	g
Tween 20	1,0	ml

Podesiti pH-vrijednosti na 7,3 i dodati millipore H_2O do 1 l. Čuvati na 4 °C.

(***) TMB plus je supstrat spreman za upotrebu koji proizvodi KemEnTec (Danska). Osjetljiv je na svjetlo. Čuvati na 4 °C.

(****) PBS – osnovni rastvor

NaCl	160,0	g
KH2PO4	4,0	g
Na2HPO4 .2H2O	26,6	g
KCl	4,0	g

Podesiti pH-vrijednosti na 6,8 i dodati millipore H2O do 2 l. Čuvati na sobnoj temperaturi.

Dodatak 7

Smjernica za pripremu sekcija tkiva za određivanje pola i određivanje stadijuma polnih žlijezda

Cilj ovog odsjeka je da se opišu postuci koji prethode histološkoj procjeni sekcija. Mogu se primjenjivati i drugi postupci čiji je rezultat slično određivanje pola i određivanje stadijuma polnih žlijezda.

Uz nekoliko izuzetaka, navedeni postupci slični su za medaku i zebricu.

1. Usmrćivanje, obdukcija i fiksiranje tkiva

Ciljevi:

1. obezbijediti usmrćivanje riba na human način;
2. dobiti potrebne tjelesne mase i mjerenja;
3. ocijeniti sekundarne polne karakteristike;

4. secirati tkiva za analizu VTG;
5. fiksirati polne žlijezde. *Postupci:*

Ribe je potrebno usmrtiti neposredno prije obdukcije. Stoga, osim ako na rapolaganju nije više osoba koje obavljaju seciranje, ne bi trebalo usmrćivati više riba istovremeno.

Riba se mrežicom uklanja iz eksperimentalne komore i u prenosnoj posudi prenosi u područje za obdukciju.

Riba se stavlja u rastvor za usmrćivanje. Riba se uklanja iz rastvora nakon prestanka disanja i nakon prestanka reagovanja na poljne nadražaje.

Određuje se mokra masa ribe.

Za pripremu tkiva za analizu VTG riba se može staviti na plutanu tablu na stolu mikroskopa za seciranje.

(a) Zebrici se glava reže neposredno iza prsnog peraja, a rep se reže neposredno iza leĐnog peraja.
(b) Medaki se otvara abdomen pažljivim rezom uz središnju trbušnu liniju od prsnog pojasa do tačke kranijalno od anusa. Jetra se pažljivo uklanja malim hvataljkama i malim makazama.

Uzorci za analizu VTG stavljaju se u Ependorf epruvete i odmah zamrzavaju tečnim azotom.

Trupla sa polnim žlijezdama stavljaju se u prethodno označenu plastičnu kasetu za tkivo koja se prenosi na Davidsonov ili Buinov (*Bouin's*) fiksativ. Zapremina fiksativa trebalo bi da bude najmanje deset puta približna zapremina tkiva. Posuda fiksativa lagano se protrese pet sekundi kako bi se uklonili mjehurići vazduha iz kasete.

8.

(a) Sva tkiva ostaju u Davidsonovom fiksativu tokom noći nakon čega se sljedećeg dana premještaju u pojedinačne posude s 10 %-tnim neutralnim puferisanim formalinom. Posude s kasetama lagano se mućkaju pet sekundi kako bi se obezbijedilo odgovarajuće prodiranje formalina u kasete;

(b) Tkiva ostaju u Buinovom fiksativu 24 sata nakon čega se premještaju u 70 %-tni etanol.

2. Obrada tkiva

Ciljevi:

Dehidrirati tkivo radi odgovarajućeg prodiranja parafina.

Impregnirati tkivo parafinom radi zadržavanja integriteta tkiva i stvaranja čvrste površine za mikrotomiju.

Postupci:

Označene kasete s tkivima uklanjanju se iz formalina/etanola i stavljaju u korpu(-e) za obradu. Korpa za obradu stavlja se u uređaj za obradu tkiva.

Bira se program obrade.

Nakon što uređaj za obradu tkiva završi ciklus obrade, korpa(-e) se može prenijeti u jedinicu za uklapanje.

3. Uklapanje

Cilj: Pravilno usmjeriti uzorak u očvrsnutom parafinu za mikrotomiju.

Postupci: Korpa(e) kaseta uklanja (uklanjaju) se iz uređaja za obradu i prastvara (prastvaraju) u prednju, parafinom ispunjenu posudu termalne konzole uklopne jedinice ili se kasete prenose u odvojeni parafinski grijač.

Prva kaseta koju treba uklopiti uklanja se iz prednje posude termalne konzole ili parafinskog grijača. Poklopac kasete uklanja se i baca, a oznaka kasete upoređuje se s evidencijom o životinjama kako bi se prije uklapanja riješila potencijalna odstepena.

Bira se kalup za uklapanje odgovarajuće veličine.

Kalup se drži ispod otvora konzole za doziranje i puni rastvorenim parafinom.

Uzorak se uklanja iz kasete i stavlja u rastvoreni parafin u kalupu. Postupak se ponavlja s četiri do osam uzoraka za svaki kalup s parafinom. Položaj pojedinačnih riba označava se stavljanjem ribe broj 1 pod uglom od 180 stepeni u odnosu na ribu broj 2 – 4/8.

Uzorak se prekriva dodatnim parafinom.

Kalup s postoljem kasete stavlja se na rashladnu ploču kriokonzole.

Nakon što parafin očvrsne blok (odnosno stvrdnuti parafin koji sadrži tkiva i postolje kasete) se uklanja iz kalupa.

4. Mikrotomija

Cilj: Izrezati i postaviti histološke sekcije za bojenje.

Postupci: Početna faza mikrotomije nazvana „orijentacija— sprovodi se na sljedeći način:

(a) Parafinski blok stavlja se na držač mikrotoma.
(b) Držač se podnosa prema naprijed okretanjem točka mikrotoma i režu se deblje sekcije s parafinske površine bloka dok nož ne dođe do uklopljenih tkiva.

(c) Debljina sekcije na mikrotomu postavljena je između tri i pet mikrona. Držač se podnosa prema naprijed i reže se više sekcija s bloka kako bi se uklonili svi artefakti nastali na izrezanoj površini tkiva tokom grubog obrezivanja.
(d) Blok se može ukloniti s držača i položiti licem prema dolje na led radi natapanja tkiva. Sljedeća faza mikrotomije je završno rezanje i postavljanje sekcija tkiva na predmetna stakla. Ti postupci sprovode se na sljedeći način:

(a) Ako je blok stavljen na led, on se uklanja s leda i postavlja na držač mikrotoma.
(b) Debljina sekcija na mikrotomu postavlja se na tri do pet mikrona i držač se podnosa prema naprijed okretanjem točka mikrotoma. Sekcije se režu iz bloka sve dok ne nastane „traka— koja sadrži najmanje jednu prihvatljivu sekciju uključujući i polne žlijezde. (Tokom rezanja blok se po potrebi može ukloniti iz držača, staviti na led radi natapanja tkiva i zatim ponovo postaviti na držač.)
(c) Sekcije plutaju na površini vode u vodenom kupatilu. Treba pokušati dobiti najmanje jednu sekciju bez nabora i bez zarobljenih mjehurića vazduha.
(d) Mikroskopsko staklo prastvara se ispod najbolje sekcije, koja se vadi iz vode pomoću stakla. Taj proces naziva se postavljanje sekcije na predmetno staklo.

(e) Pripremaju se po tri sekcije za grupu riba. Druga i treća sekcija vade se u intervalima od 50 mikrona nakon prve sekcije. Ako ribe nijesu uklopljene sa svojim polnim žlijezdama na istom nivou rezanja, treba napraviti više sekcija kako bi se obezbijedilo da se od svake ribe dobije najmanje šest sekcija sa polnim žlijezdama.
(f) Na predmetnom staklu olovkom za označavanje predmetnog stakla bilježi se broj bloka iz kojeg je pripremljen preparat.
(g) Predmetno staklo postavlja se na okvir za bojenje.
(h) Blok se uklanja s držača i postavlja licem prema dolje za čuvanje.

5. Bojenje, postavljanje pokrovnog stakla i označavanje predmetnih stakala

Ciljevi:

- Obojiti sekcije za histopatološki pregled.
- Trajno zapečatiti postavljena i obojena tkiva.
- Trajno odrediti obojene sekcije tako da se omogući potpuna sljedivost.

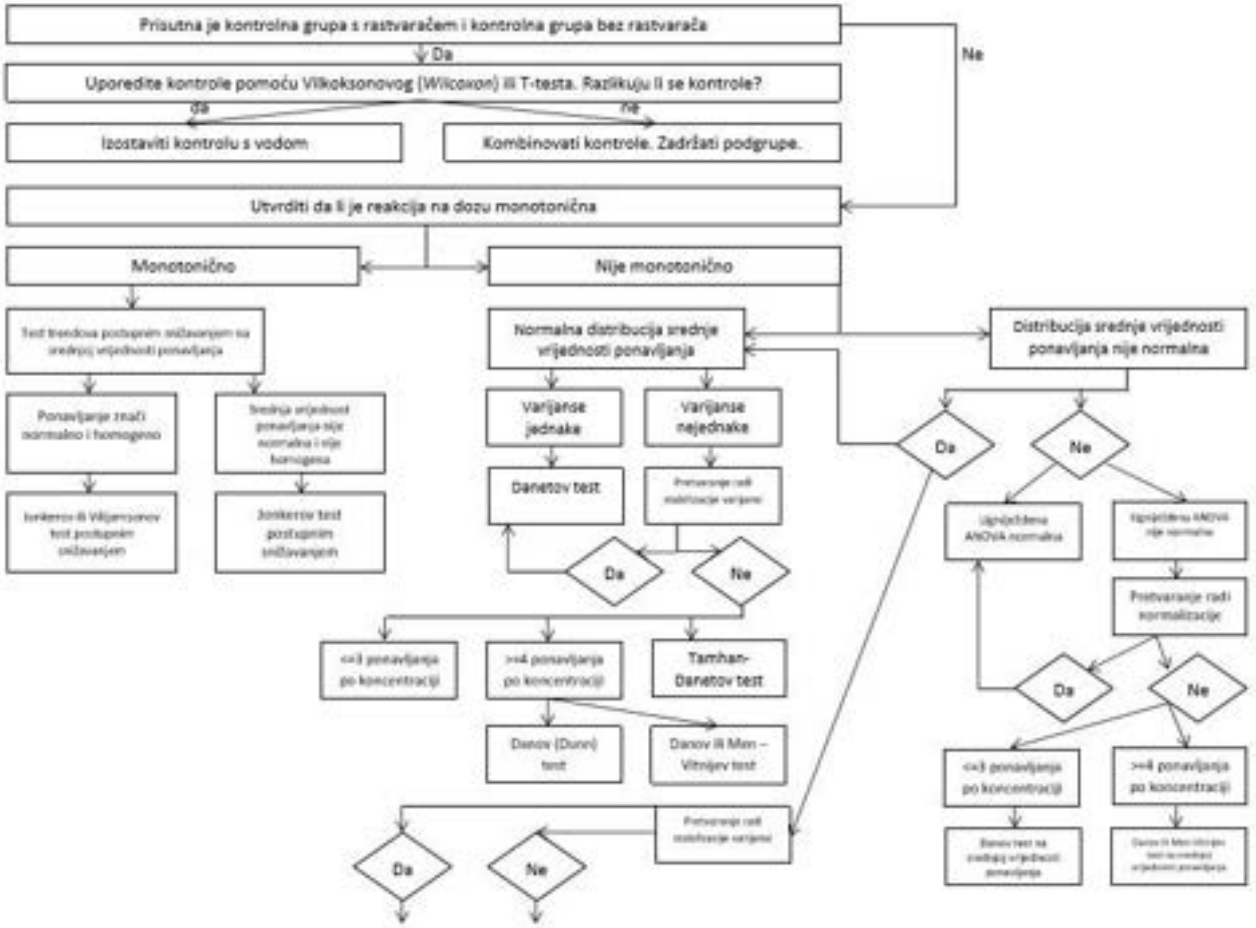
Postupci:

1. Bojenje
   (a) Predmetna stakla se prije bojenja suše na vazduhu tokom noći. (b) Sekcije se boje hematoksilin-eozinom.
2. Postavljanje pokrovnog stakla
   (a) Pokrovna stakla se postavljaju ručno ili automatski.
   (b) Predmetno staklo umače se u ksilen ili *TissueClear*, višak ksilena/*TissueClear* lagano se otrese s predmetnog stakla.
   (c) Oko 0,1 ml sredstva za pripremu preparata nanosi se blizu kraja predmetnog stakla nasuprot zamrznutom kraju ili na pokrovno staklo.
   (d) Pokrovno staklo se naginje pod blagim uglom pri postavljanju na predmetno staklo.
3. Označavanje
   (a) Svaka oznaka na predmetnom staklu trebalo bi da sadrži sljedeće informacije: (i) naziv laboratorijae;
   (ii) vrstu;

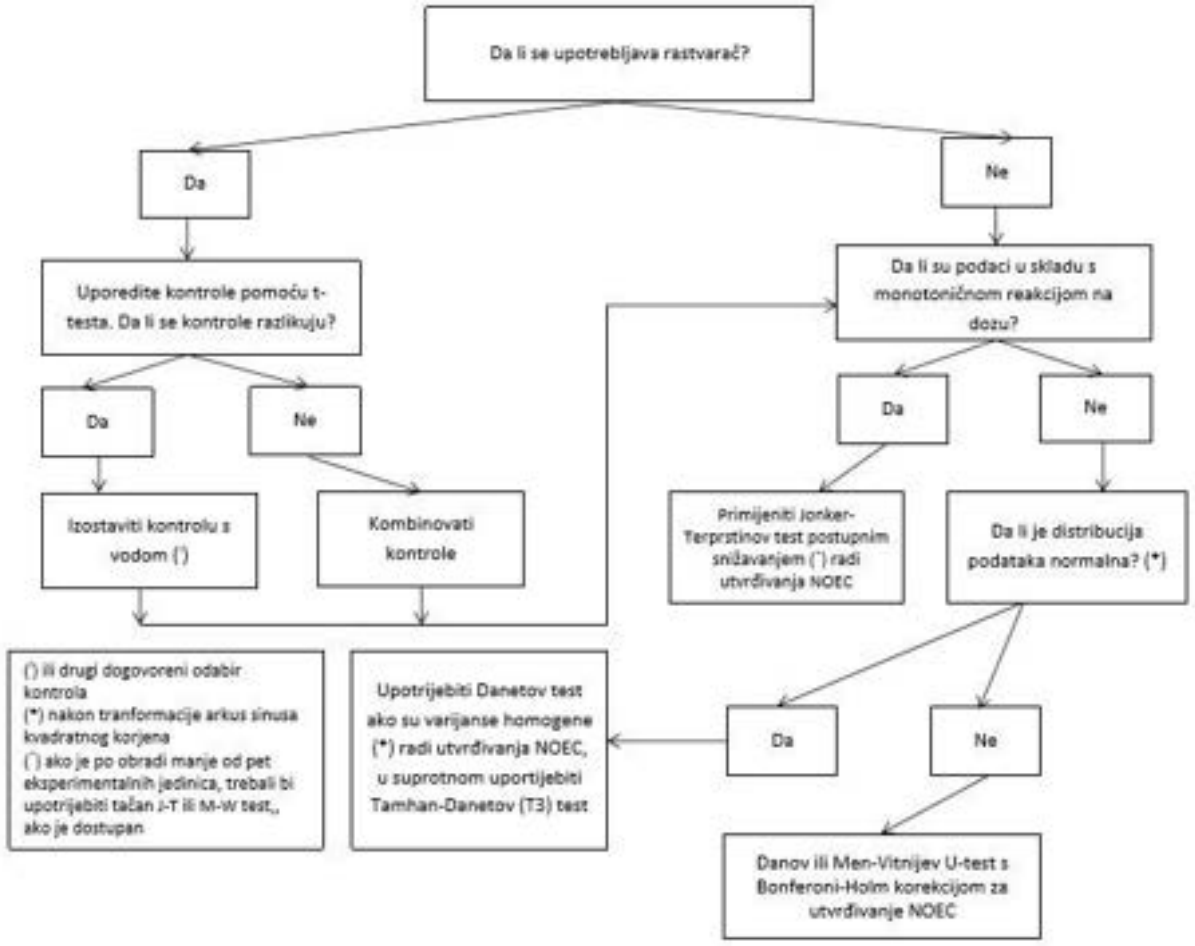
   (iii) broj uzorka/broj predmetnog stakla; (iv) hemikaliju/grupu obrade; (v) datum.

Dodatak 8

Statistički dijagram toka za analizu vitelogenina



Statistički dijagram toka za analizu odnosa polova



Dodatak 9

Smjernica za uzorkovanje tkiva za određivanje genetskog pola i za određivanje genetskog pola metodom PCR

1. Uzorkovanje, priprema i čuvanje tkiva prije određivanja genetskog pola metodom PCR kod medake (pripremila Laboratorijaa za vodene organizme Bayer CropScience AG)

Finim makazama reže se analno ili leĐno peraje svake pojedinačne ribe i stavlja u cijev napunjenu sa 100 µl pufera za ekstrakciju 1 (v. u nastavku detalje o pripremi pufera).

Makaze se nakon svake pojedinačne ribe čiste u laboratorijaskoj čaši napunjenoj destilovanom H_2O i suše papirnim ubrusom.

Nakon toga, tkivo peraja homogenizuje se teflonskim tučkom s mikrocjevčicom kako bi se razložile ćelije. Za svaku cijev upotrebljava se novi tučak kako bi se izbjegla bilo kakva kontaminacija. Tučci se tokom noći stavljaju u 0,5 M NaOH, ispiraju pet minuta u destilovanoj H_2O i čuvaju u etanolu ili sterilni nakon autoklava do upotrebe.

Tkivo peraja može se čuvati i bez pufera za ekstrakciju 1 na suvom ledu i zatim na – 80 °C u frižideru kako bi se spriječila bilo kakva degeneracija DNK. Međutiim, ekstrakciju je bolje ssprovesti uz istovremenu ekstrakciju DNK (v. prethodni postupak; uzorke bi trebalo odmrznuti na ledu nakon čuvanja na – 80 °C prije dodavanja pufera u cijevi).

Nakon homogenizacije sve cijevi stavljaju se u vodeno kupatilo i kuvaju 15 minuta na 100 °C.

Zatim se pipetom u svaku cijev dodaje 100 µl pufera za ekstrakciju 2 (v. u nastavku detalje o pripremi pufera). Uzorci se čuvaju na sobnoj temperaturi 15 minuta uz povremeno lagano mućkanje rukom.

Nakon toga sve cijevi se ponovo stavljaju u vodeno kupatilo i kuvaju dodatnih 15 minuta na 100 °C.

Do dalje analize cijevi se zamrzavaju na – 20 °C.

2. Priprema pufera

PCR-pufer 1:

500 mg N-lauroilsarkozina (npr. Merck KGaA, Darmštat, Njemačka)
2 ml 5M NaCl
dodaje se 100 ml destilovane H_2O
→ autoklav

PCR-pufer 2:

20 g Chelex (npr. Biorad, Minhen, Njemačka) da nadoĐe u 100 ml destilovane H_2O
→ autoklav

3. Određivanje genetskog pola (metodom PCR) kod medake (pripremili Laboratorijaa za vodene organizme Bayer CropScience AG i Univerzitet u Vircburgu Biozentrum)

Pripremljene i zamrznute cijevi (opisane u prethodnom odsjeku) odmrzavaju se na ledu. Nakon toga centrifugiraju se primjenom centrifuge za Ependorf epruvete (30 sekundi pri maksimalnoj brzini na sobnoj temperaturi). Za PCR se upotrebljava bistri supernatant odvojen od taloga. Apsolutno se mora izbjeći prenos bilo kakvih tragova Chelex (lokalizovanog u talogu) na reakciju PCR jer će to uticati na djelovanje polimeraze Taq.

Supernatant se upotrebljava direktno ili se može čuvati zamrznut (na – 20 °C) i ponovo odmrznuti u nekoliko ciklusa bez negativnog uticaja na DNK za kasnije analize.

1. Priprema „reakcione smješe— (25 µl po uzorku):

	Zapremina	Konačna koncentracija
Kalup DNK	0,5 µl – 2 µl	
10 x PCR-pufer s MgCl2	2,5 µl	1 x
Nukleotidi (svaki dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 µl (5 mM)	200 µM
Uzvodni prajmer (10 µM) (v. u nastavku 3 – 5)	0,5 µl	200 nM
Nizvodni prajmer (10 µM) (v. u nastavku 3 – 5)	0,5 µl	200 nM
DMSO	1,25 µl	5 %
Voda (stepen čistoće za PCR)	do 25 µl	
Polimeraza Taq E	0,3 µl	1,5 U

10 × PCR-pufer s MgCl2: 670 mM Tris/HCl (pH-vrijednost 8,8 na 25 °C), 160 mM (NH4)2SO4, 25 mM MgCl2, 0,1 Tween 20

Za svaki PCR (v. u nastavku 3 – 5) potreban je posebni prajmer kao nova kombinacija „reakcione smješe— i odgovarajuće potrebne količine kalupa DNK za svaki uzorak (v. prethodno). Odgovarajuće zapremine se pipetama prenose u nove cijevi. Nakon toga sve cijevi se zatvaraju, miješaju (oko deset sekundi) i centrifugiraju (deset sekundi na sobnoj temperaturi). Sada se može pokrenuti odgovarajući program PCR. Pored toga, u svakom programu PCR primjenjuju se pozitivna kontrola (reprezentativni uzorak DNK s poznatim djelovanjem i jasnim rezultatima) i negativna kontrola (1 µl destilovane H_2O).

2. Priprema agaroznog gela (1 %) – tokom sprovoĐenja programa PCR:

- Rastvoriti 3 g agaroze u 300 ml 1 × tris-acetatni EDTA pufera (TAE) (1 %-tni agarozni gel).
- Rastvor je potrebno kuvati u mikrotalasnoj peći (oko dva do tri minuta).
- Topli rastvor prenosi se u posebnu kutiju za livenje, koja je položena na led.
- Nakon približno 20 minuta agarozni gel spreman je za upotrebu. Agarozni gel čuva se u puferu TAE do kraja programa PCR.

3. Program PCR za aktin

Cilj navedene reakcije PCR je da se dokaže da DNK iz uzorka nije oštećen.

- Posebni pramjer:

„Mact1(gornji/uzvodni)— → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

„Mact2(donji/nizvodni)— → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG ⁻
Program:
pet minuta na 95 °C ciklus (35 puta)
denaturacija → 45 sekundi na 95 °C prekaljivanje → 45 sekundi na 56 °C
produženje → jedna minuta na 68 °C
15 minuta na 68 °C

4. Program PCR za gene X i Y

U okviru navedenog programa PCR upotrebljavaju se uzorci s netaknutim DNK za određivanje gena X i Y. Muški DNK trebalo bi da pokaže jednu dvostruku vrpcu, a ženski jednu jednostruku vrpcu (nakon bojenja i gel-elektroforeze). U sprovođenje ovog programa potrebno je uključiti jednu pozitivnu kontrolu za mužjake (uzorak XY) i jednu za ženke (uzorak XX).

⁻ Posebni prajmer:
„PG 17,5— (gornji/uzvodni) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG
„PG 17.6— (donji/nizvodni) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA ⁻
Program:
pet minuta na 95 °C ciklus (40 puta)
denaturacija → 45 sekundi na 95 °C prekaljivanje → 45 sekundi na 55 °C
produženje → jedna minuta 30 sekundi na 68 °C
15 minuta na 68 °C

5. Program PCR za gen Y kao „kontrola— programa PCR za gene X i Y

Ovim programom PCR potvrđuju se rezultati „programa PCR za gene X i Y—. „Muški uzorci— trebalo bi da pokažu jednu vrpcu, dok „ženski uzorci— ne bi trebalo da pokažu ni jednu vrpcu (nakon bojenja i gel-elektroforeze). ⁻ Posebni prajmer:
„DMTYa (gornji/uzvodni)— → GGC CGG GTC CCC GGG TG
„DMTYd (donji/nizvodni)— → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G ⁻ Program:
pet minuta na 95 °C ciklus (40 puta)
denaturacija → 45 sekundi na 95 °C prekaljivanje → 45 sekundi na 56 °C
produženje → jedna minuta na 68 °C
15 minuta na 68 °C

6. Bojenje uzoraka za PCR:

rastvor za bojenje:
50 % glicerola
100 mM EDTA
1 % natrijum dodecil sulfata (SDS)
0,25 % bromfenol plavog 0,25 % ksilencijanola
U svaku pojedinačnu cijev pipetom se stavlja 1 µl rastvora za bojenje.

7. Početak gel-elektroforeze:

- Pripremljeni 1 %-tni agarozni gel prenosi se u posudu za gel-elektroforezu koja je napunjena 1 × puferom TAE.

- Pipetom se prenosi 10 – 15 µl svakog obojenog uzorka za PCR u žlijeb u agaroznom gelu.
- U posebni žlijeb se pipetom dodaje i 5 – 15 µl „ljestvice— od 1 kb (Invitrogen).
- Početak elektroforeze na 200 V.
- Prestanak nakon 30 – 45 minuta.

8. *Određivanje traka:*

- Agarozni gel čisti se u destilovanoj H_2O.
- Zatim se agarozni gel prenosi u etidijum bromid u trajanju 15 – 30 minuta.
- Nakon toga potrebno je napraviti sliku agaroznog gela UV lampom.
- Na kraju se analiziraju uzorci u odnosu na traku (ili trake) iz pozitivne kontrole i ljestvicu.

Dodatak 10

Smjernica za uzorkovanje tkiva za određivanje genetskog pola metodom PCR kod trobodljeg gregorca

1. Uzorkovanje tkiva i ekstrakcija DNK

DNK se može ekstrahovati primjenom različitih komercijalno dostupnih reagenasa i ručnih i automatskih sistema za ekstrakciju. U nastavku je opisan protokol koji se upotrebljava u laboratorijai Cefas Weymouth i po potrebi su dodati alternativni pristupi.

Sa svake pojedinačne ribe finim makazama uklanja se mali komad tkiva (10 – 20 mg) s dorsolateralnog područja (nakon uklanjanja glave i repa za analizu VTG). Tkivo se dodaje u cijev i zatim stavlja direktno u tečni azot (za čuvanje na – 80 °C) ili se cijev puni 70 %-tnim etanolom (za prevoz i naknadno čuvanje na 4 °C). Nakon svake pojedinačne ribe makaze se čiste u 70 %-tnom etanolu i zatim u destilovanoj vodi i suše papirnim ubrusom.

Etanol se (ako je prisutan) uklanja aspiracijom i tkivo se tokom noći rastvara proteinazom K u 400 µl pufera za liziranje životinjskog tkiva (ATL) (Qiagen). Alikvot (200 µl) rastvor prenosi se u S-blok s 96 bunarčića (Qiagen) i ekstrahuje se DNK u formatu s 96 bunarčića primjenom pribora Qiagen Universal BioRobot i QIamp Investigator BioRobot. DNK se eluira u 50 µl vode bez DNase i RNase. Ako se za ekstrakciju DNK upotrebljavaju čvrsta tkiva (kao što su bodlje ili prsna peraja), može biti potrebno homogenizovati uzorak u puferu za liziranje uz primjenu instrumenta za liziranje tkiva FastPrep® ili ekvivalentnog sistema za liziranje tkiva.

Kao druga mogućnost,

(a) tkivo se rastvara tokom noći proteinazom K u 400 µl pufera za liziranje G2 (Qiagen) i ekstrahuje se DNK iz 200 µl rastvora uz primjenu pribora za jednostavno dobijanje DNK iz tkiva EZ-1 i pribora EZ-1 biorobot ili minipribora za jednostavno dobijanje DNK iz tkiva. DNK se eluira u 50 µl zapremine;

(b) tkiva se obrađuju primjenom reagensa DNAzol. Ukratko, uzorci tkiva liziraju se u 1 ml DNAzola deset minuta u mikrocentrifuškoj tubici od 1,5 ml i zatim centrifugiraju na 13 000 o/min pet minuta kako bi se uklonile sve čestice. Lizirani uzorak zatim se prenosi u novu mikrocentrifušku tubicu od 1,5 ml koja sadrži 500 µl etanola 100 %tne

molekularne čistoće i potom centrifugira na 13 000 o/min deset minuta kako bi nastao talog DNK. Etanol se uklanja i zamjenjuje s 400 µl etanola 70 %-tne molekularne čistoće, sprovodi se centrifugiranje na 13 000 rpm pet minuta i rastvara se pelet DNK u 50 µl vode bez DNase i RNase za molekularnu biologiju. Ponovo, ako se upotrebljavaju čvrsta tkiva (prsna peraja), može biti potrebno homogenizovati uzorak u puferu za liziranje primjenom instrumenta za liziranje tkiva FastPrep® ili ekvivalentnog sistema za liziranje tkiva prije ekstrakcije DNK. DNK se čuva na – 20 °C do upotrebe.

Važna napomena: obavezno je nošenje rukavica tokom postupaka.

2. Analiza polimerazne lančane reakcije (PCR)

Sprovedene su amplifikacije primjenom 2,5 µl ekstrakta DNK u 50 µl reakcione zapremine uz upotrebu prajmera lokusa Idh (kako je opisano u Pajhel i drugi (Peichel et al.), 2004. Current Biology 1:1416. – 1424.):

uzvodni prajmer 5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3' nizvodni prajmer 5'

TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

Mnogo je dobavljača odgovarajućih reagensa za PCR. Metoda opisana u nastavku trenutno se primjenjuje u laboratorijai Cefas Weymouth.

1. Priprema „reakcione smješe— (50 µl po uzorku)

Glavna smješa priprema se kako slijedi. Smješu je moguće pripremiti unaprijed i čuvati zamrznutu na – 20 °C do upotrebe. Treba pripremiti dovoljno glavne smješe za negativnu kontrolu (samo voda za molekularnu biologiju).

	Zapremina (koncentracija zaliha) / uzorak	Konačna koncentracija
5 x reakcioni pufer GoTaq®	10 µl	1 x
MgCl2	5 µl (25 mM)	2,5 mM
Nukleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (25 mM svaki)	250 µM svaki
Uzvodni prajmer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Nizvodni prajmer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Voda za molekularnu biologiju	30,75 µl	
Polimeraza GoTaq	0,25 µl	1,25 U

- Uliti 47,5 µl u označenu cijev za PCR tankog zida od 0,5 ml.
- Dodati 2,5 µl pročišćenog DNK u odgovarajuće označenu cijev. Postupak se ponavlja za sve uzorke i negativnu kontrolu.
- Na vrh se nanose dvije kapi mineralnog ulja. Kao druga mogućnost može se upotrijebiti cirkularna termalna kupka sa zagrijanim poklopcem.
- Zatvoriti poklopce.
- Uzorci su bili denaturisani u cirkularnoj termalnoj kupki Peltier PTC-225 na 94 ± 2 °C pet minuta nakon čega je uslijedilo 39 ciklusa na 94 ± 2 °C jedan minut, na 55 ± 2 °C jedan minut, na 72 ± 2 °C jedan minut i konačno produženje na 72 ± 2 °C deset minuta.

2. Priprema agaroznog gela (2 %)

Tradicionalno se produkti PCR razdvajaju na 20 % agaroznom gelu koji sadrži etidijum bromid.

Mogu se upotrebljavati i kapilarni sistemi za elektroforezu.

- Izvagati 2 g agaroze u 100 ml 1 × pufera TAE.
- Zagrijati u mikrotalasnoj peći (oko 2 – 3 minute) kako bi se rastvorila agaroza.
- Dodati dvije kapi etidijum bromida konačne koncentracije od 0,5 µg/ml. Topli
- rastvor prenijeti u opremu za livenje od gela. Gel ostaviti kako bi se stvrdnuo.
-

3. Gel-elektroforeza

- Agarozni gel prenijeti u opremu za elektroforezu i prastvoriti u 1 × pufer TAE.
- Puniti 20 µl svakog uzorka u zasebni bunarčić uz dodavanje markera molekularne mase (DNK ljestvica 100 bp, Promega) u rapoloživi bunarčić. – Elektroforeza se sprovodi na 120 V u trajanju 30 – 45 minuta.

4. Vizualizacija produkata amplifikacije

Ako je etidijum bromid bio uključen u agarozni gel kako je prethodno opisano, produkti DNK vidljivi su pod izvorom UV svjetla. Kao druga mogućnost agarozni gel boji se prekrivanjem gela razrijeđenim rastvorom etidijum bromida (0,5 µg/ml u vodi) 30 minuta prije vizualizacije.

Dodatak 11

Smjernica za postupak vještačke oplodnje za trobodljeg gregorca

Cilj ovog odsjeka je da se opišu postupci za dobijanje oploĐenih jajašaca trobodljeg gregorca radi njihove upotrebe u ispitivanju polnog razvoja riba.

1. Postupci

1.1. Dobijanje sperme od mužjaka

Usmrćuje se mužjak dobre boje iz željene populacije.

Ribi se sa svake strane seciraju testisi. Testisi su uobičajeno jako pigmentirane strukture u obliku štapa koje su jasno vidljive na bočnoj središnjoj liniji tijela. Primjenjuje se bilo koja od metoda navedenih u nastavku.

Finim makazama počinje se od kloake i pravi se rez veličine 1 – 1,5 cm jednim potezom pod uglom od približno 45 stepeni

Skalpelom se pravi mali rez sa strane ribe malo iza karlice i odmah ventralno od bočnih pločica. Testisi se uklanjaju finim hvataljkama i stavljaju u Petrijevu šolju. Svaki testis prekriva se sa 100 µl svježe pripremljenog **Hankovog konačnog rastvora (*).**

Testisi se usitnjavaju britvicom ili skalpelom. Time se oslobaĐa sperma i Hankov rastvor poprima mliječni izgled.

Tečnost koja sadrži spermu dodaje se u cijev uz istovremeno izbjegavanje dodavanja djelova tkiva testisa prilikom prenosa pipetom.

800 µl Hankovog konačnog rastvora dodaje se u cijev i dobro se miješa.

Po potrebi se mužjak može konzervisati fiksiranjem u 100 %-tnom etanolu ili drugom željenom fiksativu. To je naročito važno ako se u studiji određuje roditeljsko porijeklo potomaka.

(*) Hankov puferisani slani rastvor (HBSS):

HBSS je potreban za konzervisanje sperme uz njenu istovremenu pripremu za oplodnju.

Važna napomena: *Iako se većina osnovnih rastvora može pripremiti unaprijed,* ***osnovni rastvor 5*** *i kasnije* ***konačni rastvor*** *potrebno je pripremiti* ***svježe*** *na dan upotrebe.*

Osnovni rastvor 1	
NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Destilovana voda	100 ml
Osnovni rastvor 2	
Na2HPO4 (anhidridni)	0,358 g
KH2PO4	0,60 g
Destilovana voda	100 ml
Osnovni rastvor 3	
$CaCl_2$	0,72 g
Destilovana voda	50 ml
Osnovni rastvor 4	
MgSO4 7H2O	1,23 g
Destilovana voda	50 ml
Osnovni rastvor 5 (svježe pripremljen)	
NaHCO3	0,35 g
Destilovana voda	10 ml

Napomena: Ako su neke od prethodno navedenih soli već na rapolaganju, ali s različitim sadržajem vode (npr. $2H_2O$ umjesto anhidridnog), mogu se upotrijebiti, ali prvo se prilagoĐava masa na osnovu molekularne mase.

Za Hankov konačni rastvor sastojci se kombinuju sljedećim redosljedom:

osnovni rastvor 1	1,0 ml
osnovni rastvor 2	0,1 ml
osnovni rastvor 3	0,1 ml
destilovana voda	8,6 ml
osnovni rastvor 4	0,1 ml
osnovni rastvor 5	0,1 ml.

Dobro promiješati prije upotrebe.

2. Oplodnja

U željenoj populaciji identifikuju se velike, gravidne ženke; ženke su spremne za istiskivanje tek kada su vidljiva jajašca koja izlaze iz kloake. Spremne ženke imaju karakterističan položaj s „uzdignutom glavom—.

Prstom ili palcem nježno se prelazi niz bočnu stranu ribe prema repu kako bi se podstaklo izbacivanje vrećice s jajašcima u Petrijevu šolju. Postupak se ponavlja s druge strane i zatim se riba vraća u akvarijum.

Jajašca se mogu raširiti (tako da čine jedan sloj) finom četkicom. Važno je pokušati što je moguće više jajašaca izložiti spermi tako da je korisno maksimalno povećati površinu jajašaca. Važna napomena: jajašca je potrebno održavati vlažnima tako da se oko njih položi vlažni papirni ubrus (važno je da jajašca ne dodiruju vodu direktno jer to može dovesti do stvrdnjavanja koriona prije vremena čime se sprečava oplodnja). Velika je razlika u broju jajašaca koje svaka ženka može da proizvede, ali u prosjeku od pojedinačne gravidne ženke trebalo bi lako dobiti oko 150 jajašaca.

Četkicom se 25 µl sperme u Hankovoj smješi ravnodnosno raspoređuje preko cijele površine jajašaca. Jajašca će se brzo stvrdnuti i promijeniti boju (u roku od jednog minuta) nakon početka oplodnje. Ako je procijenjeni broj jajašaca veći od 150, postupak se ponavlja. Slično tome, ako se jajašca ne stvrdnu u roku od jednog minuta, dodaje se još sperme. Važna napomena: Dodavanjem sperme ne poboljšava se nužno stopa oplodnje.

Jajašca i rastvor sa spermom ostavljaju se najmanje 15 minuta radi „interakcije—, a oploĐena jajašca potrebno je staviti u akvarijume za izlaganje u roku od 1,5 sati nakon oplodnje.

Postupak se ponavlja s drugom ženkom dok se ne prikupi željeni broj jajašaca.

Iz prethodne serije zadržava nekoliko jajašaca i fiksira u 10 %-tnoj sirćetnoj kisjelini.

3. Brojanje i raspoređivanje jajašaca u ispitnim akvarijumima

Jajašca se ravnodnosno raspoređuju između svakog nivoa obrade kako bi se izbjeglo uticanje na izbor genetskog materijala. Svaku seriju oploĐenih jajašaca potrebno je tupim instrumentom (npr. širokim entomološkim hvataljkama ili upotrebom inokulacione petlje) razdvojiti u grupe jednake veličine (čiji broj odgovara broju nivoa obrade). Ako je cilj četiri ponavljanja po obradi, za 20 jajašaca u svakom ponavljanju treba distribuirati 80 jajašaca po akvarijumu za izlaganje. Važna napomena: Preporučuje se dodatnih 20 % (odnosno 96 jajašaca po nivou obrade) dok nije sigurno da je postignuta 100 %-tna stopa oplodnje.

Jajašca trobodljeg gregorca vrlo su sklona gljivičnim infekcijama van gnijezda koje čuva otac. U tom smislu je kritično važno da se sva jajašca tretiraju metilenskim plavim tokom prvih pet dana ispitivanja. Osnovni rastvor metilenskog plavog priprema se u koncentraciji 1 mg/ml i dodaje se akvarijumima za izlaganje kako bi se dobila maksimalna konačna koncentracija od 2,125 mg/l. Važna napomena: Trobodljeg gregorca ne bi trebalo izlagati metilenskom plavom nakon izlijeganja pa bi sistem do šestog dana trebalo da bude bez metilenskog plavog.

Jajašca se svakodnevno pregledaju i bilježe se sva mrtva ili neoploĐena jajašca kao takva. Važna napomena: Jajašca nikada ne bi smjela da budu izvan vode do izlijeganja, čak ni u vrlo kratkim periodima.

1. OPŠTI UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD (TG) 306 (1992). Kada su razvijane originalne ispitne metode nije bilo poznato u kojoj mjeri se rezultati testova pretraživanja na laku biorazgradivost u kojima su se primjenjivali slatka voda i izlazne otpadne vode ili aktivni mulj kao inokulum mogu primjenjivati na morsku sredinu. U tom smislu zabilježeni su različiti rezultati.

Brojne industrijske otpadne vode, koje sadrže različite hemikalije, dolaze u more direktnim ispuštanjem ili preko ušća i rijeka u kojima je vrijeme zadržavanja kratko u odnosu na period potreban za potpunu biorazgradnju mnogih prisutnih hemikalija. Zbog sve veće svijesti o potrebi zaštite morske sredine od sve većeg opterećenja hemikalijama i potrebi da se procijeni vjerovatna koncentracija hemikalija u moru, razvijene su ispitne metode za biorazgradivost u morskoj vodi.

U ovdje opisanim metodama upotrebljava se morska voda kao vodena faza i kao izvor mikroorganizama. U nastojanju da se postigne usklaĐenost s metodama za laku biorazgradivost u slatkoj vodi, sprovedena su istraživanja ultrafiltrirane i centrifugirane morske vode i primjene morskih sedimenata kao inokuluma. Ta istraživanja bila su neuspješna. Stoga je ispitni medijumum prirodna morska voda koja je prethodno prečišćena kako bi se uklonile grube čestice.

Za ocjenu konačne biorazgradivosti metodom mućkanja u staklenom balonu moraju se upotrijebiti relativno visoke koncentracije ispitivane supstance zbog slabe osjetljivosti analitičke metode rastvorenog organskog ugljenika (DOC). Zbog toga je potrebno morskoj vodi dodati mineralne nutrijente (N i P) jer bi u suprotnom njihovim niskim koncentracijama bilo ograničeno uklanjanje DOC. Nutrijente je potrebno dodati i u metodi zatvorenih boca zbog koncentracije dodate ispitivane supstance.

Stoga metode nijesu ispitivanja na laku biorazgradivost jer se mikroorganizmima koji su već prisutni u morskoj vodi ne dodaje inokulum. Ispitivanjima se isto tako ne simulira morska sredina jer se dodaju nutrijenti i jer je koncentracija ispitivane supstance puno veća nego što bi bila u moru. Zbog navedenih razloga predložene su metode u okviru novog pododsjeka „Biorazgradivost u morskoj vodi—.

2. PRIMJENA

Rezultatima ispitivanja, koji bi se primjenjivali jer se modelom upotrebe i odlaganja predmetne supstance ukazuje na put do mora, ostavlja se prvi utisak biorazgradivosti u morskoj vodi. Ako je rezultat pozitivan (> 70 % uklanjanja DOC, > 60 % teoretske potrošnje kiseonika (TPK)), može se zaključiti da postoji potencijal za biorazgradnju u morskoj sredini. Međutiim, negativnim rezultatom ne isključuje se takav potencijal, već se ukazuje na to da su potrebne dalje studije, na primjer uz primjenu što je moguće niže koncentracije ispitivane supstance.

U svakom slučaju, ako je za brzinu ili stepen biorazgradnje u morskoj vodi na određenom mjestu potrebna tačnija vrijednost, moraće se primijeniti druge, složenije i sofisticiranije, a time i skuplje metode. Na primjer, mogao bi se primijeniti simulacioni test u kojem se primjenjuje koncentracija ispitivane supstance bliža vjerovatnoj koncentraciji u sredini. Pored toga, mogla bi se upotrijebiti morska voda koja nije ojačana i prethodno prečišćenja i koja je uzeta s lokacije od interesa pa bi se specifičnom hemijskom analizom mogla pratiti primarna

biorazgradnja. Za konačnu biorazgradivost bile bi potrebne supstance označene pomoću ^{14}C kako bi se mogle izmjeriti brzine nestanka rastvorljivog organskog ^{14}C i proizvodnje $^{14}CO_2$ u realnim koncentracijama u sredini.

3. IZBOR METODA

8. Izbor metode zavisi od brojnih faktora, a tabela u nastavku služi kao pomoć pri izboru. Iako se supstance čija je rastvorljivost u vodi manja od ekvivalenta 5 mg C/l ne mogu ispitivati metodom mućkanja u staklenom balonu, slabo rastvorljive supstance se u načelu mogu ispitivati makar metodom zatvorenih boca.

Tabela: **Prednosti i nedostaci testa mućkanja u staklenom balonu i testa za zatvorenim bocama**

METODA	PREDNOSTI	NEDOSTACI
MUĆKANJE U STAKLENOM BALONU	- jednostavna aparatura, osim analizatora ugljenika – trajanje od 60 dana nije problem – bez interferencije nitrifikacije - može se prilagoditi za isparljive supstance	- potreban je analizator ugljenika - upotreba 5 – 40 mg DOCa/1, može imati inhibitorni efekat - DOC se teško određuje na niskim koncentracijama u morskoj vodi (dejstvo hlorida) - DOC je ponekad visok u morskoj vodi
ZATVORENE BOCE	– jednostavna – aparatura jednostavno završno određivanje – primjenjuje se niska koncentracija ispitivane supstance (2 mg/l) pa se time smanjuje mogućnost inhibicije – jednostavno prilagoĐavanje za isparljive supstance	– može biti teško održavati nepropusnost boca – rast bakterija na zidovima može dovesti do lažnih vrijednosti – vrijednosti potrošnje O_2 u slijepim probama mogu biti visoke, naročito nakon 28 dana; može se prevazići starenjem morske vode – moguća interferencija potrošnje O_2 zbog nitrifikacije

METODA MUĆKANJA U STAKLENOM BALONU

1. UVOD

Ova metoda je varijanta izmijenjenog testa pretraživanja OECD za morsku vodu opisanog u poglavlju C.4.B ovog aneksa (2). Dovršena je kao rezultat prstenastog ispitivanja koje je za Evropsku komisiju (EK) organizovao Danski institut za kvalitet vode (3).

Kao i kod prateće metode zatvorenih boca za morsku sredinu, rezultate ispitivanja ne treba smatrati indikatorima lake biorazgradivosti, već ih je potrebno primjenjivati isključivo za dobijanje informacija o biorazgradivosti supstance u morskim sredinama.

2. NAČELO METODE

Unaprijed utvrđena količina ispitivane supstance rastvara se u ispitnom medijumumu kako bi se dobila koncentracija od 5 – 40 mg rastvorenog organskog ugljenika (DOC)/l. Ako se poboljšaju granice osjetljivosti analiza organskog ugljenika, primjena nižih koncentracija ispitivane supstance može biti korisna, naročito za supstance s inhibitornim efektima. Rastvor ispitivane supstance u ispitnom medijumumu inkubira se uz mućkanje u mraku ili pod difuznom rasvjetom u aerobnim uslovima na fiksnoj temperaturi (koja se održava na ± 2 °C) koja je uobičajeno u rasponu od 15- do 20 °C. U slučajevima u kojima je cilj studije simulacija situacija u sredini, ispitivanja se mogu ssprovesti van uobičajenog temperaturnog područja. Preporučeno je maksimalno trajanje ispitivanja oko 60 dana. Nakon razgradnje slijede mjerenja DOC (konačna razgradnja), a u nekim slučajevima i specifična analiza (primarna razgradnja).

3. INFORMACIJE O ISPITIVANOJ SUPSTANCI

4. Kako bi se utvrdilo da li se ispitivanje može primijeniti na određenu supstancu, moraju biti poznata neka od njenih svojstava. Mora se utvrditi sadržaj organskog ugljenika supstance, njena isparljivost mora biti takva da ne dolazi do značajnih gubitaka tokom ispitivanja i njena rastvorljivost u vodi trebalo bi da bude veća od ekvivalenta 25 – 40 mg C/l. Isto tako, ispitivana supstanca ne bi trebalo značajno da se adsorbuje na staklene površine. Za tumačenje dobijenih rezultata potrebne su informacije o čistoći ili relativnim udjelima glavnih sastojaka ispitivane supstance, naročito ako su vrijednosti blizu nivoa prolaznosti.

5. Informacije o toksičnosti ispitivane supstance za bakterije, na primjer dobijene mjerenjima u kratkoročnim testovima stope disanja (4), mogu biti korisne za izbor odgovarajućih ispitnih koncentracija i mogu biti ključne za ispravno tumačenje niskih vrijednosti biorazgradnje. Međutiim, takve informacije nijesu uvijek dovoljne za tumačenje rezultata dobijenih ispitivanjem biorazgradnje pa je postupak opisan u stavu 18 pogodniji.

4. REFERENTNE SUPSTANCE

Moraju se primijeniti odgovarajuće referentne supstance za provjeru djelovanja mikroba u uzorku morske vode. Natrijum benzoat, natrijum acetat i anilin primjeri su supstanci koje se mogu primijeniti u tu svrhu. Referentne supstance moraju se razgraditi u razumno kratkom roku, a u suprotnom preporučuje se ponavljanje ispitivanja uz upotrebu drugog uzorka morske vode.

U prstenastom ispitivanju za EK, u kojem su se uzorci morske vode uzimali na različitim lokacijama i u različito doba godine (3), eksponencijalna faza razvoja (tL) i vrijeme potrebno za postizanje 50 %-tne razgradnje (t50), isključujući eksponencijalnu fazu razvoja, iznosili su od jednog do četiri dana, odnosno od jednog do sedam dana za natrijum benzoat. Za anilin je tL bio u rasponu od nula do deset dana, a t50 od jednog do deset dana.

5. MJERNA REPRODUKTIVNOST I OSJETLJIVOST METODE

Mjerna reproduktivnost metode utvrĐena je prstenastim ispitivanjem (3). Najniža koncentracija ispitivane supstance za koju se ova metoda može primijeniti s analizom DOC u velikoj mjeri određena je granicom detekcije analize organskog ugljenika (trenutno oko 0,5 mg C/l) i koncentracijom rastvorenog organskog ugljenika u upotrijebljenoj morskoj vodi (obično 3 – 5 mg/l za vodu s otvorenog mora). Fonska koncentracija DOC ne bi trebalo da prelazi oko 20 % ukupne koncentracije DOC nakon dodavanja ispitivane supstance. Ako to nije izvodljivo, fonsku koncentraciju DOC ponekad je moguće smanjiti starenjem morske vode prije ispitivanja. Ako se metoda primjenjuje samo sa specifičnom hemijskom analizom (kojom se mjeri primarna razgradnja), ispitivač mora navoĐenjem dodatnih informacija dokumentovati da li se može očekivati konačna razgradivost. Navedene dodatne informacije mogu se sastojati od rezultata drugih ispitivanja na laku ili svojstvenu biorazgradivost.

5.1. OPIS METODE

5.1.1. Aparatura

Uobičajena laboratorijaska aparatura i:

a. šejker s automatskom regulacijom temperature ili smješten u prostoriji s konstantnom temperaturom od 15- do 20 °C koja se održava unutar ± 2 °C za Erlenmajerove boce od 0,5 do 2 litra;
b. Erlenmajerove boce uskog vrata od 0,5 do 2 litra;
c. aparatura za membransku filtraciju ili centrifuga;
d. membranski filteri, 0,2–0,45 µm;
e. analizator ugljenika;
f. oprema za specifičnu analizu (po izboru).

5.1.2. Morska voda

Uzorak morske vode uzima se temeljno očišćenom posudom i prenosi u laboratorijau, po mogućnosti u roku od jednog ili dva dana od skupljanja. Tokom prenosa temperatura uzorka ne smije značajno da preĐe temperaturu koja će se primjenjivati tokom ispitivanja. Lokacija uzorkovanja precizno se određuje i opisuje s obzirom na status u pogledu zagaĐenja i nutrijenata. Naročito za obalne vode u navedeni opis uključuje se i broj heterotrofnih kolonija mikroba i određivanje koncentracija rastvorenog nitrata, amonijaka i fosfata.

O samom uzorku morske vode navode se sljedeće informacije: datum
- skupljanja, dubina skupljanja, izgled uzorka, zamućenost itd., temperatura
- u trenutku skupljanja, salinitet.
- DOC,
- vrijeme između skupljanja i upotrebe u ispitivanju.

Ako se utvrdi da je sadržaj DOC u uzorku morske vode visok (stav 8), preporučuje se starenje morske vode u trajanju od približno sedmicu dana prije upotrebe. Starenje vode sprovodi se u aerobnim uslovima na sobnoj temperaturi u mraku ili pod difuznom rasvjetom.

Aerobni uslovi po potrebi se održavaju blagom aeracijom. Tokom starenja smanjuje se sadržaj lako razgradivog organskog materijala. Prstenastim ispitivanjem (3) nije utvrĐena nikakva razlika između potencijala razgradnje uzoraka starije i svježe skupljene morske

vode. Prije upotrebe morska voda se prethodno obraĐuje kako bi se uklonile grube čestice, npr. filtracijom kroz najlonski filter ili grubi papirni filter (ne kroz membranski filter ili GF-C filter) ili taloženjem i pretakanjem. Primijenjeni postupak mora se zabilježiti. Prethodna obrada sprovodi se nakon starenja ako je ssprovedeno.

5.1.3. Osnovni rastvori za mineralne nutrijente

13. Pripremaju se sljedeći osnovni rastvori s analitički čistim reagensima:

(a) Kalijum dihidrogen fosfat, KH_2PO_4	8,50 g
Dikalijum hidrogen ortofosfat, K_2HPO_4	21,75 g
Dinatrijum hidrogen ortofosfat dihidrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
Amonijum hlorid, NH_4Cl	0,50 g
Rastvara se i miješa do jednog litra s destilovanom vodom.	
(b) Kalcijum hlorid, $CaCl_2$	27,50 g
Rastvara se i miješa do jednog litra s destilovanom vodom.	
(c) Magnezijum sulfat heptahidrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
Rastvara se i miješa do jednog litra s destilovanom vodom.	
(d) GvožĐe (III) hlorid heksahidrat, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
Rastvara se i miješa do jednog litra s destilovanom vodom.	

Taloženje u rastvoru (d) može se spriječiti dodavanjem jedne kapi koncentrovanog HCl ili 0,4 g etilendiamintetrasirćetne kisjeline (EDTA, dinatrijum soli) po litru. Ako se u osnovnom rastvoru stvori talog, treba ga zamijeniti svježe pripremljenim rastvorom.

5.1.4. Priprema ispitnog medijumuma

Dodaje se 1 ml svakog od prethodno navedenih osnovnih rastvora po litru prethodno prečišćene morske vode.

5.1.5. Inokulum 15. Mikroorganizmima koji su već prisutni u morskoj vodi ne dodaje se specifični inokulum.

Određuje se (po izboru) broj heterotrofa koji čine kolonije u ispitnom medijumumu morske vode (po mogućnosti i u izvornim uzorcima morske vode), npr. određivanjem broja na pojedinačnim pločicama primjenom morskog agara. To je naročito poželjno kod uzoraka s obalnih ili zagaĐenih mjesta. Provjerava se djelovanje heterotrofnih mikroba u morskoj vodi sprovođenjem ispitivanja s referentnom supstancom.

5.1.6. Priprema balona

Treba obezbijediti da sva staklena oprema bude temeljno očišćena, ali ne nužno sterilna (npr. da je očišćena alkoholnom hlorovodoničnom kisjelinom) i da je isprana i osušena prije upotrebe kako bi se izbjegla kontaminacija ostacima iz prethodnih ispitivanja. Baloni isto tako moraju biti očišćeni prije prve upotrebe.

Ispitivana supstanca ocjenjuje se u dva paralelna balona istovremeno zajedno s jednim balonom za referentnu supstancu. Za određivanje analitičkih slijepih proba dva puta se paralelno sprovodi slijepa proba bez ispitivane i referentne supstance. Ispitivane supstance rastvaraju se u ispitnom medijumumu - one se mogu prikladno dodati pomoću koncentrovanog osnovnog rastvora - kako bi se dobile željene početne koncentracije, uobičajeno 5 – 40 mg DOC/l. Referentna supstanca uobičajeno se ispituje pri početnoj koncentraciji koja odgovara 20 mg DOC/l. Ako se upotrebljavaju osnovni rastvori ispitivane

i/ili referentne supstance, treba obezbijediti da ne doĐe do velike promjene saliniteta morske vode.

Ako se mogu očekivati ili se ne mogu isključiti toksična dejstva, savjetuje se da se u plan ispitivanja uključi dvostruko paralelno sprovođenje eksperimenta inhibicije. Ispitivana i referentna supstanca dodaju se u istu posudu, pri čemu je koncentracija referentne supstance uobičajeno jednaka onoj u kontrolnom ispitivanju (odnosno 20 mg DOC/l) kako bi se omogućilo poređenje.

U Erlenmajerove boce odmjeravaju se odgovarajuće količine ispitnih rastvora (praktična količina je do približno polovine zapremine balona), nakon čega se svaki balon prekriva (npr. aluminijskom folijom) tako da se omogući izmjena gasova iz balona i okolnog vazduha. (Čepovi od vate nijesu odgovarajući ako se primjenjuje analiza DOC). Posude se stavljaju u šejker i neprekidno mućkaju blagom brzinom (npr. 100 o/min) tokom čitavog ispitivanja. Temperatura se održava (15 – 20 °C i na ± 2 °C), a posude se zaštićuju od svjetla kako bi se spriječio rast algi. Treba obezbijediti da u vazduhu nema toksičnih materijala.

5.1.7. Fizičko-hemijsko kontrolno ispitivanje (po izboru)

20. Ako se sumnja u abiotičku razgradnju ili mehanizme gubitaka, kao što su hidroliza (problem samo sa specifičnom analizom), isparavanje ili adsorpcija, savjetuje se sprovođenje fizičko-hemijskog kontrolnog eksperimenta. On se može ssprovesti dodavanjem živinog (II) hlorida ($HgCl_2$) [67] (50–100 mg/l) posudama s ispitivanom supstancom kako bi se prekinulo djelovanje mikroba. Značajnim smanjenjem koncentracije DOC ili specifične supstance u fizičko-hemijskom kontrolnom ispitivanju ukazuje se na abiotičke mehanizme uklanjanja.

Ako se upotrebljava živin hlorid, potrebno je obratiti pažnju na interferencije ili trovanje katalizatora u analizi DOC)

5.1.8. Broj balona

U tipičnom ispitivanju upotrebljavaju se sljedeći baloni:

Baloni 1 i 2	sadrže ispitivanu supstancu (ispitna suspenzija),
Baloni 3 i 4	sadrže samo morsku vodu (slijepa proba),
Balon 5	sadrži referentnu supstancu (kontrola postupka),
Balon 6	sadrži ispitivanu i referentnu supstancu (kontrola toksičnosti) – po izboru,
Balon 7	sadrži ispitivanu supstancu i sredstvo za sterilizaciju (abiotička sterilna kontrola) – po izboru.

5.1.9. Analiza DOC

Tokom ispitivanja uzorci se u odgovarajućim intervalima uzimaju za analizu DOC (Dodatak 1). Uzorci se uvijek uzimaju na početku ispitivanja (0. dan) i zatim 60. dana. Za opis vremenskog toka razgradnje ukupno je potrebno minimum pet uzoraka. Budući da brzina

[67] Ţivin (II) hlorid ($HgCl_2$) je vrlo toksična supstanca s kojom je potrebno postupati uz odgovarajuće mjere opreza. Tečni otpad koji sadrţi tu hemikaliju trebalo bi odlagati na odgovarajući način; ne bi ga trebalo ispuštati u sistem otpadnih voda.

biorazgradnje varira, nije moguće navesti fiksni vremenski raspored uzorkovanja. DOC se određuje dva puta paralelno na svakom uzorku.

5.1.10. Uzorkovanje

Potrebna zapremina uzoraka zavisi od analitičke metode (specifična analiza), upotrijebljenog analizatora ugljenika i odabranog postupka (membranska filtracija ili centrifugiranje) za obradu uzorka prije određivanja ugljenika (st. 25 i 26). Prije uzorkovanja potrebno je obezbijediti da je ispitni medijumum dobro promiješan i da je sav materijal koji se prilijepi na zidove rastvoren ili suspendovan.

Membranska filtracija ili centrifugiranje sprovodi se odmah nakon uzorkovanja. Filtrirani ili centrifugirani uzorci po potrebi se čuvaju na 2 – 4 °C do 48 sati ili ispod – 18 °C ako je riječ o dužim periodima (ako je poznato da to neće imati dejstva na supstancu, ona se acidifikuje na pH-vrijednost 2 prije čuvanja).

Odgovarajući su membranski filteri (0,2 – 0,45 μm) koji ne otpuštaju ugljenik i ne adsorbuju supstancu tokom filtracije, npr. polikarbonatni membranski filteri. Neki su membranski filteri impregnirani surfaktantima radi hidrofilizacije i mogu otpuštati značajne količine rastvorenog ugljenika. Takvi filteri pripremaju se kuvanjem u dejonizovanoj vodi tokom tri uzastopna jednosatna perioda. Filteri se nakon kuvanja čuvaju u dejonizovanoj vodi. Prvih 20 ml filtrata se odbacuje.

Kao alternativa membranskoj filtraciji može se odabrati centrifugiranje uzoraka. Uzorci se centrifugiraju na 40 000 m.s– 2 (~ 4000 g) 15 minuta, po mogućnosti u hladnoj centrifugi.

Napomena: Čini se da diferencijacija ukupnog organskog ugljenika (TOC) u odnosu na DOC (TOC/DOC) centrifugiranjem pri vrlo niskim koncentracijama ne djeluje jer se njome ne uklanjaju sve bakterije ili se ugljenik ponovo rastvara kao dio bakterijske plazme. Čini se da je greška centrifugiranja pri većim ispitnim koncentracijama (> 10 mg C po litru) uporedivo manja.

5.1.11. Učestalost uzorkovanja

Ako se analize sprovode odmah nakon uzorkovanja, vrijeme sljedećeg uzorkovanja ocjenjuje se uzimajući u obzir rezultate analitičkog određivanja.

Ako se uzorci čuvaju (stav 24) za kasniju analizu, treba uzeti više uzoraka od potrebnih najmanje pet. Prvo se analiziraju zadnji uzorci, a postupnim izborom odgovarajućih uzoraka za analizu obrnutim redosljedom moguće je dobiti dobar opis krive biorazgradnje s relativno malim brojem analitičkih određivanja. Ako do kraja ispitivanja nije došlo do razgradnje, nije potrebno analizirati dalje uzorke i u toj situaciji se strategijom obrnutog redosljeda mogu uštedjeti znatni troškovi analize.

Ako je opaženo da je kriva dostigla plato prije 60. dana, ispitivanje se završava. Ako je očigledno da je razgradnja počela prije 60. dana, ali još nije dostigla plato, eksperiment se produžava za dodatni period.

6. PODACI I IZVJEŠTAVANJE

6.1. Obrada rezultata

Analitički rezultati bilježe se u priloženom obrascu za dostavljanje podataka (Dodatak 2) i iizračunavaju se vrijednosti biorazgradnje za ispitivanu i referentnu supstancu na osnovu sljedeće jednačine:

$$Dt = \ 1 - \frac{Ct - Cbl(t)}{Co - Cbl(o)} \ x\ 100$$

pri čemu je:

Dt = razgradnja u procentu uklanjanja DOC ili specifične supstance u vremenu t,

Co = početna koncentracija DOC ili specifične supstance u ispitnom medijumumu,

Ct = koncentracija DOC ili specifične supstance u ispitnom medijumumu u vremenu t,

Cbl(0) = početna koncentracija DOC ili specifične supstance u slijepoj probi, Cbl(t) = koncentracija DOC ili specifične supstance u slijepoj probi u vremenu t.

Razgradnja se navodi kao procenat uklanjanja DOC (konačna razgradnja) ili uklanjanja specifične supstance (primarna razgradnja) u vremenu t. Koncentracije DOC iizračunavaju se do najbližeg 0,1 mg po litru, a srednje vrijednosti Dt zaokružuju se na najbliži cijeli procenat.

Tok razgradnje grafički se prikazuje dijagramom kako je prikazano na slici u odsjeku „Valjanost i tumačenje rezultata—. Ako je na rapolaganju dovoljno podataka, iz krive se iizračunava eksponencijalna faza razvoja (tL) i vrijeme potrebno za postizanje 50 %-tnog uklanjanja od kraja eksponencijalne faze razvoja (t50).

6.2. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju mora sadržati sljedeće informacije.

Ispitivana supstanca:

- fizičko stanje i po potrebi fizičko-hemijska svojstva, podatke za identifikaciju.

Uslovi ispitivanja:

- lokaciju i opis mjesta uzorkovanja, stanje zagaĐenja i nutrijenata (broj kolonija, nitrat, amonijak, fosfat po potrebi),
- svojstva uzorka (datum uzorkovanja, dubinu, izgled, temperaturu, salinitet, DOC (po izboru), vrijeme od skupljanja do upotrebe u ispitivanju),
- metodu (ako je primijenjena) za starenje morske vode,
- metodu primijenjenu za prethodnu obradu (filtraciju/taloženje) morske vode,
- metodu primijenjenu za određivanje DOC,
- metodu primijenjenu za specifičnu analizu (po izboru),
- metodu primijenjenu za određivanje broja heterotrofa u morskoj vodi (metodu određivanja broja na pojedinačnim pločicama ili alternativni postupak) (po izboru),
- druge metode (po izboru) primijenjene za opis morske vode (mjerenja adenozintrifosfata (ATP) itd).

Rezultati:

- analitičke podatke zabilježene u obrascu za dostavljanje podataka (Dodatak 2),
- tok ispitivanja razgradnje predstavljen je grafičkim dijagramom kojim su prikazani eksponencijalna faza razvoja (tL), nagib i vrijeme (počevši od kraja eksponencijalne faze razvoja) potrebno za postizanje 50 %-tnog uklanjanja (t50). Eksponencijalna

faza razvoja može se procijeniti grafički kako je prikazano na slici u odsjeku „Valjanost i tumačenje rezultata— ili se može prikladno uzeti kao vrijeme potrebno za 10 %-tnu razgradnju,

- procenat razgradnje izmjerene nakon 60 dana ili na kraju ispitivanja.

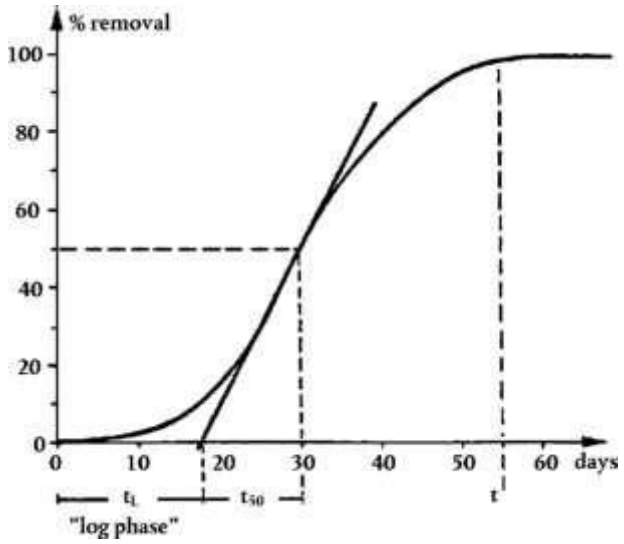
Rasprava o rezultatima.

6.3. Valjanost i tumačenje rezultata

Rezultati dobijeni na osnovu referentnih supstanci, npr. natrijum benzoata, natrijum acetata ili anilina, trebalo bi da budu uporedivi s rezultatima dobijenim prstenastim ispitivanjem (3) (v. odsjek „Referentne supstance— stav 7). Ako su rezultati dobijeni na osnovu referentnih supstanci atipični, ispitivanje je potrebno ponoviti uz upotrebu drugog uzorka morske vode. Iako se rezultati testova inhibicije možda ne mogu uvijek direktno tumačiti zbog doprinosa ispitivane supstance DOC, značajno smanjenje brzine uklanjanja ukupnog DOC u odnosu na brzinu iz kontrole je pozitivan znak toksičnih dejstava.

Zbog relativno visokih upotrijebljenih ispitnih koncentracija u odnosu na većinu prirodnih sistema (i stoga nepovoljan odnos koncentracija ispitivanih supstanci i drugih izvora ugljenika) metoda se smatra preliminarnim ispitivanjem koje se može primijeniti kako bi se pokazalo da li je supstanca lako biorazgradiva ili ne. U skladu s time, nizak rezultat ne znači nužno da ispitivana supstanca nije biorazgradiva u morskim sredinama, već pokazuje da će za utvrĐivanje navedenog biti potrebno obaviti dodatni posao.

Primjer eksperimenta teoretske razgradnje kojim se ilustruje izvodiv način procjene vrijednosti tL (dužine „eksponencijalne faze razvoja—) i t50 (vremenskog intervala počevši od tL) potrebnog za postizanje 50 %-tnog uklanjanja prikazan je na slici u nastavku.



METODA ZATVORENIH BOCA

1. UVOD

Ova metoda je varijanta testa sa zatvorenim bocama (5) i dovršena je kao rezultat prstenastog ispitivanja koje je za Evropsku komisiju (EK) organizovao Danski institut za kvalitet vode (3).

Kao i kod prateće metode mućkanja u staklenom balonu za morsku sredinu, rezultate ispitivanja ne treba smatrati indikatorima lake biorazgradivosti, već ih je potrebno

primjenjivati isključivo za dobijanje informacija o biorazgradivosti supstance u morskim sredinama.

2. NAČELO METODE

Unaprijed određena količina ispitivane supstance rastvara se u ispitnom medijumumu pri uobičajenoj koncentraciji od 2 – 10 mg ispitivane supstance po litru (može se upotrijebiti jedna koncentracija ili više njih). Rastvor se drži u napunjenoj i zatvorenoj boci u mraku u kupatilu ili kućištu s konstantnom temperaturom koja se održava na ± 1 °C u rasponu od 15do 20 °C. U slučajevima u kojima je cilj studije simulacija situacija u sredini, ispitivanja se mogu ssprovesti van uobičajenog temperaturnog područja pod uslovom da su za održavanje temperature predviĐena odgovarajuća prilagoĐavanja. Nakon razgradnje slijedi analiza kiseonika u periodu od 28 dana.

Prstenastim ispitivanjem pokazalo se da ako je ispitivanje trajalo duže od 28 dana, nijesu bile prikupljene nikakve korisne informacije, u većini slučajeva zbog jakih interferencija. Vrijednosti biološke potrošnje kiseonika (BPK) u slijepim probama bile su pretjerano visoke vjerovatno zbog rasta na zidovima prouzrokovanog izostankom miješanja i zbog nitrifikacije. Stoga se preporučuje trajanje od 28 dana, ali ako vrijednost BPK u slijepim probama ostane u granicama od 30 % (st. 15 i 40), ispitivanje se može produžiti.

3. INFORMACIJE O ISPITIVANOJ SUPSTANCI

Kako bi se utvrdilo da li se ispitivanje može primijeniti na određenu supstancu, moraju biti poznata neka od njenih svojstava. Za iizračunavanje teoretske potrošnje kiseonika (TPK) potrebna je empirijska formula (v. Dodatak 3); u suprotnom se kao referentna vrijednost mora odrediti hemijska potrošnja kiseonika (HPK) supstance. Primjena HPK je manje zadovoljavajuća jer neke supstance ne oksidiraju potpuno u ispitivanju HPK.

Rastvorljivost supstanci trebalo bi da bude najmanje 2 mg/l, iako se u načelu mogu ispitivati i slabije rastvorljive supstance (npr. primjenom ultrazvučne obrade) kao i isparljive supstance. Za tumačenje dobijenih rezultata potrebne su informacije o čistoći ili relativnim udjelima glavnih sastojaka ispitivane supstance, naročito ako su vrijednosti blizu nivoa prolaznosti.

Informacije o toksičnosti ispitivane supstance bakterije, npr. dobijene mjerenjima u kratkoročnim testovima disanja (4), mogu biti vrlo korisne za izbor odgovarajućih ispitnih koncentracija i mogu biti ključne za ispravno tumačenje niskih vrijednosti biorazgradnje.
Međutiim, takve informacije nijesu uvijek dovoljne za tumačenje rezultata dobijenih ispitivanjem biorazgradnje pa je postupak opisan u stavu 27 prikladniji.

4. REFERENTNE SUPSTANCE

Moraju se primijeniti odgovarajuće referentne supstance za provjeru djelovanja mikroba u uzorku morske vode. U tu svrhu mogu se upotrebljavati (na primjer) anilin, natrijum acetat ili natrijum benzoat. Do razgradnje navedenih supstanci od najmanje 60 % (njihova TPK) mora doći u razumno kratkom roku, a u suprotnom se preporučuje ponavljanje ispitivanja s drugim uzorkom morske vode.

U prstenastom ispitivanju za EK, u kojem su se uzorci morske vode uzimali na različitim lokacijama i u različito doba godine, eksponencijalna faza razvoja (tL) i vrijeme potrebno za postizanje 50 %-tne razgradnje (t50), isključujući eksponencijalnu fazu razvoja, iznosili su od nula do dva dana odnosno od jednog do četiri dana za natrijum benzoat. Za anilin vrijednosti tL i t50 iznosile su od nula do sedam odnosno od dva do 12 dana.

5. MJERNA REPRODUKTIVNOST

Mjerna reproduktivnost metoda utvrĐena je prstenastim ispitivanjem za EK (3).

6. OPIS METODE

6.1. Aparatura

Uobičajena laboratorijaska oprema i:

(a) mogu se upotrijebiti staklene boce BPK sa staklenim čepovima od 250 – 300 ml ili boce uskog vrata od 250 ml sa staklenim čepovima;
(b) nekoliko boca od dva, tri ili četiri litra s označenim litrima za pripremu eksperimenta i za punjenje boca BPK;
(c) vodeno kupatilo ili prostorija s konstantnom temperaturom (± 1 °C) bez svjetla;
(d) oprema za analizu rastvorenog kiseonika;
(e) membranski filteri, 0,2–0,45 μm; (f) oprema za specifičnu analizu (po izboru).

6.2. Morska voda

Uzorak morske vode uzima se temeljno očišćenom posudom i prenosi u laboratorijau, po mogućnosti u roku od jednog ili dva dana od skupljanja. Tokom prenosa temperatura uzorka ne smije značajno da prelazi temperaturu koja će se primjenjivati tokom ispitivanja.

Lokacija uzorkovanja precizno se određuje i opisuje s obzirom na status u pogledu zagaĐenja i nutrijenata. Naročito se za obalne ili zagaĐene vode u navedeni opis uključuje i broj heterotrofnih kolonija mikroba i određivanje koncentracija rastvorenog nitrata, amonijaka i fosfata.

O samom uzorku morske vode navode se sljedeće informacije:

- datum skupljanja, dubina skupljanja, izgled uzorka, zamućenost itd,
- temperatura u trenutku skupljanja, salinitet, rastvoreni organski ugljenik (DOC),
- vrijeme između skupljanja i upotrebe u ispitivanju.
- Ako se utvrdi da je sadržaj DOC u uzorku visok ili ako se smatra da bi BPK u
- slijepim probama nakon 28 dana bio veći od 30 % od procenta referentne
- supstance, preporučuje se starenje morske vode u trajanju od približno sedmicu
- dana prije upotrebe.

Starenje uzorka sprovodi se u aerobnim uslovima na sobnoj temperaturi u mraku ili pod difuznom rasvjetom. Aerobni uslovi po potrebi se održavaju blagom aeracijom. Tokom starenja smanjuje se sadržaj lako razgradivog organskog materijala. Prstenastim ispitivanjem (3) nije utvrĐena nikakva razlika između potencijala razgradnje uzoraka starije i svježe skupljene morske vode.

Prije upotrebe morska voda se prethodno obraĐuje kako bi se uklonile grube čestice, npr. filtracijom kroz najlonski filter ili grubi papirni filter (ne kroz membranski filter ili GF-C filter) ili

taloženjem i pretakanjem. Primijenjeni postupak se bilježi. Prethodna obrada sprovodi se nakon starenja ako je ssprovedeno.

6.3. Osnovni rastvori za mineralne nutrijente

Pripremaju se sljedeći osnovni rastvori s analitički čistim reagensima:

(a) kalijum dihidrogen ortofosfat, KH_2PO_4	8,50 g
dikalijum hidrogen ortofosfat, K_2HPO_4	21,75 g
dinatrijum hidrogen ortofosfat dihidrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
amonijum hlorid, NH_4Cl	0,50 g
Rastvara se i miješa do jednog litra s destilovanom vodom.	
(b) kalcijum hlorid, $CaCl_2$	27,50 g
Rastvara se i miješa do jednog litra s destilovanom vodom.	
(c) magnezijum sulfat heptahidrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
Rastvara se i miješa do jednog litra s destilovanom vodom.	
(d) GvožĐe (III) hlorid heksahidrat, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g

Rastvara se i miješa do jednog litra s destilovanom vodom.

Taloženje u rastvoru (d) može se spriječiti dodavanjem jedne kapi koncentrovanog HCl ili 0,4 g etilendiamintetrasirćetne kisjeline (EDTA, dinatrijum soli) po litru. Ako se u osnovnom rastvoru stvori talog, treba ga zamijeniti svježe pripremljenim rastvorom.

6.4. Priprema ispitnog medijumuma

Po litru prethodno prečišćene morske vode dodaje se 1 ml svakog od prethodno navedenih osnovnih rastvora. Ispitni medijumum zasićuje se vazduhom na ispitnoj temperaturi aeracijom čistim komprimovanim vazduhom oko 20 minuta. Određuje se koncentracija rastvorenog kiseonika u svrhu kontrole. Zasićena koncentracija rastvorenog kiseonika kao funkcija saliniteta i temperature može se očitati iz nomograma priloženog ovoj ispitnoj metodi (Dodatak 4).

6.5. Inokulum Mikroorganizmima koji su već prisutni u morskoj vodi ne dodaje se specifični inokulum. Određuje se (po izboru) broj heterotrofa koji čine kolonije u ispitnom medijumumu morske vode (po mogućnosti i u izvornom uzorku morske vode), npr. određivanjem broja na pojedinačnim pločicama primjenom morskog agara. To je naročito poželjno kod uzoraka s obalnih ili zagaĐenih mjesta. Provjerava se djelovanje heterotrofnih mikroba u morskoj vodi sprovođenjem ispitivanja s referentnom supstancom.

6.6. Priprema ispitnih boca

Sprovode se sve potrebne manipulacije uključujući starenje i prethodnu obradu morske vode na odabranoj ispitnoj temperaturi između 15 i 20 °C kako bi se obezbijedila čistoća, ali ne i sterilnost cjelokupne staklene opreme.

Pripremaju se grupe boca BPK za određivanje BPK ispitivane i referentne supstance u simultanim eksperimentalnim nizovima. Sve analize sprovode se u dvije paralelne boce (slijepe probe, referentna i ispitivana supstanca), odnosno pripremom dvije boce za svako određivanje. Analize se sprovode najmanje 0., 5., 15. i 28. dana (četiri određivanja). Pri analizi kiseonika za četiri određivanja potrebno je ukupno 3 × 2 × 4 = 24 boce (slijepe probe,

referentna i ispitivana supstanca) i oko osam litara ispitnog medijumuma (za jednu koncentraciju ispitivane supstance).

U velikim bocama dovoljne zapremine posebno se pripremaju rastvori ispitivane i referentne supstance (stav 11) tako da se prvo doda ispitivana i referentna supstanca direktno ili upotrebom koncentrovanog osnovnog rastvora u djelimično napunjene velike boce. Dodaje se još ispitnog medijumuma kako bi se dobila konačna željena koncentracija. Ako se upotrebljavaju osnovni rastvori ispitivane i/ili referentne supstance, treba obezbijediti da ne dođe do znatne promjene saliniteta morske vode.

Koncentracije ispitivane i referentne supstance biraju se uzimajući u obzir:

(a) rastvorljivost rastvorenog kiseonika u morskoj vodi pri prevladavajućoj ispitnoj temperaturi i salinitetu (v. priloženi nomogram u Dodatku 4);
(b) BPK morske vode u slijepim probama i
(c) očekivanu biorazgradivost ispitivane supstance.

Na 15 °C i 20 °C i pri salinitetu od 32 promila (okeanska voda) rastvorljivost rastvorenog kiseonika je oko 8,1 odnosno 7,4 mg/l. Potrošnja kiseonika morske vode (disanje u slijepim probama) može biti 2 mg O2/l ili više ako morska voda nije bila podvrgnuta starenju. Stoga, kako bi se obezbijedilo da nakon oksidacije ispitivane supstance ostane značajna koncentracija kiseonika, primjenjuje se početna koncentracija ispitivane supstance od oko 2– 3 mg/l (zavisno od TPK) za supstance za koje se očekuje da će se potpuno razgraditi u uslovima ispitivanja (kao što su referentne supstance). Slabije razgradive supstance ispituju se pri većim koncentracijama, do oko 10 mg/l, pod uslovom da nema toksičnih dejstava. Sprovođenje paralelnih ispitivanja s niskom (oko 2 mg/l) i visokom (oko 10 mg/l) koncentracijom ispitivane supstance može biti korisno.

Kiseonik u slijepoj probi mora se odrediti paralelno u bocama koje ne sadrže ispitivanu ili referentnu supstancu.

Ako se određuju inhibitorni efekti, priprema se sljedeći niz rastvora u posebnim velikim bocama :

(a) 2 mg po litru lako razgradive supstance, npr. bilo koje od navedenih referentnih supstanci;
(b) x mg po litru ispitivane supstance (x je obično 2);
(c) 2 mg po litru lako razgradive supstance plus x mg po litru ispitivane supstance.

6.7. Fizičko-hemijsko kontrolno ispitivanje (po izboru)

Ako se upotrebljava opcija primjene specifične analize, može se ssprovesti fizičko-hemijski eksperiment kako bi se provjerilo da li je ispitivana supstanca uklonjena abiotičkim mehanizmima poput hidrolize ili adsorpcije. Fizičko-hemijsko kontrolno ispitivanje može se ssprovesti dodavanjem živinog (II) hlorida (HgCl2)[68] (50–100 mg/l) s dva paralelna balona s ispitivanom supstancom kako bi se prekinulo djelovanje mikroba. Znatnim smanjenjem koncentracije specifične supstance tokom ispitivanja ukazuje se na abiotičke mehanizme uklanjanja.

[68] Živin (II) hlorid (HgCl2) je vrlo toksična supstanca s kojom je potrebno postupati uz odgovarajuće mjere opreza. Tečni otpad koji sadrži tu hemikaliju trebalo bi odlagati na odgovarajući način; ne bi ga trebalo ispuštati direktno u sistem otpadnih voda.

6.8. Broj boca BPK u tipičnom ispitivanju

U tipičnom ispitivanju upotrebljavaju se sljedeće boce:

- najmanje osam boca koje sadrže ispitivanu supstancu, najmanje osam boca
- koje sadrže samo morsku vodu ojačanu nutrijentima, najmanje osam boca koje
- sadrže referentnu supstancu i po potrebi šest boca koje sadrže ispitivanu i
- referentnu supstancu (kontrola toksičnosti).

7. POSTUPAK

Odmah nakon pripreme svaki rastvor se ispušta iz donje četvrtine (ne s dna) odgovarajuće velike boce kako bi se napunila odgovarajuća grupa boca BPK. Nulte kontrole (u nultom vremenu) odmah se analiziraju u pogledu rastvorenog kiseonika ili se čuvaju za kasniju hemijsku analizu taloženjem s MnCl2 (mangan (II) hloridom) i NaOH (natrijum hidroksidom).

Preostale paralelne boce BPK inkubiraju se na ispitnoj temperaturi (15–20 °C), drže se u mraku i uklanjaju iz prostora inkubacije u odgovarajućim vremenskim intervalima (npr. minimum nakon 5., 15. i 28. dana) i analiziraju se u pogledu rastvorenog kiseonika.

Uzorci za specifičnu analizu filtriraju se kroz membranski filter (0,2–0,45 μm) ili centrifugiraju 15 minuta (po izboru). Ako se ne analiziraju odmah, čuvaju se do 48 sati na 2–4 °C ili duže na – 18 °C (ako je poznato da to neće imati dejstva na ispitivanu supstancu, ona se acidifikuje na pH-vrijednost 2 prije čuvanja).

7.1. Određivanje rastvorenog kiseonika

Koncentracija rastvorenog kiseonika određuje se hemijskom ili elektro-hemijskom metodom priznatom na nacionalnom ili međunarodnom nivou.

8. PODACI I IZVJEŠTAVANJE

8.1. Obrada rezultata

Analitički rezultati bilježe se u priloženim obrascima za dostavljanje podataka (Dodatak 5).

BPK se iizračunava kao razlika u potrošnji kiseonika između slijepe probe i rastvora ispitivane supstance u uslovima ispitivanja. Neto potrošnja kiseonika dijeli se s koncentracijom (w/v) supstance kako bi se BPK izrazio kao mg BPK/mg ispitivane supstance. Razgradnja je definisana kao odnos biohemijske potrošnje kiseonika i po mogućnosti teoretske potrošnje kiseonika (TPK) ili hemijske potrošnje kiseonika (HPK) i izražena kao procenat (v. stav 36).

Vrijednosti biorazgradnje iizračunavaju se za svako vrijeme uzorkovanja za ispitivanu i referentnu supstancu na osnovu jedne od sljedeće dvije jednačine:

$$\%\ biorazgradnje = \frac{\frac{mgO_2}{mg}\ ispitivane\ supstance}{mg\frac{TPK}{mg}\ ispitivane\ supstance}\ x\ 100$$

$$\% \, biorazgradnje = \frac{\frac{mgO_2}{mg} \; ispitivane \; supstance}{mg\frac{HPK}{mg} ispitivane \; supstance} \; x \; 100$$

pri čemu je:

TPK = teoretska potrošnja kiseonika (za iizračunavanje v. Dodatak 3) HPK = hemijska potrošnja kiseonika određena eksperimentima.

Napomena: Ponekad dva načina izračunavanja (kao procenat TPK ili procenat HPK) ne daju jednake rezultate; prednost se daje primjeni TPK jer neke supstance ne oksidiraju potpuno u ispitivanju HPK.

Tok ispitivanja razgradnje grafički se prikazuje dijagramom (v. primjer u odsjeku „Valjanost i tumačenje rezultata—). Ako je na rapolaganju dovoljno podataka, iz krive biorazgradnje iizračunavaju se eksponencijalna faza razvoja (tL) i vrijeme (t50) potrebno za postizanje 50 %-tnog uklanjanja od kraja eksponencijalne faze razvoja.

Ako se primjenjuje specifična analiza (po izboru), navodi se procenat primarne razgradnje kao procenat uklanjanja specifične supstance u periodu ispitivanja (uz korekciju za analitičke slijepe probe).

8.2. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju mora sadržati sljedeće informacije.

Ispitivana supstanca:

- fizičko stanje i po potrebi fizičko-hemijska svojstva, podatke za identifikaciju.
-

Uslovi ispitivanja:

- lokaciju i opis mjesta uzorkovanja: stanje zagaĐenja i nutrijenata (broj kolonija, nitrat, amonijak, fosfat po potrebi),
- svojstva uzorka (datum uzorkovanja, dubinu, izgled, temperaturu, salinitet, DOC (po izboru), vrijeme od skupljanja do upotrebe u ispitivanju),
- metodu (ako je primijenjena) za starenje morske vode,
- metodu primijenjenu za prethodnu obradu (filtraciju/taloženje) morske vode,
- metodu primijenjenu za određivanje HPK (ako je ssprovedeno), metodu
- primijenjenu za mjerenja kiseonika,
- postupak dispergovanja za supstance koje su slabo rastvorljive u uslovima ispitivanja,

- metodu primijenjenu za određivanje broja heterotrofa u morskoj vodi (metodu određivanja broja na pojedinačnim pločicama ili alternativni postupak),
- metodu primijenjenu za određivanje DOC u morskoj vodi (po izboru), metodu
- primijenjenu za specifičnu analizu (po izboru), druge neobavezne metode
- primijenjene za opis morske vode (mjerenja ATP itd).

Rezultati:

- analitičke podatke zabilježene u obrascu za dostavljanje podataka (priložen u Dodatku 5), – tok ispitivanja razgradnje predstavljen grafički dijagramom kojim su prikazani eksponencijalna faza razvoja (tL), nagib i vrijeme (počevši od kraja

eksponencijalne faze razvoja) potrebno za postizanje 50 %-tne konačne potrošnje kiseonika prouzrokovane oksidacijom ispitivane supstance (t50). Eksponencijalna faza razvoja može se procijeniti grafički kako je prikazano na priloženoj slici ili se može prikladno uzeti kao vrijeme potrebno za 10 %-tnu razgradnju,

- procenat razgradnje izmjerene nakon 28 dana.

Rasprava o rezultatima.

8.3. Valjanost i tumačenje rezultata

Disanje u slijepoj probi ne bi trebalo da prelazi 30 % kiseonika u ispitnoj boci. Ako se navedeni kriterijum ne može ispuniti upotrebom svježe skupljene morske vode, mora se ssprovesti starenje (stabilizacija) morske vode prije upotrebe.

Potrebno je uzeti u obzir mogućnost da na rezultate mogu uticati supstance koje sadrže azot.

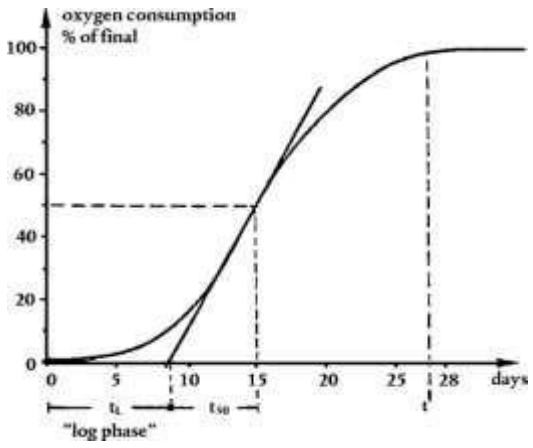
Rezultati dobijeni na osnovu referentnih supstanci, odnosno natrijum benzoata i anilina trebalo bi da budu uporedivi s rezultatima dobijenim prstenastim ispitivanjem (3) (stav 9).

Ako su rezultati dobijeni na osnovu referentnih supstanci atipični, ispitivanje je potrebno ponoviti uz upotrebu drugog uzorka morske vode.

Može se smatrati da ispitivana supstanca ima inhibitorni efekat na bakterije (pri upotrijebljenoj koncentraciji) ako je BPK smješe referentne i ispitivane supstance manji od zbira BPK zasebnih rastvora dvije supstance.

Zbog relativno visokih upotrijebljenih ispitnih koncentracija u odnosu na većinu prirodnih sistema i stoga nepovoljan odnos koncentracija ispitivane supstance i drugih izvora ugljenika metoda se smatra preliminarnim ispitivanjem koje se može primijeniti kako bi se pokazalo da li je supstanca lako biorazgradiva ili nije. U skladu s time, nizak rezultat ne znači nužno da ispitivana supstanca nije biorazgradiva u morskim sredinama, već ukazuje na to da će za utvrĐivanje navedenog biti potrebno ssprovesti dodatne radnje.

Primjer eksperimenta teoretske razgradnje kojim se prikazuje izvodiv način procjene vrijednosti tL (dužine „eksponencijalne faze razvoja—) i t50, odnosno vremenskog intervala (počevši od tL) potrebnog za postizanje 50 %-tne konačne potrošnje kiseonika prouzrokovane oksidacijom ispitivane supstance nalazi se u nastavku.



Dodatak 1

Određivanje organskog ugljenika u morskoj vodi

1. METODA MUĆKANJA U STAKLENOM BALONU

Za određivanje organskog ugljenika uzorka vode organska jedinjenja u uzorku oksidiraju u ugljen dioksid primjenom jedne od tri sljedeće tehnike:

- mokre oksidacije persulfatom / UV zračenjem, mokre oksidacije persulfatom /
- povišenom temperaturom (116 – 130 °C), sagorijevanja.
- Nastali CO_2 kvantitativno se određuje infracrvenom spektrometrijom ili titrimetrijom.

Druga mogućnost je redukovanje CO_2 u metan, koji se kvantitativno određuje plamenojonizacionim detektorom (FID).

Metoda oksidacije persulfatom / UV zračenjem uobičajeno se primjenjuje za analizu „čiste— vode s niskim sadržajem čestica. Druge dvije metode mogu se primjenjivati na većinu vrsta uzoraka vode, pri čemu je oksidacija persulfatom / povišenom temperaturom najprikladnija za uzorke niskog nivoa, dok se tehnika sagorijevanja primjenjuje za uzorke čiji je sadržaj neisparljivog organskog ugljenika (NVOC) veći od 1 mg C/l.

1.1. Interferencije

Sve tri metode zavise od eliminacije ili kompenzacije neorganskog ugljenika (IC) prisutnog u uzorku. Uklanjanje CO_2 iz acidifikovanog uzorka najčešće je primijenjena metoda za eliminaciju IC, iako ono dovodi do gubitka isparljivih organskih jedinjenja (1). Potpuna eliminacija ili kompenzacija IC moraju se obezbijediti za svaku matricu uzorka, a pored NVOC mora se odrediti i isparljivi organski ugljenik (VOC), zavisno od vrste uzorka.

Visoke koncentracije hlorida dovode do smanjenja efikasnosti oksidacije u slučaju primjene metode oksidacije persulfatom / UV zračenjem (2). Međutiim, ta interferencija može se ukloniti primjenom oksidacionog reagensa modifikovanog dodavanjem živinog (II) nitrata. Preporučuje se upotreba maksimalne prihvatljive zapremine uzorka za ocjenjivanje svih vrsta uzoraka koji sadrže hlorid. Visoke koncentracije soli u analiziranom uzorku u metodi sagorijevanja mogu dovesti do prekrivanja katalizatora solima i prekodnosne korozije cijevi za sagorijevanje. Potrebno je preduzeti mjere opreza u skladu s priručnikom proizvoĐača.

Jako zamućeni uzorci kao i uzorci koji sadrže čestice možda neće potpuno oksidirati u slučaju primjene metode oksidacije persulfatom / UV zračenjem.

1.2. Primjer prikladne metode

Neisparljivi organski ugljenik određuje se oksidacijom persulfatom / UV zračenjem i naknadnim kvantitativnim određivanjem nastalog CO_2 nedisperzivnom infracrvenom spektrometrijom.

Oksidacioni reagens modifikuje se u skladu s predlozima navedenim pod (2) kako je opisano u priručniku proizvoĐača:

(a) 8,2 g HgCl2 i 9,6 g Hg(NO3)2 · H2O rastvaraju se u nekoliko stotina mililitara vode s niskom koncentracijom ugljenika kao reagensa;

(b) 20 g $K_2S_2O_8$ rastvara se u rastvoru živine soli; (c) smješi se dodaje 5 ml HNO_3 (konc.);

(d) reagens se razblažuje do 1 000 ml.

Interferencija hlorida uklanja se upotrebom 40 µl zapremine uzorka za deset procenata hlorida i 200 µl zapremine uzorka za 1,9 % hlorida. Uzorci s visokim koncentracijama hlorida i/ili velike zapremine uzoraka mogu se analizirati u skladu s navedenom metodom pod uslovom da se spriječi stvaranje hlorida u oksidacionoj posudi. Nakon toga, po potrebi se može odrediti isparljivi organski ugljenik za predmetnu vrstu uzorka.

Dodatak 2

Biorazgradnja u morskoj vodi

METODA MUĆKANJA U STAKLENOM BALONU

OBRAZAC ZA DOSTAVLJANJE PODATAKA

1. LABORATORIJAA:

2. DATUM POČETKA ISPITIVANJA:

3. ISPITIVANA SUPSTANCA:

Naziv:

Koncentracija osnovnog rastvora: mg/l kao supstanca

Početna koncentracija u medijumumu, t_o: mg/l kao supstanca

: mg DOC/l

4. MORSKA VODA:

Izvor:

Datum skupljanja:

Dubina skupljanja:

Izgled u trenutku skupljanja (npr. zamućenost itd.):

Salinitet u trenutku skupljanja: ‰

Temperatura u trenutku skupljanja: °C

DOC „x— sati nakon skupljanja: mg/l

Prethodna obrada prije ispitivanja (npr. filtracija, taloženje, starenje itd.):

Broj kolonija mikroba - izvorni uzorak: kolonije/ml

- na početku ispitivanja: kolonije/ml

Druga svojstva:

5. ODREĐIVANJA UGLJENIKA:

Analizator ugljenika:

	Balon br.		DOC nakon n dana (mg/l)

Ispitivanje: morska voda ojačana nutrijentima s ispitivanom supstancom	1	a_1	0	n_1	n_2	n_3	n_x
		a_2					
		srednja vrijednost, $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		srednja vrijednost, $C_{b(t)}$					
Slijepa proba: morska voda ojačana nutrijentima bez ispitivane supstance	1	c_1					
		c_2					
		srednja vrijednost, $C_{c(t)}$					
	2	d_1					
		d_2					
		srednja vrijednost, $C_{d(t)}$					
	srednja vrijednost, $C_{bl(t)} = \frac{Cc\ t\ + Cd(t)}{2}$						

6. EVALUACIJA SIROVIH PODATAKA:

Balon br.	Izračunavanje rezultata	% razgradnje nakon n dana				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D1 = 1 - \frac{Ca\ t\ - Cbl(t)}{C_0 - C_{bl(0)})}$	0				
2	$D2 = 1 - \frac{Cb\ t\ - Cbl(t)}{C_0 - C_{bl(0)})}$	0				
Srednja vrijednost (*)	$Dt = \frac{D1 + D2}{2}$	0				
(*) Za D1 i D2 nije potrebno izračunati prosječnu vrijednost ako postoji značajna razlika.						

Napomena: Slični obrasci mogu se upotrijebiti kada nakon razgradnje slijedi specifična analiza i za referentnu supstancu i kontrole toksičnosti.

7. ABIOTIČKA RAZGRADNJA (po izboru)

	Vrijeme (dani)	
	0	t
DOC (mg/l) u sterilnoj kontroli	$C_{s(o)}$	Cs(t)

$$\% \, abiotička \, razgradnja = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \, x \, 100$$

Dodatak 3

Iizračunavanje teoretske biohemijske potrošnje kiseonika

1. METODA ZATVORENIH BOCA

TPK supstance $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ molekularne mase MW iizračunava se u skladu s:

$$TPK_{NH3} = \frac{16[2c + \frac{1}{2} \; h - cl - 3n \; + 3s + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o]}{MW}$$

Tim iizračunavanjem pokazuje se da se C mineralizuje u CO_2, H u H_2O, P u P_2O_5 i Na u Na_2O. Halogen se eliminiše kao vodonik halid, a azot kao amonijak.

Primjer: glukoza $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$TPK = \frac{16(2 \; x \; 6 + \frac{1}{2} x \; 12 - 6)}{180} = 1{,}07 \; mgO_2/mg \; glukoze$$

Molekularne mase soli koje nijesu soli alkalnih metala iizračunavaju se pod pretpostavkom da su soli hidrolizovane.

Za sumpor se pretpostavlja da oksidira u stanje + 6.

Primjer: natrijum n-dodecilbenzensulfonat $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$TPK = \frac{16(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3)}{348} = 2{,}34 \; mgO_2/mg \; supstance$$

U slučaju supstanci koje sadrže azot, azot se može eliminisati kao amonijak, nitrit ili nitrat u skladu s različitim teoretskim biohemijskim potrošnjama kiseonika.

$$TPK_{NO2} = \frac{16[2c + \frac{1}{2} \; h - cl \; + 3s + \frac{3}{2n} + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o]}{MW}$$

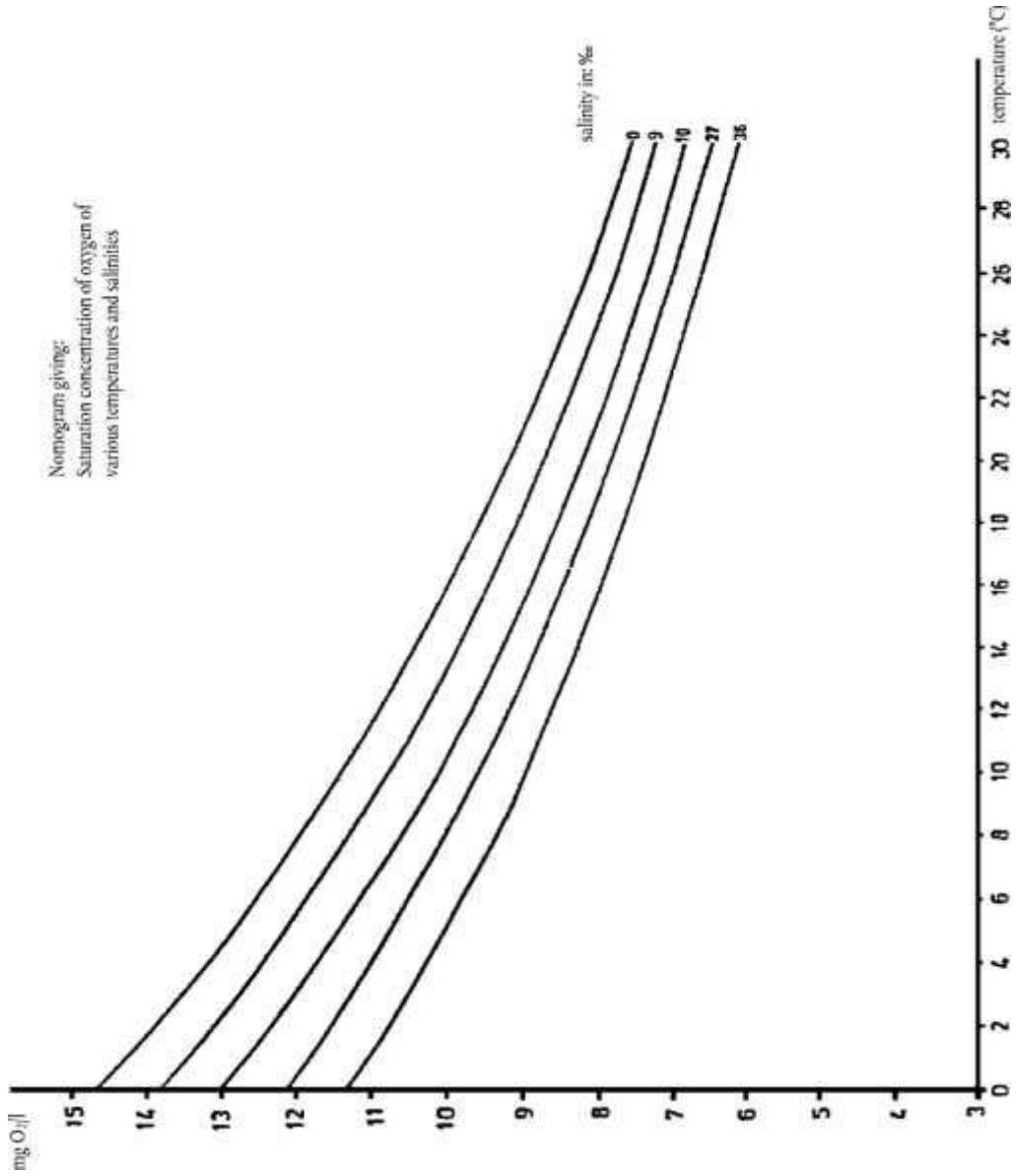
$$TPK_{NO3} = \frac{16[2c + \frac{1}{2} \; h - cl \; + 3s + \frac{5}{2n} + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o]}{MW}$$

Pod pretpostavkom da je analizom opaženo potpuno formiranje nitrata u slučaju sekundarnog amina:

$(C_{12}H_{25})_2$ NH, MW = 353

$$TPK_{NO3} = \frac{16(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2})}{353} = 3{,}44\ mgO_2/mg\ supstance$$

Dodatak 4



Dodatak 5

Biorazgradnja u morskoj vodi

METODA ZATVORENIH BOCA OBRAZAC ZA DOSTAVLJANJE PODATAKA

1. **LABORATORIJAA:**
2. **DATUM POČETKA ISPITIVANJA:**

3. ISPITIVANA SUPSTANCA:

Naziv:

Koncentracija osnovnog rastvora: mg/l

Početna koncentracija u morskoj vodi: mg/l

TPK ili HPK: mg O2/mg ispitivane supstance

4. MORSKA VODA:

Izvor:

Datum skupljanja:

Dubina skupljanja:

Izgled u trenutku skupljanja (npr. zamućenost itd.):

Salinitet u trenutku skupljanja: ‰

Temperatura u trenutku skupljanja: °C

DOC „x— sati nakon skupljanja: mg/l

Prethodna obrada prije ispitivanja (npr. filtracija, taloženje, starenje itd.):

Broj kolonija mikroba - izvorni uzorak: kolonije/ml

- na početku ispitivanja: kolonije/ml

Druga svojstva:

5. ISPITNI MEDIJUMUM:

Temperatura nakon aeracije: °C

Koncentracija O_2 nakon aeracije i stanje prije početka ispitivanja: mg O2/l

6. ODREĐIVANJE DO:

Metoda: Vinkler/elektroda

	Boca br.		mg O_2/l nakon n dana			
			0	5	15	28
Ispitivanje: morska voda ojačana nutrijentima s ispitivanom supstancom	1	a1				
	2	a2				
	Srednja vrijednost u ispitivanju	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				
Slijepa proba:	1	c1				
	2	c2				

morska voda ojačana nutrijentima, ali bez ispitivane supstance	Srednja vrijednost u slijepoj probi	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Napomena: Sličan obrazac može se upotrijebiti za referentnu supstancu i kontrolu toksičnosti.

7. POTROŠNJA DO: % RAZGRADNJE (% D):

	Potrošnja DO nakon n dana		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ (*)			
$\%D = \frac{(m_b - m_t)}{\text{ispitivana supstanca mg/l x TPK}} \times 100$			

(*) Pretpostavlja se da je mb(o) = mt(o), pri čemu je:
mb(o) = vrijednost u slijepoj probi 0. dana, mt(o) = vrijednost ispitivane supstance 0. dana.
Ako mb(o) nije jednak mt(o), primjenjuje se (mt(o) – mt(x)) – (mb(o) – mb(x)), pri čemu je:
mb(x) = vrijednost u slijepoj probi x. dana, mt(x) = vrijednost ispitivane supstance x. dana.

C.43. ANAEROBNA BIORAZGRADIVOST ORGANSKIH SUPSTANCI U RAZGRAĐENOM MULJU: MJERENJEM PROIZVODNJE GASA

1. UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD (TG) 311 (2006). Postoje brojni skrining testovi za procjenu aerobne biorazgradivosti organskih supstanci (ispitne metode C.4, C.9, C.10 i C.11 (1) i Smjernica za ispitivanje OECD 302C (2)) i rezultati njihove primjene uspješno su upotrijebljeni za predviđanje sudbine supstanci u aerobnoj sredini, naročito u aerobnim fazama pročišćavanja otpadnih voda. Različiti udjeli supstanci rastvorljivih u vodi, kao i onih koje adsorbuju otpadne čvrste materije, obrađuju se aerobno s obzirom na to da su one prisutne u nataloženim otpadnim vodama. Međutiim, veće frakcije tih supstanci povezane su s prvim nataloženim muljem, koji se odvaja od otpadne vode u primarnim taložnicima prije nego što se otpadne vode ili supernatant pročišćava aerobno. Mulj, koji sadrži neke rastvorljive supstance u međuprostornoj tečnosti, zatim se prenosi u grijane digestore za anaerobno pročišćavanje. Budući da još ne postoje ispitivanja iz ove serije kojima se procjenjuje anaerobna biorazgradivost u anaerobnim digestorima i da je svrha ovog ispitivanja popunjavanje te praznine, ono nije nužno primjenjivo na ostale anoksične djelove sredine.

Respirometrijske metode kojima se mjere količine proizvedenog gasa, uglavnom metana (CH_4) i ugljen dioksida (CO_2), u anaerobnim uslovima uspješno su primijenjene za procjenu anaerobne biorazgradivosti. Birč i drugi (*Birch et al.)* (3) revidirali su te postupke i zaključili da je rad autora Šeltona (*Shelton*) i Tidjea (*Tiedje*) (4), koji se zasniva na ranijim ispitivanjima (5)(6)(7), bio najopsežniji. Metodom (4), koju su ostali autori dodatno razvili (8) i koja je postala američki standard (9), (19), nijesu riješene poteškoće vezane za različite rastvorljivosti jedinjenja CO_2 i CH_4 u ispitnom medijumumu i iizračunavanje teoretske

proizvodnje gasa ispitivane supstance. U izvještaju Evropskog centra za ekotoksikologiju i toksikologiju hemikalija (ECETOC) (3) preporučuju se dodatna mjerenja sadržaja rastvorenog neorganskog ugljenika (DIC) tečnog supernatanta, što je ovu metodu učinilo široko primjenjivom. Metoda ECETOC bila je podvrgnuta međunarodnom kalibracionom testiranju (ili prstenastom ispitivanju) i postala je standard ISO 11734 (11).

U ovoj ispitnoj metodi, koja se zasniva na standardu ISO 11734 (11), opisuje se skrining metoda za ocjenjivanje potencijalne anaerobne biorazgradivosti organskih supstanci u određenim uslovima (tj. u anaerobnom digestoru u određenom trenutku i rasponu koncentracije mikroorganizama). Budući da se razrijeđeni mulj upotrebljava s relativno visokom koncentracijom ispitivane supstance i da je trajanje testa uobičajeno duže od vremena zadržavanja u anaerobnim digestorima, uslovi ispitivanja ne odgovaraju nužno uslovima u anaerobnim digestorima i ono nije primjenjivo na procjenu anaerobne biorazgradivosti organskih supstanci u različitim uslovima životne sredine. Mulj se izlaže ispitivanoj supstanci u trajanju do 60 dana, što je duže od uobičajenog vremena zadržavanja mulja (od 25 do 30 dana) u anaerobnim digestorima, iako vrijeme zadržavanja na industrijskim lokacijama može biti mnogo duže. Procjene dobijene iz rezultata ovog ispitivanja ne mogu se ssprovesti jednako uvjerljivo kao u slučaju aerobne biorazgradivosti jer dokazi o ponašanju ispitivanih supstanci u „spremnim— aerobnim ispitivanjima i simulacionim ispitivanjima i aerobnoj sredini dovoljni su da dokažu da postoji povezanost; za anaerobnu sredinu postoji malo sličnih dokaza. Pretpostavlja se da do potpune anaerobne biorazgradivosti može doći u slučaju 75 – 80 % teoretske proizvodnje gasa. Visoki odnosi supstance u biomasi upotrijebljenoj u ovim ispitivanjima znače da supstanca koja prođe ima veće šanse za razgradnju u anaerobnom digestoru. Osim toga, supstance koje se ne pretvore u gas tokom ispitivanja možda se neće održati u realističnijim odnosima supstanca : biomasa kada je u pitanju životna sredina. Pored toga, događaju se ostale anaerobne reakcije u kojima se supstance mogu makar djelimično razgraditi, npr. uklanjanje hlora, ali ovim ispitivanjem ne otkrivaju se takve reakcije. Međutiim, primjenom specifičnih analitičkih metoda za određivanje ispitivane supstance može se pratiti njeno nestajanje (v. odsjeke 6, 30, 44 i 53).

2. NAČELO ISPITIVANJA

Isprani razgrađeni mulj[69], koji sadrži niske (< 10 mg/l) koncentracije neorganskog ugljenika (engl. inorganic carbon, IC), razređuje se deseterostruko do ukupne koncentracije čvrste materije od 1 g/l do 3 g/l i inkubira na 35 °C ± 2 °C u zapečaćenim posudama s ispitivanom supstancom na od 20 do 100 mg C/l na period do 60 dana. Dozvoljava se mjerenje aktivnosti mulja izvođenjem paralelnih slijepih proba s inokulumom mulja u medijumumu, ali bez ispitivane supstance.

Mjeri se povećani pritisak parnog prostora u posudama koji je rezultat proizvodnje ugljen dioksida i metana. Velika količina proizvedenog CO_2 rastvoriće se u tečnoj fazi ili će se pretvoriti u karbonat ili hidrogenkarbonat u ispitnim uslovima. Taj neorganski ugljenik mjeri se na kraju ispitivanja.

Količina ugljenika (neorganski plus metan) koji nastaje biorazgradnjom ispitivane supstance iizračunava se iz neto proizvodnje gasa i neto stvaranja neorganskog ugljenika u tečnom stanju u višku slijepih kontrolnih vrijednosti. Domet biorazgradnje mjeri se na osnovu ukupnog proizvedenog neorganskog ugljenika i metana-C kao procenat izmjerene ili

[69] Razgrađeni mulj je mješavina stanja nataloţenosti otpadnih voda i aktivnog mulja, koji su bili inkubirani u anaerobnom digestoru na oko 35 °C, u svrhu smanjenja teškoća povezanih s biomasom i mirisima i unapređenja sposobnosti isušivanja iz mulja. Sastoji se od zajednice anaerobnih fermentativnih i metanogenih bakterija koje proizvode ugljen dioksid i metan (11):

izračunate količine ugljenika dodatog ispitivanoj supstanci. Tok biorazgradnje može se pratiti samo srednjim mjerenjima proizvodnje gasa. Osim toga, primarna biorazgradnja može se odrediti specifičnim analizama na početku i na kraju ispitivanja.

3. INFORMACIJE O ISPITIVANOJ SUPSTANCI

Trebalo bi da budu poznati čistoća, rastvorljivost u vodi, isparljivost i adsorpciona svojstva ispitivane supstance kako bi se omogućilo ispravno tumačenje rezultata. Sadržaj organskog ugljenika (% w/w) ispitivane supstance mora biti poznat iz njene hemijske strukture ili mjerenja. Za isparljive ispitivane supstance izmjerena ili izračunata Henrijeva konstanta pomaže prilikom odlučivanja da li je ispitivanje primjenjivo. Informacije o toksičnosti ispitivane supstance za anaerobne bakterije korisne su pri izboru odgovarajuće ispitne koncentracije i za tumačenje rezultata koji pokazuju slabu biorazgradivost. Preporučuje se uključivanje kontrole inhibicije, osim ukoliko nije poznato da ispitivana supstanca ima inhibitorni efekat na anaerobne mikrobne aktivnosti (v. stav 21 i standard ISO 13641-1 (12)).

4. PRIMJENJIVOST ISPITNE METODE

Ispitnu metodu moguće je primijeniti na supstance rastvorljive u vodi; isto tako, moguće je primijeniti na slabo rastvorljive i nerastvorljive supstance pod uslovom da se upotrebljava metoda preciznog doziranja, npr. v. standard ISO 10634 (13). Generalno, za isparljive supstance potrebno je donijeti odluku za svaki slučaj posebno. Možda je potrebno preduzeti posebne korake, na primjer ne ispuštati gas tokom ispitivanja.

5. REFERENTNE SUPSTANCE

Za provjeru postupka referentna supstanca se ispituje paralelnim postavljanjem odgovarajućih posuda kao dijelom uobičajenih ispitnih nizova. Primjeri su fenol, natrijum benzonat i polietilen glikol 400 i očekuje se da bi se mogli razgraditi proizvodnjom gasa većom od 60 % (tj. metan i neorganski ugljenik) u roku od 60 dana.

6. MJERNA REPRODUKTIVNOST REZULTATA ISPITIVANJA

U međunarodnom prstenastom ispitivanju postojalo je dobro ponovno ossupstancivanje u mjerenjima pritiska gasa između tri posude. Relativna standardna devijacija (koeficijent varijacije, KV) uglavnom je bila ispod 20 %, iako se ova vrijednost često povećavala na > 20 % u prisutnosti toksičnih supstanci ili ka kraju 60-dnevnog perioda inkubacije. Veće devijacije pronađene su i u posudama zapremnine < 150 ml. Konačne pH-vrijednosti ispitnog medijumuma bile su u rasponu 6,5 – 7,0.

Sljedeći rezultati dobijeni su prstenastim ispitivanjem.

Ispitivana supstanca	Ukupni podaci n_1	Srednja razgradnja (ukupnih podataka) (%)	Relativno standardno odstepene (ukupnih podataka) (%)	Važeći podaci n_2	Srednja razgradnja (važećih podataka) (%)	Relativno standardno odstepene (važećih podataka) (%)	Podaci > 60 % Razgradnje u važećim ispitivanjima n_3
Palmitinska kisjelina	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19=70% (*)

Polietilen glikol 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24=83% (*)

(*) Udio n2

Koeficijenti varijacije sredine svih vrijednosti dobijenih s palmitinskom kisjelinom i polietilen glikolom 400 iznosili su 45 % (n = 36), odnosno 35 % (n = 38). Kada su izostavljene vrijednosti < 40 % i > 100 % (za prvo se pretpostavlja da je zbog niže od optimalnih uslova, a za posljednje zbog nepoznatih razloga), KV su smanjeni na 26 %, odnosno na 23 %. Udjeli „važećih— vrijednosti koje su ossupstancile najmanje 60 % razgradnje iznosile su 70 % za palmitinsku kisjelinu i 83 % za polietilen glikol 400. Udjeli procenta biorazgradnje dobijene iz mjerenja rastvorenog neorganskog ugljenika bili su relativno niski, ali varijabilni. Za palmitinsku kisjelinu raspon je bio 0 – 35 %, srednji 12 % s KV 92 % i za polietilen glikol 400 0 – 40 %, srednji 24 %, s KV od 54 %.

7. OPIS ISPITNE METODE

7.1. Aparatura

Potrebna je uobičajena laboratorijaska oprema i sljedeće:

(a) inkubator – otporan na iskre i kontrolisan na 35 °C ± 2 °C;

(b) staklene posude otporne na pritisak odgovarajuće nominalne veličine[70], od kojih je svaka opremljena gasno nepropusnim septumom koji može podnijeti pritisak od oko 2 bara. Zapremnina parnog prostora trebalo bi da iznosi oko 10 do 30 % ukupne zapremnine. Ako se biogas redovno otpušta, prikladno je oko 10 % parnog prostora, ali ako se gas otpušta samo na kraju, prikladno je 30 %. Prilikom otpuštanja pritiska i pri svakom mjerenju uzorkovanja preporučuju se staklene serum boce, nominalne vrijednosti 125 ml, ukupne zapremnine oko 160 ml, zapečaćene serum septumima[71] i uvijenim aluminijskim prstenovima;

(c) uređaj za mjerenje pritiska[37] prilagoĐen da omogući mjerenja i izduvavanje proizvedenog gasa, na primjer ručni precizni mjerač pritiska jedinjenjeen na odgovarajući špric s iglom; trostruki gasno nepropusni ventil olakšava otpuštanje viška pritiska (Dodatak 1). Internu zapreminu cijevi za mjerenje pritiska i ventila potrebno je održavati što nižom kako bi greške nastale zanemarivanjem zapremine opreme bile neznatne;

Napomena – Očitavanja pritiska upotrebljavaju se direktno za iizračunavanje količine proizvedenog ugljenika u parnom prostoru (st. 42 do 44). Druga mogućnost je da se očitavanja pritiska pretvore u zapremine (na 35 °C, atmosferski pritisak) proizvedenog gasa pomoću grafikona konverzije. Ovaj grafikon sačinjen je od podataka dobijenih injektiranjem poznatih zapremina azotnog gasa u niz ispitnih posuda (npr. serum boce) na temperaturi od

[70] Preporučena je veliĉina od 0,1 litra do jednog litra.

[71] Preporučuje se upotreba gasno nepropusnih silikonskih septuma. Pored toga, preporučuje se ispitivanje gasno nepropusnosti čepova, naročito septuma od butilne gume, jer nekoliko septuma koji se mogu nabaviti na trţištu nije dovoljno gasno nepropusno kada je u pitanju metan, a neki septumi nijesu više nepropusni kada se probuše iglom u uslovima ispitivanja. 37 UreĈaj je potrebno upotrebljavati i redovno kalibrisati u skladu s uputstvima proizvoĈaĉa. Ako se upotrebljava mjeraĉ pritiska propisanog kvaliteta, npr. zaplombiran ĉeliĉnom membranom, nije potrebna kalibracija u laboratoriji. Preciznost kalibracije moţe se provjeriti u laboratoriji mjerenjem u jednoj taĉki na 1 × 105 Pa mjeraĉem pritiska s mehaniĉkim pokazivaĉem. Kada je ova taĉka precizno izmjerena, i linearnost ostaje nepromijenjena. Ako se upotrebljavaju drugi mjerni ureĈaji (bez sertifikovane kalibracije koju je obavio proizvoĈaĉ), preporučuje se kalibracija cjelokupnog raspona u redovnim intervalima.

35 ° +/– 2 °C i bilježenjem rezultata stabilizovanih očitavanja pritiska (v. Dodatak 2). Izračunavanje je prikazano u Napomeni u stavu 44.

Upozorenje – Pazite da se ne povrijedite iglom tokom upotrebe mikrošprica.

(d) analizator ugljenika, pogodan za direktno određivanje neorganskog ugljenika u rasponu od 1 mg/l do 200 mg/l;
(e) špricevi velike preciznosti za uzorke gasa i tečnosti;
(f) magnetske mješalice i uređaji za praćenje (opciono);
(g) komora za rukovanje s rukavicama (preporučuje se).

7.2. Reagensi

Tokom cijelog ispitivanja upotrebljavajte reagense analitičke čistoće.

7.3. Voda

Destilovana ili dejonizovana voda (deoksigenisana propuštanjem azotnog gasa koji sadrži manje od 5 µl/l kiseonika) koja sadrži manje od 2 mg/l rastvorenog organskog ugljenika (DOC).

7.4. Ispitni medijumum

Pripremite medijumum za razblaživanje tako da sadrži sljedeće sastojke u navedenim količinama;

Anhidrovan kalijum dihidrogen fosfat (KH2PO4)	0,27 g
Dinatrijum monohidrogen ortofosfat dodekahidrat ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$))	1,12 g
Amonijum hlorid (NH_4Cl)	0,53 g
Kalcijum hlorid dihidrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,075g
Magnezijum hlorid heksahidrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,10 g
GvožĐe (II) hlorid tetrahidrat ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,02 g
Resazurin (indikator kiseonika)	0,001g
Natrijum sulfid nonahidrat ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	0,10 g
Osnovni rastvor elemenata u tragovima (opciono, stav 18)	10 ml
Dodati deoksigenisanu vodu (stav 15)	jednom litru

Napomena: Svježe isporučen natrijum sulfid trebalo bi da bude upotrijebljen ili ispran i osušen prije upotrebe kako bi se postigao redukcioni kapacitet. Ispitivanje se može ssprovesti bez upotrebe komore za rukovanje s rukavicama (v. stav 26). U tom slučaju konačna koncentracija natrijum sulfida u medijumumu trebalo bi da se poveća do 0,20 g $Na_2S \cdot 9H_2O$ po litru. Natrijum sulfid moguće je dodati i iz odgovarajućeg anaerobnog osnovnog rastvora kroz septum zatvorenih ispitnih posuda jer će se tim postupkom smanjiti rizik od oksidacije.

Natrijum sulfid moguće je zamijeniti titanijum (III) citratom, koji se dodaje kroz septum zatvorenih ispitnih posuda u konačnoj koncentraciji od 0,8 do 1,0 mmol/l. Titanijum (III) citrat je visoko efikasno redukciono sredstvo niske toksičnosti, koje se priprema na sljedeći način: Ratvorite 2,94 g trinatrijum citrat dihidrata u 50 ml deoksigenisane vode (kako biste dobili rastvor od 200 mmol/l) i dodajte 5 ml 15 % (w/v) rastvora titanijum (III) hlorida. Neutralizujte do pH-vrijednosti 7 ± 0,2 s mineralnom alkalijom i stavite u odgovarajuću posudu pod tok azota. Koncentracija titanijum (III) citrata u ovom osnovnom rastvoru iznosi 164 mmol/l.

Pomiješajte sastojke ispitnog medijumuma, osim redukcionog sredstva (natrijum sulfid titanijum citrat) i propuštajte rastvor s azotnim gasom na otprilike 20 minuta neposredno prije upotrebe kako biste uklonili kiseonik. Zatim dodajte odgovarajuću zapreminu svježe pripremljenog rastvora redukcionog sredstva (pripremljenog u deoksigenisanoj vodi) neposredno prije upotrebe medijumuma. Prema potrebi prilagodite pH-vrijednost medijumuma s razblaženom mineralnom kisjelinom ili alkalijom na 7 ± 0,2.

7.5. Osnovni rastvor elemenata u tragovima (opciono)

Preporučuje se da ispitni medijumum sadrži sljedeće elemente u tragovima radi unapreĐenja postupaka anaerobne razgradnje, naročito ako se upotrebljavaju niske koncentracije (npr. 1 g/l) inokuluma.

Mangan hlorid tetrahidrat ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50 mg
Borna kisjelina (H_3BO_3)	5 mg
Cink hlorid ($ZnCl_2$)	5 mg
Bakar (II) hlorid ($CuCl_2$)	3 mg
Dinatrijum molibdat dihidrat ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	1 mg
Kobalt hlorid tetrahidrat ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	100 mg
Nikl hlorid heksahidrat ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	10 mg
Dinatrijum selenit (Na_2SeO_3)	5 mg
Dodati deoksigenisanu vodu (stav 15)	jednom litru

7.6. Ispitivana supstanca

Dodajte ispitivanu supstancu kao osnovni rastvor, suspenziju, emulziju ili direktno kao čvrstu ili tečnu materiju, ili absorbovanu na filter od staklenih vlakana za dobijanje koncentracije ne veće od 100 ml/l organskog ugljenika. Ako se upotrebljavaju osnovni rastvori, pripremite odgovarajući osnovni rastvor s vodom (stav 15) (prethodno deoksigenisanom propuštanjem s azotnim gasom) čija je snaga tolika da dodata zapremina bude manja od 5 % ukupne zapremine reakcione smješe. Prema potrebi prilagodite pH-vrijednost osnovnog rastvora na 7 ± 0,2. Za ispitivane supstance koje nijesu dovoljno rastvorljive u vodi konsultujte standard ISO 10634 (13). Ako se upotrebljava rastvarač, pripremite dodatnu kontrolu tako da rastvarač dodate samo inokulisanom medijumumu. Potrebno je izbjegavati organske rastvarače za koje se zna da inhibiraju proizvodnju metana, poput hloroforma i ugljenik tetrahlorida.

Upozorenje – Oprezno rukujte toksičnim ispitivanim supstancama i supstancama s nepoznatim svojstvima.

7.7. Referentne supstance

Referentne supstance kao što su natrijum benzonat, fenol i polietilen glikol 400 uspješno su upotrijebljeni za provjeru postupka jer su biorazgraĐeni za više od 60 % u roku od 60 dana. Pripremite osnovni rastvor (u deoksigenisanoj vodi) odabrane referentne supstance na isti način kao što ste pripremili ispitivanu supstancu i prema potrebi prilagodite na pH-vrijednost 7 ± 0,2.

7.8. Kontrola inhibicije (uslovna)

Za dobijanje informacija o toksičnosti ispitivane supstance za anaerobne mikroorganizme u svrhu postizanja najprikladnije ispitne koncentracije, dodajte ispitivanu supstancu i

referentnu supstancu posudi s ispitnim medijumumom (v. stav 16), odnosno svaku u istoj koncentraciji kako je dodato (v. st. 19 i 20 i v. standard ISO 13641-1 (12)).

7.9. RazgraĐeni mulj

Prikupite razgraĐeni mulj iz digestora na postrojenju za prečišćavanje otpadnih voda na kojem se pretežno prečišćava komunalni otpad. Mulj je potrebno potpuno opisati i izvijestiti o osnovnim informacijama (v. stav 15). Ako se namjerava upotrijebiti prilagoĐeni inokulum, može se razmotriti upotreba razgraĐenog mulja iz postrojenja za prečišćavanje industrijskih otpadnih voda. Za prikupljanje razgraĐenog mulja upotrijebite boce širokoga grla izraĐene od polietilena visoke gustine ili sličnog materijala koji se može proširiti. Dodajte mulj do oko 1 cm vrha boca i čvrsto zapečatite, po mogućnosti sigurnosnim ventilom. Nakon prevoza u laboratorijau, prikupljeni mulj moguće je upotrebljavati direktno ili ga staviti u laboratorijaski digestor. Otpustite višak biogasa oprezno otvarajući boce s muljem. Druga mogućnost je da se anaerobni mulj uzgojen u laboratorijai može upotrebljavati kao izvor inokuluma, ali spektar njegovih aktivnosti mogao bi biti oslabljen.

Upozorenje – RazgraĐeni mulj proizvodi zapaljive gasove koji predstavljaju rizik od požara i eksplozije: sadrži i potencijalno patogene organizme, stoga preduzmite odgovarajuće mjere opreza pri rukovanju muljem. Zbog sigurnosnih razloga tokom prikupljanja mulja ne upotrebljavajte staklene posude.

Kako bi se smanjila proizvodnja pozadinskog gasa i kako bi se smanjio uticaj slijepih proba, može se razmotriti mogućnost prethodne razgradnje mulja. Ako je potrebno napraviti prethodnu razgradnju, potrebno je omogućiti da se mulj razgradi bez dodavanja bilo kakvih nutrijenata ili supstrata na 35 °C ± 2 °C na period do sedam dana. Dokazano je da se prethodnom razgradnjom u trajanju od otprilike pet dana uobičajeno dobija optimalno smanjenje proizvodnje gasa u slijepoj probi bez neprihvatljivih povećanja perioda prilagoĐavanja ili inkubacije tokom ispitne faze ili gubitka aktivnosti prema malom broju ispitivanih supstanci.

Za slabo razgradive ispitivane supstance ili za one supstance za koje se očekuje da će biti slabo razgradive, razmotrite prethodno izlaganje mulja ispitivanoj supstanci kako biste dobili bolje prilagoĐen inokulum. U tom slučaju dodajte ispitivanu supstancu u koncentraciji organskog ugljenika od 5 ml/l do 20 mg/l razgraĐenom mulju i inkubiranom u periodu do dvije sedmice. Pažljivo isperite prethodno izloženi mulj prije upotrebe i u izvještaju o ispitivanju naznačite uslove prethodnog izlaganja.

7.10. Inokulum

25. Isperite mulj neposredno prije upotrebe kako biste smanjili koncentraciju neorganskog ugljenika na ispod 10 mg/l u završnoj ispitnoj suspenziji. Centrifugirajte mulj u zapečaćenim cijevima (npr. 3 000 g tokom 5 min) i ispustite supernatant. Suspendujte dobijeni talog u deoksigenisanom medijumumu, ponovo centrifugirajte suspenziju i ispustite tečni supernatant.

Ako se neorganski ugljenik nije uspješno spustio, postupak ispiranja mulja moguće je ponoviti najviše dva puta. Čini se da to ne utiče štetno na mikroorganizme. Na kraju, suspendujte talog u potrebnoj količini ispitnog medijumuma i odredite ukupnu koncentraciju čvrstih materija [npr. ISO 11923 (15)]. Konačna ukupna koncentracija čvrstih materija u posudama trebalo bi da bude u rasponu od 1 g/l do 3 g/l (ili oko 10 % toga u nerazrijeđenom razgraĐenom mulju). Preduzmite sve prethodno navedene radnje tako da mulj bude u najmanjem kontaktu s kiseonikom (npr. upotrijebite azotnu atmosferu).

8. POSTUPAK ISPITIVANJA

Sprovedite sljedeće početne postupke koristeći se tehnikama kojima će kontakt između razgrađenog mulja i kiseonika ostati što je niže moguće, na primjer, možda će biti potrebno raditi u komori za rukovanje s rukavicama u atmosferi azota i/ili pročistiti boce azotom (4).

8.1. Priprema ispitnih i kontrolnih analiza

Pripremite najmanje tri ispitne posude (v. stav 13.b) za ispitivanu supstancu, slijepe probe, referentnu supstancu, kontrole inhibicijom (uslovno) i posude za kontrolu pritiska (opcioni postupak) (v. stav 7 i st. 19 do 21). Mogu biti pripremljene i dodatne posude za procjenu primarne biorazgradnje pomoću specifičnih analiza ispitivane supstance. Isti skup slijepih proba može se upotrebljavati za nekoliko ispitivanih supstanci u istom ispitivanju sve dok su zapremine parnog prostora dosljedne.

Pripremite razrijeđeni inokulum prije dodavanja posudama, na primjer pomoću pipete sa širokim otvorom. Dodajte alikvote dobro izmiješanog inokuluma (stav 25) tako da ukupna koncentracija čvrstih materija bude jednaka u svim posudama (između 1 g/l i 3 g/l). Po potrebi dodajte osnovne rastvore ispitivanoj i referentnoj supstanci nakon prilagođavanja na pH-vrijednost 7 ± 0,2. Ispitivanu supstancu i referentnu supstancu potrebno je dodati najodgovarajućim načinom primjene (stav 19).

Ispitna koncentracija organskog ugljenika uobičajeno bi trebalo da iznosi između 20 i 100 mg/l (stav 4). Ako je ispitivana supstanca toksična, ispitna koncentracija trebalo bi da bude smanjena na 20 mg/l ili čak i manje ako će se mjeriti samo primarna biorazgradnja specifičnim analizama. Potrebno je napomenuti da se varijabilnost rezultata ispitivanja povećava na nižim ispitnim koncentracijama.

Za posude sa slijepim probama dodajte jednaku količinu nosača koji se upotrebljava za doziranje ispitivane supstance umjesto osnovnog rastvora, suspenzije ili emulzije. Ako je ispitivana supstanca bila dodata pomoću filtera od staklenih vlakana ili organskih rastvarača, slijepim probama dodajte filter ili jednaku količinu rastvarača koji je ispario. Pripremite dodatno ponavljanje s ispitivanom supstancom za mjerenje pH-vrijednosti. Prema potrebi prilagodite pH-vrijednost na 7 ± 0.2, s malim količinama razrijeđene mineralne kisjeline ili alkalije. Potrebno je dodati iste količine sredstava za neutralizaciju svim ispitnim posudama. Ta dodavanja nije bilo potrebno ssprovesti jer je pH-vrijednost osnovnih rastvora ispitivanih supstanci i referentne supstance već bila prilagođena (v. st. 19 i 20). Ako će se mjeriti primarna biorazgradnja, potrebno je uzeti odgovarajući uzorak iz posude za kontrolu pHvrijednosti ili iz dodatne ispitne posude i koncentracija ispitivane supstance trebalo bi da se mjeri pomoću specifičnih analiza. Svim posudama moguće je dodati pokrivene magnete ako treba izmiješati reakcionu smješu (opciono).

Obezbijedite da su ukupna količina tečnosti V_1 i zapremina parnog prostora V_h isti u svim posudama; zabilježite vrijednosti V_1 i V_h. Svaka posuda trebalo bi da bude zapečaćena gasnim septumom i premještena iz komore za upravljanje s rukavicama u inkubator.

8.2. Nerastvorljive ispitivane supstance

Dodajte izvagane količine supstanci koje su slabo rastvorljive u vodi direktno u pripremljene posude. Kada je potrebna upotreba rastvarača (v. stav 19), premjestite tečnost ispitivane supstance u prazne posude. Kada je moguće, isparite rastvarač puštanjem azotnog gasa kroz posude i zatim dodajte ostale sastojke, odnosno razrijeđeni mulj (stav 25) i deoksigenisanu vodu prema potrebi. Potrebno je pripremiti i dodatnu kontrolnu grupu s rastvaračem. Za ostale metode dodavanja nerastvorljivih supstanci može se konsultovati standard ISO 10634. Tečne ispitivane supstance mogu se dozirati pomoću šprica u potpuno pripremljene zapečaćene posude ako se očekuje da početna pH-vrijednost neće preći 7 ± 1, u tom slučaju dozirajte kako je prethodno opisano.

8.3. Inkubacija i mjerenja pritiska gasa

Inkubirajte pripremljene posude na 35 °C ± 2 °C na otprilike sat vremena kako biste omogućili izjednačavanje i otpuštanje viška gasa u atmosferu, na primjer naizmjeničnim mućkanjem svake posude, stavljanjem igle mjerača pritiska (stav 13-c) kroz čep i otvaranjem ventila dok mjerač pritiska ne očita nulu. Ako je u ovoj fazi ili pri srednjim mjerenjima pritisak parnog prostora niži od atmosferskog, potrebno je uvesti azotni gas za ponovno uspostavljanje atmosferskog pritiska. Zatvorite ventil (v. stav 13-c) i nastavite s inkubacijom u mraku i obezbijedite da se svi djelovi posuda održavaju na temperaturi razgradnje.
Posmatrajte posude nakon inkubacije od 24 do 48 sati. Odbacite one posude čiji sadržaj ima jasnu ružičastu boju u tečnom supernatantu, tj. ako je resazurin (v. stav 16) promijenio boju, čime se ukazuje na prisutnost kiseonika (v. stav 50). Manje količine kiseonika u sistemu mogu se tolerisati, ali veće koncentracije mogu ozbiljno inhibirati tok anaerobne biorazgradnje. Odbacivanje pojedinačnih posuda iz grupe od tri posude može biti prihvatljivo, ali u slučaju da ih veći broj ne valja, potrebno je ssprovesti istragu eksperimentalnih postupaka i ponoviti ispitivanje.

Pažljivo pomiješajte sadržaj svake posude miješanjem ili mućkanjem nekoliko minuta najmanje dva do tri puta sedmično i neposredno prije svakog mjerenja pritiska. Mjerenjem se ponovo suspenduje inokulum i obezbjeđuje se uravnoteženost gasova. Sva mjerenja pritiska potrebno je sprovoditi brzo s obzirom na to da bi posude mogle biti izložene snižavanju temperature, što može dovesti do lažnih očitavanja. Tokom mjerenja pritiska cijelu ispitnu posudu, uključujući i parni prostor, potrebno je održavati na temperaturi razgradnje. Mjeri se pritisak gasa, na primjer stavljanjem kroz septum šprica s iglom (stav 13-c) povezanog s mjeračem pritiska. Potrebno je voditi računa da se spriječi ulazak vode u špric s iglom; ako se to dogodi, potrebno je osušiti mokre djelove i uvesti novu iglu. Pritisak je potrebno mjeriti u milibarima (v. stav 42). Pritisak gasa u posudama može se mjeriti s vremena na vrijeme, npr. sedmično i opciono, višak gasa ispušta se u atmosferu. Druga mogućnost je da se pritisak mjeri samo na kraju ispitivanja kako bi se odredila količina proizvedenog biogasa.

Preporučuje se da se sprovedu srednja očitavanja pritiska gasa jer povećanje pritiska služi kao smjernica kada bi ispitivanje moglo završiti i omogućava praćenje kinetike (v. stav 6).

Uobičajeno ispitivanje završite nakon perioda inkubacije od 60 dana, osim ako je kriva biorazgradnje koja je dobijena iz mjerenja pritiska prije toga dostigla fazu platoa; riječ je o fazi u kojoj je dostignuta maksimalna razgradnja i kriva razgradnje je poravnata. Ako je vrijednost platoa manja od 60 %, tumačenje postaje problematično jer ukazuje na to da je mineralizovan samo dio molekula ili da je napravljena greška. Na kraju uobičajenog perioda

inkubacije gas se proizvodi, ali faza platoa očigledno nije dostignuta, tada je potrebno razmotriti produžavanje ispitivanja kako bi se provjerilo da li će plato (> 60 %) biti dostignut.

8.4. Mjerenje neorganskog ugljenika

Na kraju ispitivanja nakon posljednjeg mjerenja pritiska gasa pustite mulj da se nataloži. Naizmjenično otvorite svaku posudu i odmah uzmite uzorak za određivanje koncentracije (mg/l) neorganskog ugljenika (IC) u suspenziji supernatanta. Nije potrebno primijeniti ni centrifugiranje ni filtriranje suspenzije supernatanta jer bi došlo do neprihvatljivog gubitka rastvorenog ugljen dioksida. Ako je suspenziju nemoguće analizirati ili uzorkovati, čuvajte je u zapečaćenoj bočici, bez parnog prostora i ohlađenu na oko 4 °C na period do dva dana. Nakon mjerenja neorganskog ugljenika izmjerite i zabilježite pH-vrijednost.

Druga mogućnost je da neorganski ugljenik u supernatantu bude određen indirektno otpuštanjem razrijeđenog neorganskog ugljenika kao ugljen dioksida koji se može izmjeriti u parnom prostoru. Nakon posljednjeg mjerenja pritiska gasa, prilagodite pritisak u svakoj posudi atmosferskom pritisku. Acidifikujte sadržaj svake posude na otprilike pH-vrijednost 1 dodavanjem koncentrovanih mineralnih kisjelina (npr. H_2SO_4) kroz septum zapečaćenih posuda. Inkubirajte promućkane posude na 35 °C ± 2 °C na otprilike 24 sata i mjerite pritisak gasa koji je nastao iz razvijenog ugljen dioksida pomoću mjerača pritiska.

Slično očitajte odgovarajuće slijepe probe, referentnu supstancu i, ako su uključene, posude za kontrolu inhibicijom.

U nekim slučajevima, naročito ako se iste kontrolne posude upotrebljavaju za nekoliko ispitivanih supstanci, mjerenja srednje koncentracije neorganskog ugljenika u ispitnim i kontrolnim posudama potrebno je razmotriti prema potrebi. U tom slučaju potrebno je pripremiti dovoljan broj posuda za sva srednja mjerenja. U ovom postupku prednost se daje uzimanju uzoraka samo iz jedne posude. Posljednje se može učiniti samo ako potrebna količina rastvorenog neorganskog ugljenika za analizu nije procijenjena visokom. Mjerenje rastvorenog neorganskog ugljenika potrebno je ssprovesti nakon mjerenja pritiska gasa bez otpuštanja viška gasa kako je opisano u nastavku:

- uzmite što je moguće manju količinu uzoraka supernatanta špricom kroz septum bez otvaranja posuda i određen je rastvoreni neorganski ugljenik u uzorku;
- nakon uzimanja uzorka višak gasa se otpušta ili ne otpušta; potrebno je uzeti u obzir činjenicu da čak i malo smanjenje u količini supernatanta (npr. oko 1 %) može dati značajno povećanje u zapremini gasa parnog prostora (V_h);
- jednačine (v. stav 44) su ispravljene povećanjem V_h u jednačini 3 prema potrebi.

8.5. Specifične analize

Ako se određuje primarna anaerobna razgradnja (v. stav 30), uzmite odgovarajuću količinu uzorka za specifične analize na početku i na kraju ispitivanja iz posuda koje sadrže ispitivanu supstancu. Ako je to urađeno, imajte u vidu da će zapremine parnog prostora (V_h) i tečnosti (V_l) biti promijenjene i uzmite to u obzir prilikom izračunavanja rezultata proizvodnje gasa. Druga mogućnost je da se uzorci uzmu za specifične analize iz dodatnih smješa prethodno napravljenih u ovu svrhu (stav 30).

9. PODACI I IZVJEŠTAVANJE

9.1. Obrada rezultata

Zbog praktičnih razloga pritisak gasa mjeri se u milibarima (1 mbar = 1h Pa = 102 Pa; 1 Pa = 1 N/m2), zapremina u litrima i temperatura u stepenima Celzijusa.

9.2. Ugljenik u parnom prostoru

Budući da jedan molekul metana i jedan molekul ugljen dioksida sadrže 12 g ugljenika, masa ugljenika u datoj zapremini razvijenog gasa može biti izražena kao:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \qquad \textit{Jednačina [1]}$$

pri čemu je:
m = masa ugljenika (mg) u datoj zapremini razvijenog gasa;
12 = relativna atomska masa ugljenika; n = broj molekula gasa u datoj zapremini.
Ako je neki drugi gas osim metana ili ugljen dioksida (npr. N_2O) proizveden u značajnim količinama, formulu [1] potrebno je izmijeniti kako bi se opisala mogućnost dejstava proizvedenih gasova.

Iz gasnih zakona *n* je moguće izraziti kao:

$$n = \frac{pV}{RT} \qquad \textit{Jednačina [2]}$$

pri čemu je:
p = pritisak gasa (paskal);
V = zapremina gasa (m^3);
R = molarna gasna konstanta [8,314 J/(mol K)]; T = temperatura inkubacije (kelvin).
Kombinovanjem jednačina [1] i [2] i racionalizovanjem kako bi se omogućila proizvodnja gasa slijepih roba:

$$m_h = \frac{12000\ x\ 0{,}1\ (\Delta p \cdot Vh)}{RT} \qquad \textit{Jednačina [3]}$$

pri čemu je: m_h = masa neto ugljenika proizvedenog kao gas u parnom prostoru (mg);
Δp = sredina razlike između početnog i završnog pritiska u ispitnim posudama minus odgovarajuća sredina u slijepim probama (milibari); Vh = zapremina parnog prostora u posudi (l); 0,1 = pretvaranje njutna/m^2 u milibare i m^3 u litre.
Jednačinu [4] potrebno je upotrebljavati za uobičajenu temperaturu inkubacije od 35 °C (308 K):

$$m_h = 0{,}468(\Delta p \cdot Vh) \qquad \textit{Jednačina [4]}$$

<u>*Napomena*</u>: Izračunavanje alternativne zapremine. Očitavanja mjerača pritiska pretvaraju se u ml gasa proizvedenog pomoću standardne krive dobijene grafičkim prikazom zapremine (ml) injektovanog naspram očitavanja mjerača (Dodatak 2). Broj molekula (n) gasa u parnom prostoru svake posude iizračunava se dijeljenjem kumulativne proizvodnje gasa (ml) s 25 286 ml/molekuli, što je zapremina koju zauzima jedan molekul gasa na 35 °C i standardni atmosferski pritisak. Budući da svaki molekul CH_4 i molekul CO_2 sadrži 12 g ugljenika, količina ugljenika (mg) u parnom prostoru (mh) dobija se jednačinom [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n$$ *Jednačina [5]*

Racionalizovanje kako bi se omogućila proizvodnja gasa u slijepoj kontroli:

$$m_h = \frac{12000\ x\ \Delta V}{25286} = 0{,}475 \Delta V$$ *Jednačina [6]*

pri čemu je: m_h = masa neto ugljenika proizvedenog u parnom prostoru (mg);
ΔV = sredina razlike između zapremine gasa proizvedenog u parnom prostoru u ispitnim posudama i posudama za kontrolnu slijepu probu;
25 286 = zapremina koju zauzima jedan molekul gasa na 35 °C, jedna atmosfera.

Tok biorazgradnje može se pratiti grafičkim prikazom ukupnog povećanja gasa Δp (milibari) u zavisnosti od vremena, prema potrebi. Iz ove krive odredite i zabilježite fazu prilagoĐavanja (u danima). Faza prilagoĐavanja je vrijeme od početka ispitivanja do početka značajne razgradnje. Ako su srednji uzorci supernatanta uzeti i analizirani, tada ukupni proizvedeni C (u gasu plus onaj u tečnosti) može biti grafički prikazan umjesto samo kumulativnog pritiska.

9.3. Ugljenik u tečnosti

Količina metana u tečnosti zanemaruje se jer je poznato da je njegova rastvorljivost u vodi vrlo niska. Izračunajte masu neorganskog ugljenika u tečnosti ispitnih posuda pomoću jednačine [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l$$ *Jednačina [7]*

pri čemu je: m_l = masa neorganskog ugljenika u tečnosti (mg);
C_{net} = koncentracija neorganskog ugljenika u ispitnim posudama minus koncentracija u kontrolnim posudama na kraju ispitivanja (mg/l);
V_l = zapremina tečnosti u posudi (l);

9.4. Ukupni gasifikovani ugljenik

Izračunajte ukupnu masu gasifikovanog ugljenika u posudi pomoću jednačine [8]:

$$m_t = m_h + m_l$$ *Jednačina [8]*

pri čemu je:

m_t = ukupna masa gasifikovanog ugljenika (mg); m_h i m_l prethodno su definisani.

9.5. Ugljenik ispitivane supstance

Izračunajte masu ugljenika u ispitivanoj supstanci dobijenu iz dodate ispitivane supstance pomoću jednačine [9]:

$$m_v = C_c \times V_l$$ *Jednačina [9]*

pri čemu je:

m_v = masa ugljenika ispitivane supstance (mg);

C_c = koncentracija ugljenika ispitivane supstance u ispitnoj posudi (mg/l)

V_l = zapremina tečnosti u ispitnoj posudi (l).

9.6. Opseg biorazgradnje

Izračunajte procenat biorazgradnje iz gasa iz parnog prostora pomoću jednačine [10] i ukupan procenat biorazgradnje pomoću jednačine [11]:

$$D_h = (m_h / m_v) \times 100 \qquad \textit{Jednačina [10]}$$

$$D_t = (m_t / m_v) \times 100 \qquad \textit{Jednačina [11]}$$

pri čemu je:

D_h = biorazgradnja iz gasa parnog prostora (%); D_t = ukupna biorazgradnja (%); m_h, m_v i m_t prethodno su definisani.

Stepen primarne biorazgradnje iizračunava se iz (opcionih) mjerenja koncentracije ispitivane supstance na početku i na kraju inkubacije pomoću jednačine [12]:

$$D_p = (1 - S_e / S_i) \times 100 \qquad \textit{Jednačina [12]}$$

pri čemu je:

D_p = primarna razgradnja ispitivane supstance (%);

S_i = početna koncentracija ispitivane supstance (mg/l); S_e = koncentracija ispitivane supstance na kraju (mg/l).

Ako se metodom analize ukazuje na značajne koncentracije ispitivane supstance u neizmijenjenom inokulumu anaerobnog mulja, upotrijebite jednačinu [13]:

$$D_p^1 = [1 - (S_e - S_{eb})/(S_i - S_{ib})] \times 100 \qquad \textit{Jednačina [13]}$$

pri čemu je:

D_p^1 = ispravljena primarna razgradnja ispitivane supstance (%);

S_{ib} = početna „očigledna— koncentracija ispitivane supstance (mg/l);

S_{eb} = „očigledna— koncentracija ispitivane supstance u kontroli slijepim probama (mg/l);

9.7. Valjanost rezultata

Očitavanja pritiska potrebno je upotrebljavati samo iz posuda koje ne pokazuju ružičastu boju. Kontaminacija kiseonikom svodi se na najmanju mjeru upotrebom odgovarajućih anaerobnih tehnika rukovanja.

Potrebno je uzeti u obzir činjenicu da je ispitivanje valjano ako referentna supstanca dostigne plato koji predstavlja više od 60 % biorazgradnje[72].

Ako je pH-vrijednost na kraju ispitivanja prešla raspon 7 ± 1 i dogodila se nedovoljna biorazgradnja, ponovite ispitivanje s povećanjem puferskog kapaciteta medijumuma.

9.8. Inhibicija razgradnje

Proizvodnja gasa u posudama koje sadrže i ispitivanu supstancu i referentnu supstancu trebalo bi da bude najmanje jednaka gasu u posudama koje sadrže samo referentnu supstancu; u suprotnom ukazuje se na inhibiciju proizvodnje gasa. U nekim slučajevima proizvodnja gasa u posudama koje sadrže ispitivanu supstancu bez referentne supstance biće niža od proizvodnje u slijepim probama, ukazujući na to da je ispitivana supstanca inhibitorna.

9.9. Izvještaj o ispitivanju

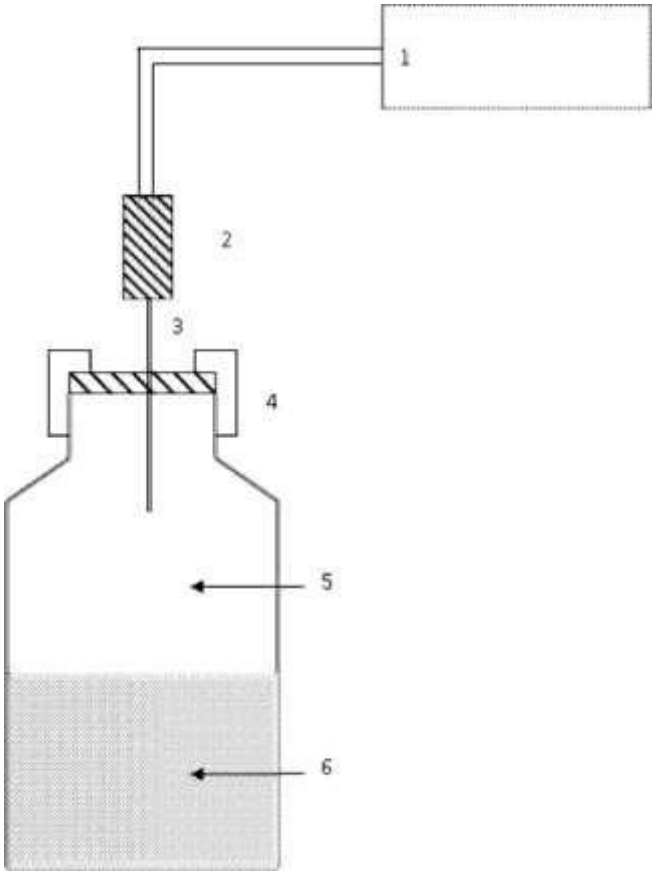
Izvještaj o ispitivanju mora obuhvatati sljedeće informacije:

Ispitivana supstanca:

- uobičajeni naziv, hemijski naziv, CAS broj, strukturna formula i relevantna fizičkohemijska svojstva;
- čistoća (nečistoće) ispitivane supstance. *Uslovi ispitivanja:*
- količine razrijeđene suspenzije iz digestora (V_l) i parnog prostora (V_h) u posudi;
- opis ispitnih posuda, glavnih karakteristika mjerenja biogasa (npr. vrsta mjerača pritiska) i analizatora neorganskog ugljenika;
- primjena ispitivane supstance i referentne supstance na sistem ispitivanja: upotrijebljena ispitna koncentracija i svaka upotreba rastvarača;
- detaljne informacije o upotrijebljenom inokulumu: naziv postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda, opis izvora prečišćene vode (npr. radna temperatura, vrijeme zadržavanja mulja, pretežno komunalni itd.), koncentracija, sve informacije koje su potrebne kako bi se ovo potvrdilo i svako prethodno čišćenje inokuluma (npr. prethodna razgradnja, prethodno izlaganje);
- temperatura inkubacije; broj određivanja. *Rezultati:*
- pH-vrijednost i vrijednosti neorganskog ugljenika na kraju ispitivanja;
- koncentracija ispitivane supstance na početku i na kraju ispitivanja ako je izvedeno specifično mjerenje;
- svi izmjereni podaci prikupljeni tokom ispitivanja, slijepa proba, referentna supstanca i posude za kontrolu inhibicijom, prema potrebi (npr. pritisak u milibarima, koncentracija neorganskog ugljenika (mg/l) u tabelarnom obliku (o izmjerenim podacima za parni prostor i tečnost potrebno je posebno izvijestiti);
- statistička obrada podataka, trajanje ispitivanja i dijagram biorazgradnje ispitivane supstance, referentne supstance i kontrola inhibicijom;
- procenat biorazgradnje ispitivane supstance i referentne supstance;
- obrazloženje odbijanja rezultata ispitivanja; rasprava o rezultatima.
- *Dodatak 1*

Primjer uređaja za mjerenje proizvodnje biogasa pritiskom gasa

[72] Ovo je potrebno ponovo procijeniti ako su uključene adsorptivne ili nerastvorive referentne hemikalije.



Legenda:

1 – Mjerač pritiska

2 – Trostruki gasno nepropusni ventil

3 – Špric s iglom

4 – Gasno nepropusni pečat (uvijeni čep i septum)

5 – Parni prostor (V_h)

6 – Inokulum razgrađenog mulja (V_l)

Ispitne posude u sredini na 35 °C ± 2 °C

Dodatak 2

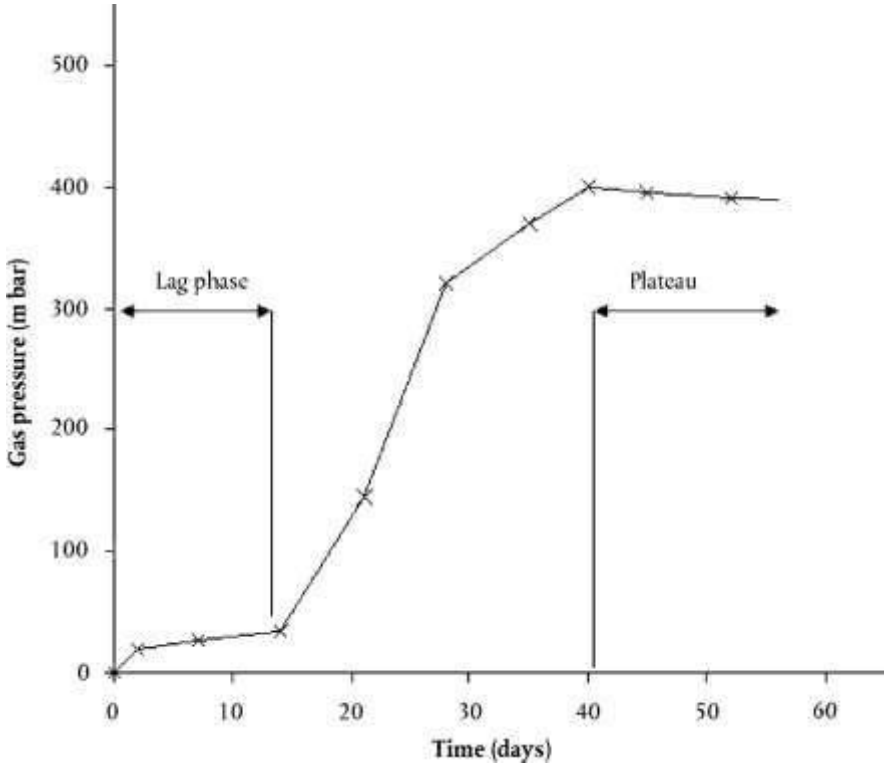
Pretvaranje mjerača pritiska

Očitavanja mjerača pritiska mogu biti povezana sa zapreminama gasa putem standardne krive koja nastaje injektiranjem poznatih količina vazduha na 35 °C ± 2 °C u serum boce koje sadrže količinu vode jednaku količini reakcione smješe, V_R:

- Stavite V_R ml alikvota vode, čuvanih na 35 °C ± 2 °C u pet serum boca. Zapečatite boce i stavite ih u vodeno kupatilo na 35 °C na jedan sat kako bi se izjednačile;
- Uključite mjerač pritiska, pričekajte da se stabilizuje i prilagodite na nulu;
- Stavite špric s iglom kroz pečat jedne od boca, otvorite ventil dok mjerač pritiska ne očita nulu pa zatvorite ventil;
- Ponovite postupak s preostalim bocama;
- Injektirajte 1 ml vazduha na 35 °C ± 2 °C u svaku bocu. Stavite iglu (na mjeraču) kroz pečat jedne od boca i pričekajte da se očitavanje pritiska stabilizuje. Zabilježite pritisak, otvorite ventil dok mjerač pritiska ne očita nulu i zatim zatvorite ventil;
- Ponovite postupak s preostalim bocama;
- Ponovite u potpunosti prethodni postupak pomoću 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml i 50 ml vazduha;
- Grafički prikažite krivu pritiska (Pa) naspram injektovane zapremine gasa Vb (ml). Odgovor instrumenta je linearan u rasponu od 0 Pa do 70 000 Pa i od 0 ml do 50 ml proizvodnje gasa.

Dodatak 3

Primjer krive razgradnje (kumulativno neto povećanje pritiska)



Dodatak 4

Primjer obrasca za ispitivanje anaerobne biorazgradnje – Obrazac za ispitivanu supstancu

Laboratorijaa: … Ispitivana supstanca: … Ispitivanje br.: …

Temperatura ispitivanja:(°C): … Zapremina parnog prostora (V_h): …(l)

Zapremina tečnosti (V_l): …(l)

Ugljenik u ispitivanoj supstanci $C_{c,v}$: …(mg/l) m_v [12]: …(mg)

Dan	p_1 (ispitiva na supstanca) (mbar)	p_2 (ispitiva na supstanca) (mbar)	p3 (ispitiva na supstanca) (mbar)	p (ispitiva na supstanca) srednja vrijednost (mbar)	p_4 (slijepa proba) (mbar)	p_5 (slijepa proba) (mbar)	p6 (slijepa proba) (mbar)	p (slijep a proba) srednj a vrijedn ost (mbar)	p (neto) ispitivana supstan ca – slijepa proba srednja vrijedno st (mbar)	Δp (neto) Kumulativno (mbar)	m_h parni prostor C 13 (mg)	D_h Biorazgradnja[14] (%)
	$C_{IC,1}$ ispitiva na supstanca (mg)	$C_{IC,2}$ ispitiva na supstanca (mg)	$C_{IC,3}$ ispitiva na supstanca (mg)	CIC srednja vrijednost ispitivane supstance (mg)	CIC, 4 slijepa proba (mg)	CIC, 5 slijepa proba (mg)	CIC, 6 slijepa proba (mg)	C_{IC} srednj a vrijedn ost slijepe probe (mg)	C IC, net ispitivana supstan ca – slijepa proba srednj	m_l tečnost C15 (mg)	m_t ukupno C16 (mg)	D_t Biorazgradnja[17] (%)

									a vrijedno st (mg)			
Neorganski ugljenik (kraj)												
pH-vrijedno st (kraj)												

[12] Ugljenik u ispitnoj posudi, m v (mg): m v = C C,v × Vl

[13] Ugljenik u parnom prostoru, m h (mg) na normalnoj temperaturi inkubacije (35 °C): m h = 0,468Δp × Vh 14 Biorazgradnja izračunata iz gasa parnog prostora, D h (%): D h = (m h × 100) / m v 15 Ugljenik u tečnosti ml (mg): ml = CIC,net × Vl

[16] Ukupni gasifikovani ugljenik, mt (mg): mt + ml

[17] Ukupna biorazgradnja, Dt (%): Dt = (mt × 100) / mv

Laboratorijaa: … Ispitivana supstanca: …

Ispitivanje br.: …

Temperatura ispitivanja:(°C): … Zapremina parnog prostora (V_h): …(l)

Zapremina tečnosti (V_l): …(l)

Ugljenik u ispitivanoj supstanci $C_{c,v}$: …(mg/l) m_v[18]:….(mg)

Dan	p 1 (ref.) (mbar)	p 2 (ref.) (mbar)	p 3 (ref.) (mbar)	p (ref.) srednja vrijednost (mbar)	p 4 (inhib.) (mbar)	p 5 (inhib.) (mbar)	p 6 (inhib.) (mbar)	p (inhib.) srednja vrijednost (mbar)	p (ref.) ref. – slijepa proba (mbar)	Δ p (ref.) Kumulativno (mbar)	m h parni prostor C[19] (mg)	D h Biorazgradnja[20] (%)

	C IC, 1 ref. (mg)	C IC, 2 ref. (mg)	C IC, 3 ref. (mg)	C IC ref. srednja vrijednost (mg)	C IC, 4 inhib. (mg)	C IC, 5 inhib. (mg)	C IC, 6 inhib. (mg)	C IC inhib. srednja vrijednost (mg)	C IC, net ref. – inhib. (mg)	m l tečnosti C[21] (mg)	m t ukupno C[22] (mg)	D t Biorazgradnja[23] (%)
Neorganski ugljenik (kraj)												
pH-vrijednost (kraj)												

[18] Ugljenik u ispitnoj posudi, m v (mg): m v = C C,v × Vl

[19] Ugljenik u parnom prostoru, m h (mg) na normalnoj temperaturi inkubacije (35 °C): m h = 0,468Δp × Vh

[20] Biorazgradnja izračunata iz gasa parnog prostora, D h (%): D h = (m h × 100) / m v

[21] Ugljenik u tečnosti m l (mg): m l = C IC,net × Vl

[22] Ukupni gasifikovani ugljenik, mt (mg): mt + m l

[23] Ukupna biorazgradnja, Dt (%): Dt = (mt × 100) / m v

C.44. ISPIRANJE U KOLONAMA TLA

1. UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD (TG) 312 (2004). Vještačke hemikalije mogu doći u dodir s tlom direktno zahvaljujući namjernoj primjeni (na primjer agrohemikalije) ili indirektnim putevima (na primjer, otpadna voda → kanalizacioni mulj → tlo ili vazduh → mokri/suvi talog). Prilikom procjene rizika tih hemikalija važno je procijeniti njihov potencijal za transformaciju u tlu i za prodiranje (ispiranje) u dublje slojeve tla, a zatim i u podzemne vode.

Dostupno je nekoliko metoda za mjerenje potencijala za ispiranje hemikalija u tlu u kontrolisanim laboratorijaskim uslovima, odnosno hromatografija tankog sloja tla, hromatografija debelog sloja tla, hromatografija u koloni tla i mjerenja adsorpcije – desorpcije (1) (2). U slučaju nejonizovanih hemikalija zahvaljujući koeficijentu raspodjele n–oktanol–voda (P_{ow}) moguća je rana procjena njihove adsorpcije i potencijala za ispiranje (3)(4)(5).

Opisana ispitna metoda zasniva se na hromatografiji kolone tla u poremećenom tlu (v. Dodatak 1 za definiciju). Sprovode se dvije vrste ekperimenta za utvrĐivanje (i) potencijala za ispiranje ispitivane hemikalije i (ii) potencijala za ispiranje produkata transformacije (studija sa starim ostacima) u tlu u kontrolisanim laboratorijaskim uslovima[73]. Ispitna metoda zasniva se na postojećim metodama (6)(7)(8)(9)(10)(11).

Na radionici OECD o izboru tla/sedimenta održanoj u Belgiratu, Italija 1995. godine (12) dogovoreni su broj i vrste tla za upotrebu u ovoj ispitnoj metodi. Iznesene su i preporuke za prikupljanje i skladištenje uzoraka tla i rukovanje njima za eksperimente ispiranja.

2. NAČELO ISPITNE METODE

Kolone izraĐene od odgovarajuće inertnog materijala (na primjer stakla, nerĐajućeg čelika, aluminijuma, teflona, PVC itd.) pune se tlom i zatim zasićuju i uravnotežuju rastvorom „vještačke kiše— (v. Dodatak 1 za definiciju) i ostavljaju da se ocijede. Zatim se površina svake kolone tla tretira ispitivanom hemikalijom i/ili starim ostacima ispitivane hemikalije. Nakon toga u kolone tla dodaje se vještačka kiša i prikuplja se eluat. Nakon postupka ispiranja tlo se vadi iz kolona i dijeli u odgovarajući broj segmenata zavisno od informacija za potrebe studije. Svi segmenti tla i eluat zatim se analiziraju na ispitivanu hemikaliju i, po potrebi, na produkte transformacije ili ostale ispitivane hemikalije.

3. PRIMJENJIVOST ISPITNE METODE

Ispitna metoda može se primijeniti na ispitivane hemikalije (neobilježene i radioaktivno obilježene, na primjer ^{14}C) za koje postoji dovoljno tačna i osjetljiva analitička metoda. Ispitnu metodu ne bi trebalo primjenjivati na hemikalije koje isparavaju iz tla i vode, odnosno ne ostaju u tlu i/ili eluatu u eksperimentalnim uslovima ove ispitne metode.

4. INFORMACIJE O ISPITIVANOJ HEMIKALIJI

Neobilježene i radioaktivno obilježene ispitivane hemikalije mogu se upotrijebiti za mjerenje ispiranja u kolonama tla. Radioaktivno obilježeni materijal potreban je za ispitivanje ispiranja produkata transformacije (starih ostataka ispitivane hemikalije) i za određivanja bilansa mase. Preporučuje se označavanje izotopom ^{14}C, ali korisni mogu biti i ostali izrastvori, poput ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Oznaku je po mogućnosti potrebno staviti na najstabilniji dio odnosno djelove molekula. Čistoća ispitivane hemikalije trebalo bi da bude najmanje 95 %.

Većinu hemikalija potrebno je primijeniti kao jedinstvenu supstancu. Međutiim, u slučaju aktivnih supstanci u sredstvima za zaštitu bilja za ispitivanje ispiranja matične ispitivane supstance mogu se upotrebljavati formulisani proizvodi, ali je njihovo ispitivanje naročito neophodno u slučaju vjerovatnosti da smješa utiče na stopu otpuštanja (na primjer granulisane ili formulacije s kontrolisanim otpuštanjem). Kad je riječ o posebnim zahtjevima za plan

[73] Iz studija ispiranja kolona sa sredstvima za zaštitu usjeva moguće je doći do informacija o pokretljivosti ispitivane hemikalije i njenih produkata transformacije, a one mogu biti i dopuna studijama sorpcije.

ispitivanja, prije sprovođenja korisno je konsultovati se s regulatornim tijelom. U studijama ispiranja ostatka potrebno je upotrebljavati čistu matičnu ispitivanu supstancu.

Prije sprovođenja ispitivanja ispiranja u kolonama tla sljedeće informacije o ispitivanoj hemikaliji trebalo bi po mogućnosti da budu rapoložive:

(1) rastvorljivost u vodi [ispitna metoda A.6.] (13);
(2) rastvorljivost u organskim rastvaračima;
(3) napon pare [ispitna metoda A.4.] (13) i Henrijeva konstanta;
(4) koeficijent raspodjele n-oktanol/voda [ispitne metode A.8. i A.24.] (13);
(5) koeficijent adsorpcije (Kd, Kf or KOC) [ispitne metode C.18. i/ili C.19.] (13);
(6) hidroliza [ispitna metoda C.7.] (13);
(7) konstanta disocijacije (pKa) [smjernica OECD TG 112] (25);
(8) aerobna i anaerobna transformacija u tlu [ispitna metoda C.23.] (13)

Napomena: U odnosnim izvještajima o ispitivanju potrebno je navesti temperaturu na kojoj su sprovedena ta mjerenja.

Količina ispitivane hemikalije primijenjene na kolone tla trebalo bi da bude dovoljna za otkrivanje najmanje 0,5 % primijenjene doze u svim pojedinačnim segmentima. U slučaju aktivnih hemikalija u sredstvima za zaštitu bilja količina primijenjene ispitivane hemikalije može odgovarati maksimalnoj preporučenoj stopi upotrebe (jedna primjena).

Za kvantifikaciju ispitivane hemikalije i, po potrebi, njenih produkata transformacije u tlu i eluatu mora biti raspoloživa odgovarajuća analitička metoda poznate tačnosti, preciznosti i osjetljivosti. Trebalo bi da bude poznata i granica analitičke detekcije ispitivane hemikalije i njenih važnih produkata transformacije (po pravilu najmanje svih produkata transformacije ≥ 10 % primijenjene doze uočene u studijama puta transformacije, ali, po mogućnosti, svih relevantnih ispitivanih produkata transformacije).

5. REFERENTNE HEMIKALIJE

Za procjenu relativne pokretljivosti ispitivane hemikalije u tlu potrebno je upotrebljavati referentne hemikalije poznatog ponašanja u smislu ispiranja, poput atnivo ili monurona čije se otpuštanje u području smatra umjerenim. Za potvrdu hidrodinamičkih svojstava kolone tla mogu biti korisne i nesorbirajuće i nerazgradive polarne referentne hemikalije (na primjer tritijum, brom, fluorescein, eozin) za praćenje kretanja vode u koloni.

Mogu se upotrebljavati i analitičke standardne hemikalije za karakterizaciju i/ili identifikaciju produkata transformacije pronaĐenih u segmentima tla i u eluatima hromatografskim, spektroskopskim ili ostalim relevantnim metodama.

6. DEFINICIJE I JEDINICE

Dodatak 1.

7. KRITERIJUMI KVALITETA

7.1. Iskorišćenje

Zbir procenata ispitivane hemikalije pronaĐenih u segmentima tla i eluata u koloni nakon ispiranja predstavlja iskorišćenje eksperimenta ispiranja. Iskorišćenja bi trebalo da se kreću u rasponu od 90 % do 110 % kod radioaktivno obilježenih hemikalija (11) i od 70 % do 110 % kod neobilježenih hemikalija (8).

7.8. Ponovljivost i osjetljivost analitičke metode

Ponovljivost analitičke metode za kvantifikaciju ispitivane hemikalije i produkata transformacije moguće je provjeriti dvostrukom analizom istog ekstrakta segmenta tla ili eluata (v. stav 11).

Granica detekcije (engl. limit of detection, LOD) analitičke metode za ispitivanu hemikaliju i produkte transformacije trebalo bi da bude najmanje 0,01 mg · kg– 1 u svim segmentima tla ili eluatu (kao ispitivana hemikalija) ili 0,5 % primijenjene doze u pojedinačnim segmentima, zavisno od toga što je manje. Potrebno je navesti i granicu kvantifikacije (engl. limit of quantification, LOQ).

8. OPIS ISPITNE METODE

8.1. Sistem ispitivanja

Za ispitivanje se upotrebljavaju podjeljive i nepodjeljive kolone za ispiranje izraĐene od odgovarajuće inertnog materijala (na primjer stakla, nerĐajućeg čelika, aluminijuma, teflona, PVC itd.) unutrašnjeg prečnika najmanje 4 cm i visine najmanje 35 cm. Materijale kolona potrebno je ispitati s obzirom na moguće interakcije s ispitivanom hemikalijom i/ili njenim produktima transformacije. Primjeri odgovarajućih podjeljivih i nepodjeljivih kolona navedeni su u Dodatku 2.

Za punjenje i sabijanje kolona tla upotrebljavaju se kašičica, ubrizgač i vibracioni uređaj.

Za dodavanje vještačke kiše kolonama tla mogu se upotrijebiti klipne ili peristaltičke pumpe, glave za tuširanje, Marioteove boce ili jednostavne kapalice.

8.3. Laboratorijaska oprema i hemikalije

Potrebna je standardna laboratorijaska oprema, a naročito:

(1) analitički instrumenti, poput opreme za GLC, HPLC i TLC, uključujući odgovarajuće sisteme detekcije za analizu obilježenih ili neobilježenih hemikalija ili inverznu metodu razblaživanja izotopa,
(2) instrumenti za identifikaciju (npr. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR itd),
(3) tečni scintilacioni brojač za radioaktivno obilježenu ispitivanu hemikaliju,
(4) oksidator za sagorijevanje označenog materijala,
(5) aparatura za ekstrakciju (npr. epruvete za centrifugiranje za hladnu ekstrakciju i aparatura po Soksletu za kontinuiranu ekstrakciju pod refluksom),
(6) instrumenti za koncentrovanje rastvora i ekstrakata (npr. rotacioni isparivač).

Upotrijebljene hemikalije uključuju: analitički čiste organske rastvarače poput acetona, metanola itd, scintilacionu tečnost, rastvor 0,01 M $CaCl_2$ u destilovanoj ili dejonizovanoj vodi (vještačka kiša).

8.4. Ispitivana hemikalija

Ispitivana hemikalija trebalo bi za primjenu u koloni tla da bude rastvorena u vodi (dejonizovanoj ili destilovanoj). Ako je ispitivana hemikalija slabo rastvorena u vodi, moguće ju je primijeniti kao formulisani proizvod (po potrebi nakon suspenzije ili emulgacije u vodi) ili u bilo kojem organskom rastvaraču. U slučaju upotrebe organskog rastvarača on bi trebalo da bude sveden na najmanju moguću mjeru i trebalo bi da ispari s površine kolone tla prije početka postupka ispiranja. Čvrste formulacije, poput granula, potrebno je primijeniti u čvrstom obliku, bez vode; radi bolje distribucije po površini kolone tla formulisani proizvod može se prije upotrebe pomiješati s malom količinom kvarcnog pijeska (na primjer 1 g).

Količina ispitivane hemikalije primijenjene na kolone tla trebalo bi da bude dovoljna za otkrivanje najmanje 0,5 % primijenjene doze u svim pojedinačnim segmentima. U slučaju aktivnih hemikalija u sredstvima za zaštitu bilja ona se može zasnivati na maksimalnoj preporučenoj stopi upotrebe (stopa jedne primjene) i u slučaju polaznog i starog ispiranja trebalo bi da se odnosi na površinu upotrijebljene kolone tla[25].

8.5. Referentna hemikalija

U eksperimentima ispiranja potrebno je upotrebljavati referentnu hemikaliju (v. stav 12). Tu hemikaliju potrebno je primijeniti na površinu kolone tla na sličan način kao ispitivanu hemikaliju i po odgovarajućoj stopi zahvaljujući kojoj je moguća adekvatna detekcija kao interni standard s ispitivanom hemikalijom na istoj koloni tla ili samostalno na posebnoj koloni tla. Poželjno je obje hemikalije primijeniti na istoj koloni, osim ako nijesu slično označene.

[25] Količina koju treba primijeniti na cilindrične kolone tla može se izračunati sljedećom formulom:

$M\ [\mu g] = \frac{A\ \frac{kg}{ha} \cdot 10^9 [\mu g/kg] \cdot d^2\ [cm^2] \cdot \pi}{10^8 [cm^2/ha] \cdot 4}$ pri čemu je:

M = primijenjena količina po koloni [µg]

A = stopa primjene [kg · ha– 1] D = prečnik kolone tla [cm] π = 3,14

8.6. Tla

Izbor tla

26. Za studije ispiranja matičnom ispitivanom hemikalijom potrebno je upotrebljavati tri do četiri tla različitih pH-vrijednosti, sadržaja organskog ugljenika i teksture (12). Smjernice za izbor tla za eksperimente ispiranja nalaze se u tabeli 1 u nastavku. U slučaju jonizujućih ispitivanih hemikalija odabrana tla trebalo bi da uključuju širok raspon pH-vrijednosti radi procjene pokretljivosti hemikalije u jonizujućim i nejonizujućim oblicima; najmanje tri tla trebalo bi da imaju pH-vrijednost pri kojoj je ispitivana hemikalija u pokretnom obliku.

Tabela 1: **Smjernice za izbor tla za studije ispiranja**

Br. tla	pH-vrijednost	Organski ugljenik %	Sadržaj gline %	Tekstura (*)
1	> 7,5	3,5 – 5,0	20 – 40	glinovita ilovača
2	5,5 – 7,0	1,5 – 3,0	15 – 25	prašinasta ilovača
3	4,0 – 5,5	3,0 – 4,0	15 – 30	ilovača
4	< 4,0 – 6,0 §	< 0,5 – 1,5 § ‡	< 10 – 15 §	ilovasti pijesak
5	< 4,5	> 10 #	< 10	ilovasti pijesak / pijesak

(*) Prema sistemima FAO i USDA (14).

§ Odgovarajuće varijable trebalo bi da pokažu vrijednosti unutar navedenog raspona. Međutiim, ako se pojave poteškoće pri pronalaženju odgovarajućeg materijala tla, prihvataju se vrijednosti niže od navedenih najnižih vrijednosti.

‡ Tla s manje od 0,3 % organskog ugljenika mogu narušiti korelaciju između organskog sadržaja i adsorpcije. Zato se preporučuje upotreba tla s minimalnim sadržajem organskog ugljenika od 0,3 %. # Tla s vrlo visokim sadržajem ugljenika (na primjer > 10 %) mogu biti pravno neprihvatljiva, na primjer za potrebe registracije pesticida.

Povremeno mogu biti potrebne ostale vrste tla koje predstavljaju hladnije, umjerene i tropske predjele. Stoga, ako se ipak upotrebljavaju ostale vrste tla, njih je potrebno opisati na osnovu jednakih parametara i one bi trebalo da imaju slične razlike u svojstvima kao i vrste opisane u smjernicama za izbor tla za studije ispiranja (v. prethodnu tabelu 1), čak i ako u potpunosti ne ispunjavaju kriterijume.

Za studije ispiranja „starim ostacima— potrebno je upotrebljavati jedno tlo (12). Ono bi trebalo da ima sadržaj pijeska > 70 % i sadržaj organskog ugljenika od 0,5 do 1,5 % (na primjer tlo br. 4 u tabeli 1). Postoji mogućnost upotrebe više vrsta tla u slučaju važnosti podataka o produktima transformacije.

Potrebno je opisati najmanje teksturu [% pijeska, % prašine, % gline prema sistemima klasifikacije FAO i USDA (14)], pH-vrijednost, kapacitet izmjene katjona, sadržaj organskog ugljenika, nasipnu gustinu (za poremećeno tlo) i vodni kapacitet svakog tla. Mjerenje mikrobne biomase potrebno je isključivo za tlo koje se upotrebljava tokom perioda starenja/inkubacije prije starog eksperimenta ispiranja. Informacije o dodatnim svojstvima tla (na primjer klasifikacija tla, mineralogija gline, određena površina) mogu biti korisne pri tumačenju rezultata ove studije. Za određivanje svojstava tla mogu se upotrebljavati metode preporučene u referencama.

Prikupljanje i skladištenje tla

Tla je potrebno uzimati iz gornjeg sloja (horizont A) do najdublje 20 cm. Ostatke vegetacije, krupnije faune i kamenja potrebno je ukloniti. Tla (osim onih koja se upotrebljavaju za starenje ispitivane hemikalije) suše se na vazduhu na sobnoj temperaturi (poželjno od 20 do 25 °C). Dezagregaciju je potrebno obaviti uz minimalnu primjenu sile kako bi se što bolje sačuvala izvorna tekstura tla. Tla se prosijavaju kroz sito ≤ 2 mm. Preporučuje se pažljiva homogenizacija jer to povećava reproduktivnost rezultata. Prije upotrebe tla se mogu skladištiti na sobnoj

temperaturi i sušiti na vazduhu (12). Ne postoji preporučeno ograničenje vremena skladištenja, ali tla koja se skladište duže od tri godine potrebno je prije upotrebe ponovo analizirati po pitanju sadržaja organskog ugljenika i pH-vrijednosti.

Detaljne informacije o istoriji lokacija polja gdje se uzimaju ispitivana tla trebalo bi da budu na rapolaganju. Podaci uključuju tačnu lokaciju [tačno definisanu UTM (Univerzalna transferzalna Merkatorova projekcija/evropski horizontalni datum) ili geografskim koordinatama], vegetacijski pokrivač, tretiranje sredstvima za zaštitu usjeva, tretiranje organskim i neorganskim Đubrivima, dodatke biološkog materijala ili slučajna zagaĐenja (12). Ako je u posljednje četiri godine tretirano ispitivanom hemikalijom ili njenim strukturnim analozima, tlo ne bi trebalo upotrebljavati za studije ispiranja.

Uslovi ispitivanja

Tokom perioda ispitivanja kolone za ispiranje tla potrebno je čuvati na tamnom mjestu na sobnoj temperaturi sve dok se ona kreće u rasponu od ± 2 °C. Preporučene su temperature od 18 do 25 °C.

Vještačku kišu (0,01 M $CaCl_2$) potrebno je stalno primjenjivati na površinu kolone tla po stopi od 200 mm tokom 48 sati[74]; ta stopa jednaka je primjeni 251 ml za kolonu unutrašnjeg prečnika 4 cm. Za potrebe ispitivanja mogu se dodatno upotrebljavati i ostale stope vještačkih padavina i duže trajanje.

SprovoĐenje ispitivanja

Ispiranje matičnom ispitivanom hemikalijom

Najmanje dvostruke kolone za ispiranje pune se netretiranim, na vazduhu osušenim i prosijanim tlom (< 2 mm) do visine od približno 30 cm. Kako bi se obezbijedilo ujednačeno punjenje, tlo se kašikom stavlja u kolone u malim količinama i pritiska ubrizgačem i istovremeno nježno vibrira sve dok vrh kolone tla dalje ne potone. Ujednačeno punjenje potrebno je radi dobijanja ponovljivih rezultata za kolone za ispiranje. V. reference (20) (21) i (22) za pojedinosti o tehnikama punjenja kolona. Radi kontrole ponovljivosti postupka punjenja utvrđuje se ukupna masa tla kojima se kolone pune[75]; mase dvostrukih kolona trebalo bi da budu slične.

Nakon punjenja kolone tla prethodno se vlaže vještačkom kišom (0,01 M $CaCl_2$) od dna do vrha kako bi voda istisnula vazduh u porama tla. Zatim se kolone tla ostavljaju da se uravnoteže, a višak vode otiče zahvaljujući gravitaciji. Metode zasićenja kolona navedene su u referenci (23).

Zatim se ispitivana hemikalija i/ili referentna hemikalija primjenjuje na kolone tla. Za postizanje homogene distribucije rastvore, suspenzije ili emulzije ispitivane i/ili referentne hemikalije potrebno je primijeniti ravnodnosno po površini kolona tla. Ako je za primjenu ispitivane

[74] Tako se simuliraju izuzetno obilne padavine. Na primjer, prosječne godišnje padavine u centralnoj Evropi su reda veličine 800 – 1 000 mm.

[75] Primjeri nasipnih gustina poremećog tla su sljedeći: za pjeskovito tlo 1,66 g · ml– 1 za ilovaču 1,17 g · ml– 1 za pjeskovitu ilovaču 1,58 g · ml– 1 za praškasto tlo 1,58 g · ml– 1

hemikalije preporučeno da se ona umiješa u tlo, to je potrebno učiniti s malom količinom (na primjer 20 g) tla i staviti na površinu kolone tla.

Na površinu kolona tla zatim se stavljaju stakleni sinterovani disk, staklene kuglice, filteri od staklenih vlakana ili okrugli filterski papir radi ravnodnosne distribucije vještačke kiše po cijeloj površini i izbjegavanja narušavanja površine tla kapljicama kiše. Što je veći prečnik kolone, to je više pažnje potrebno pri primjeni vještačke kiše na kolone tla radi ravnodnosne distribucije vještačke kiše po površini tla. Zatim se vještačka kiša stavlja u kolone tla kap po kap klipnom, peristaltičkom pumpom ili kapalicom. Poželjno je eluate prikupiti u frakcijama i evidentirati njihove zapremine[76].

Nakon ispiranja i ostavljanja kolona da se ocijede one se dijele na odgovarajući broj segmenata zavisno od informacija potrebnih za potrebe studije; segmenti se ekstrahuju odgovarajućim rastvaračima ili mješavinama rastvarača i analiziraju na ispitivanu hemikaliju i, zavisno od slučaja, produkte transformacije, za ukupnu radioaktivnost i za referentnu hemikaliju. Eluati ili frakcije eluata analiziraju se direktno ili nakon ekstrakcije za iste produkte. Prilikom upotrebe radioaktivno obilježene ispitivane hemikalije potrebno je identifikovati sve frakcije koje sadrže ≥ 10 % primijenjene radioaktivnosti.

Ispiranje starim ostacima

Svježe tlo (koje nije prethodno sušeno na vazduhu) tretira se po stopi koja odgovara površini kolona tla radioaktivno obilježenom ispitivanom hemikalijom i inkubira se u aerobnim uslovima u skladu s ispitnom metodom C.23 (13). Period inkubacije (starenja) trebalo bi da bude dovoljno dug za proizvodnju značajnih količina produkata transformacije; preporučuje se period starenja od jednog poluvijeka ispitivane hemikalije[29], ali on ne bi trebalo da prelazi 120 dana. Staro tlo se prije ispiranja analizira na ispitivanu hemikaliju i njene produkte transformacije.

Kolone za ispiranje pune se do visine od 28 cm istim tlom (ali sušenim na vazduhu) koje se upotrebljava u eksperimentu starenja opisanom u stavu 34, a utvrđuje se i ukupna masa napunjenih kolona tla. Kolone tla se zatim prethodno vlaže prema opisu iz stava 35.

Zatim se ispitivana hemikalija i njeni produkti transformacije primjenjuju na površinu kolona tla u obliku starih ostataka tla kao segment tla visok 2 cm. Ukupna visina kolona tla (netretirano tlo + staro tlo) ne bi trebalo da prelazi 30 cm.

Ispiranje se vrši na način opisan u stavu 37.
Nakon ispiranja segmenti tla i eluati analiziraju se kako je navedeno u stavu 38 za ispitivanu hemikaliju, njene produkte transformacije i neekstrahovanu radioaktivnost. Kako bi se utvrdila količina starog ostatka koji se nakon ispiranja zadržao u gornjem sloju od 2 cm, taj segment je potrebno naročito analizirati.

9. PODACI I IZVJEŠTAVANJE

9.1. Obrada rezultata

[76] Tipične zapremine eluata kreću se u rasponu od 230 do 260 ml, što odgovara približno 92 do 104 % ukupno primijenjene vještačke kiše (251 ml) u slučaju upotrebe kolona tla prečnika 4 cm i dužine 30 cm. [29] U tlu može nastati više glavnih produkata transformacije do čega može doći u različitim trenucima tokom studije transformacije. U takvim slučajevima može biti potrebno sprovesti studije ispiranja starim ostacima različite starosti.

Količine ispitivane hemikalije, produkata transformacije, neekstraktabilnih supstanci i, zavisno od slučaja, referentne hemikalije potrebno je navesti u % primijenjene početne doze za svaki segment tla i frakciju eluata. Za svaku kolonu potrebno je navesti grafički prikaz utvrĐenih procenata kao funkciju dubina tla.

Kad se u studijama ispiranja kolona upotrebljava referentna hemikalija, njeno ispiranje može se procijeniti na relativnoj skali pomoću faktora relativne pokretljivosti (engl. relative mobility factors, RMF) (1) (11) zahvaljujući kojima je moguće poređenje podataka o ispiranju različitih hemikalija dobijenih pomoću različitih vrsta tla. Primjeri vrijednosti faktora relativne pokretljivosti za niz hemikalija za zaštitu usjeva navedeni su u Dodatku 3.

Procjene vrijednosti K_{oc} (normirani koeficijent adsorpcije organskog ugljenika) i K_{om} (normirani koeficijent raspodjele organske supstance) mogu se dobiti i iz rezultata ispiranja kolona pomoću prosječne dubine ispiranja ili utvrĐenih korelacija između faktora relativne pokretljivosti i koeficijenta K_{om}, odnosno K_{oc} (4) ili primjenom jednostavne hromatografske teorije. Međutiim, posljednju metodu potrebno je pažljivo primjenjivati, naročito kad se uzme u obzir činjenica da postupak ispiranja ne uključuje samo uslove zasićenog protoka, već i nezasićene sisteme.

9.2. Tumačenje rezultata

Zahvaljujući studiji ispiranja kolona opisanoj u ovoj metodi moguće je određivanje potencijala ispiranja ili pokretljivosti ispitivane hemikalije (u studijama ispiranja matične hemikalije) i/ili njenih produkata transformacije (u studijama ispiranja starim ostacima) u tlu. Ta ispitivanja nijesu kvantitativno predviĐanje ponašanja u smislu ispiranja u uslovima na terenu, ali mogu se upotrijebiti za poređenje mogućnosti ispiranja jedne hemikalije s ostalima čije je ponašanje u smislu ispiranja možda poznato (24). Slično tome, njima se ne mjeri kvantitativno procenat primijenjene hemikalije koja može doprijeti u podzemne vode (11). Međutiim, rezultati studija ispiranja kolona mogu biti pomoć pri odluci o potrebi sprovođenja dodatnih poluterenskih ili terenskih ispitivanja za hemikalije koje pokazuju veliki potencijal pokretljivosti u laboratorijaskim ispitivanjima.

9.3. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj mora sadržati:

Ispitivana hemikalija i referentna hemikalija (zavisno od slučaja):

- uobičajeni naziv, hemijski naziv (IUPAC i CAS nomenklatura), CAS broj, hemijska struktura (uz naznaku mjesta oznake u slučaju upotrebe radioaktivno obilježenog materijala) i relevantna fizičko-hemijska svojstva,
- čistoće (nečistoće) ispitivane hemikalije, radiohemijska čistoća obilježene hemikalije i specifična aktivnost (po potrebi).

Ispitivana tla:

- podaci o mjestu prikupljanja, svojstva tla, poput pH-vrijednosti, sadržaja organskog ugljenika i gline, teksture i nasipne gustine (u slučaju poremećenog tla),

- djelovanje mikroba u tlu (isključivo u slučaju tla koje se upotrebljava za starenje ispitivane hemikalije),
- trajanje skladištenja tla i uslovi skladištenja.

Uslovi ispitivanja:

- datumi sprovođenja studija, dužina i prečnik kolona za ispiranje, ukupna masa tla u kolonama, količina primijenjene ispitivane hemikalije i, zavisno od slučaja, referentne hemikalije, količina, učestalost i trajanje primjene vještačke kiše,
- temperatura postavki eksperimenta, broj ponavljanja (najmanje dva), metode za analizu ispitivane hemikalije, produkata transformacije i, zavisno od slučaja, referentne hemikalije u različitim segmentima tla i eluatima,
- metode za karakterizaciju i identifikaciju produkata transformacije u segmentima tla i eluatima.

Rezultati ispitivanja:

- tabele rezultata izraženih kao koncentracije i kao procenat primijenjene doze za segmente tla i eluate,
- bilans mase, zavisno od slučaja, zapremine eluata, dubina ispiranja i, zavisno od slučaja, faktori relativne pokretljivosti, grafički prikaz procenta pronaĐenog u segmentima tla u odnosu na dubinu segmenta tla, rasprava i tumačenje rezultata.
-
-

Dodatak 1

Definicije i jedinice

Stari ostatak tla: ispitivana hemikalija i produkti transformacije prisutni u tlu nakon primjene i nakon dovoljno dugog perioda kako bi procesi transporta, adsorpcije, metabolizma i rasipanja mogli promijeniti distribuciju i hemijska svojstva nekih od primijenjenih hemikalija (1).

Vještačka kiša: padavina 0,01 M $CaCl_2$ u destilovanoj ili dejonizovanoj vodi.

Prosječna dubina ispiranja: dno odjeljka tla s kumulativnom rekuperisanom hemikalijom = 50 % ukupno rekuperisane ispitivane hemikalije [uobičajeni eksperiment ispiranja] ili (dno odjeljka tla s kumulativnom rekuperisanom hemikalijom = 50 % ukupno rekuperisane ispitivane hemikalije) – ((debljina sloja starog ostatka)/2) [studija ispiranja starog ostatka].

Hemikalija: supstanca ili smješa.
Eluat: vodena faza procijeĐena kroz profil tla ili kolonu tla (1).

Ispiranje: postupak kojim hemikalija prodire u profil tla ili kolonu tla (1).

Dubina ispiranja: najdublji segment tla u kojem je nakon postupka ispiranja pronaĐeno ≥ 0,5 % primijenjene ispitivane hemikalije ili starog ostatka (ekvivalent dubini prodiranja).

Granica detekcije (engl. limit of Detection, LOD) i **granica kvantifikacije** (engl. limit of Quantification, LOQ): granica detekcije (LOD) je koncentracija hemikalije ispod koje se

hemikalija više ne može razlikovati od analitičkih artefakata. Granica kvantifikacije (LOQ) je koncentracija hemikalije ispod koje se koncentracija ne može odrediti s prihvatljivom tačnošću.

Faktor relativne pokretljivosti: (dubina ispiranja ispitivane hemikalije (cm)) / (dubina ispiranja referentne hemikalije (cm))

Ispitivana hemikalija: Bilo koja supstanca ili smješa ispitivana primjenom ove ispitne metode.

Produkt transformacije: sve hemikalije koje nastaju u biotičkim ili abiotičkim reakcijama transformacije ispitivane supstance, uključujući CO_2 i produkte u vezanim ostacima.

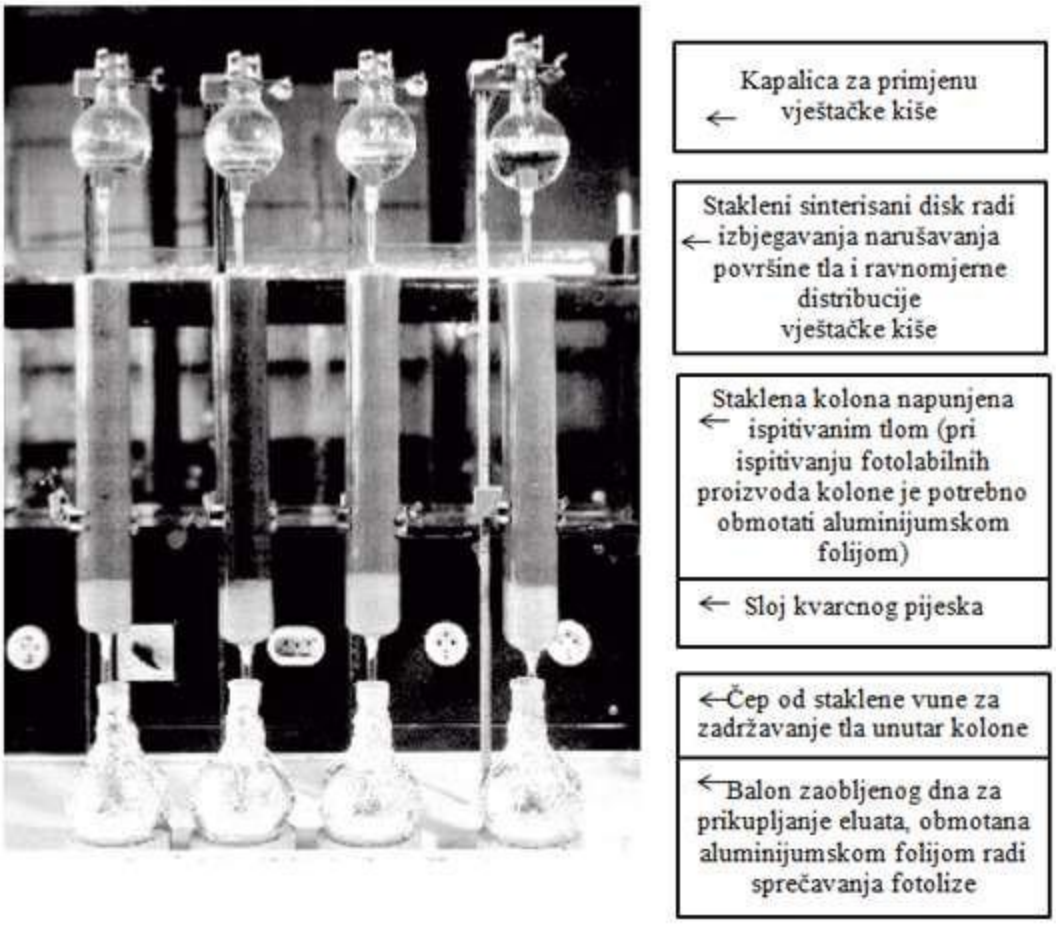
Tlo: mješavina mineralnih sastojaka i organsko-hemijskih sastojaka koji sadrže jedinjenja velike molekulske mase s visokim sadržajem ugljenika i azota, nastanjena sitnim (uglavnom mikro) organizmima. Tlom se može rukovati u dva stanja:

- neporemećenom: u obliku nastalom s vremenom, s karakterističnim slojevima različitih vrsta tla;
- poremećenom: u obliku u kojem se obično nalazi na poljoprivrednim zemljištima, odnosno u obliku u kojem je u ovoj metodi prisutno u uzorcima koji se uzimaju kopanjem (2).

Dodatak 2

Slika 1

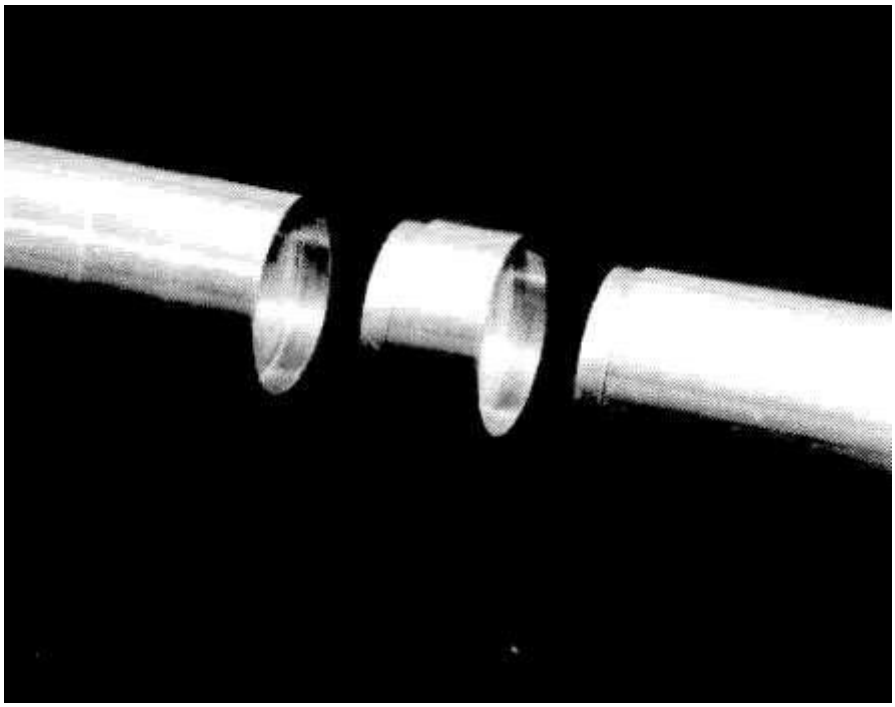
Primjer staklenih nedjeljivih kolona za ispiranje dužine 35 cm i unutrašnjeg prečnika 5 cm (1)



(1) Drescher, N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie.
In Unser Boden — 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225-236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.

Slika 2

Primjer podjeljive metalne kolone unutrašnjeg prečnika 4 cm (1)



(1) Burkhard, N., Eberle D.O. and Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203-213.

Dodatak 3 **Primjeri faktora relativne pokretljivosti (*) za različite hemikalije za zaštitu usjeva (1)(2) i odgovarajuće klase pokretljivosti +**

Raspon faktora relativne pokretljivosti	Hemikalija (faktor relativne pokretljivosti)	Klasa pokretljivosti
≤ 0,15	Paration (< 0,15), flurodifen (0,15)	I nepokretljivost
0,15 – 0,8	Profenofos (0,18), propikonazol (0,23), diazinon (0,28), diuron (0,38), terbutilazin (0,52), metidation (0,56), prometrin (0,59), pruočin (0,64), alahlor (0,66), metolahlor (0,68)	II blaga pokretljivost
0,8 – 1,3	monuron (**) (1,00), atrazin (1,03), simazin (1,04), fluometuron (1,18)	III umjerena pokretljivost
1,3 – 2,5	Prometon (1,67), cianazin (1,85), bromacil (1,91), karbutilat (1,98)	IV prilična pokretljivost
2,5 – 5,0	karbofuran (3,00), dioksakarb (4,33)	V pokretljivost
> 5,0	Monokrotofos (> 5,0), dikrotofos (> 5,0)	VI izuzetna pokretljivost

(*) Faktor relativne pokretljivosti iizračunava se na sljedeći način (3):

$$RMF = \frac{dubina\ ispiranja\ ispitivane\ hemikalije\ (cm)}{dubina\ ispiranja\ referentne\ hemikalije\ (cm)}$$

(**) Referentna hemikalija

+ Ostali sistemi klasifikacije pokretljivosti hemikalije u tlu zasnivaju se na vrijednostima Rf iz hromatografije tankog sloja tla (4) i vrijednostima Koc (5)(6).

C.45. PROCJENA EMISIJA U ŽIVOTNU SREDINU IZ DRVETA TRETIRANOG ZAŠTITNIM SREDSTVIMA: LABORATORIJASKA METODA ZA PROIZVODE OD DRVETA KOJI NIJESU PRASTVORENI I KOJI SU U KONTAKTU SA SLATKOM ILI MORSKOM VODOM

1. UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD (TG) 313 (2007). Emisije u životnu sredinu iz drveta tretiranog zaštitnim sredstvima treba kvantifikovati radi procjene rizika tretiranog drveta za životnu sredinu. Ovom ispitnom metodom opisuje se laboratorijaska metoda za procjenu emisija iz drveta tretiranog zaštitnim sredstvima u slučaju dvije mogućnosti ulaska emisija u životnu sredinu:

- Emisije iz tretiranog drveta u kontaktu sa slatkom vodom. Mogućnost ulaska emisija iz površine tretiranog drveta u vodu.
- Emisije iz tretiranog drveta u kontaktu s morskom vodom. Mogućnost ulaska emisija iz površine tretiranog drveta u morsku vodu.

Svrha ove ispitne metode je ispitivanje emisija iz drveta i proizvoda od drveta koji nijesu prastvoreni i koji su u kontaktu sa slatkom ili morskom vodom. Klase upotrebe su u međunarodnoj upotrebi za kategorizaciju biološkog rizika kojem će tretirani proizvod biti podvrgnut. Klasama upotrebe definiše se i upotreba tretiranog proizvoda i određuju područja životne sredine (vazduh, voda, tlo) kojima prijeti mogući rizik od drveta tretiranog zaštitnim sredstvima.

Ispitna metoda je laboratorijaski postupak za prikupljanje uzoraka (emisata) iz vode u koju je potopljeno tretirano drvo tokom sve dužih vremenskih intervala nakon izlaganja. Količina emisija u emisatu povezana je s površinom drveta i trajanjem izloženosti radi procjene strujanja u mg/m^2/dan. Na taj način može se procijeniti strujanje (stopa ispiranja) nakon dužih perioda izlaganja.

Količina emisija može se upotrijebiti za procjenu rizika za životnu sredinu tretiranog drveta.

2. POČETNA RAZMATRANJA

Ne pretpostavlja se da su karakter i težina mehanizma ispiranja površine drveta slatkom vodom jednaki ispiranju površine drveta morskom vodom. Stoga je za tretiranje drveta zaštitnim proizvodima ili smješama za upotrebu u morskoj vodi potrebna studija ispiranja drveta za morsku vodu.

Drvo tretirano zaštitnim sredstvima trebalo bi da predstavlja drvo u komercijalnoj upotrebi. Drvo je potrebno tretirati u skladu s uputstvima proizvođača o zaštitnim sredstvima i odgovarajućim standardima i specifikacijama. Prije početka ispitivanja potrebno je navesti parametre o kondicioniranju drveta nakon tretiranja.

Upotrijebljeni uzorci drveta trebalo bi da predstavljaju upotrijebljene proizvode (na primjer u smislu vrste, gustine i ostalih svojstava).

Drvo ili tretirano drvo, čija se površina obavezno mora dodatno tretirati (na primjer bojom koja se nanosi zbog zahtjeva za komercijalnu upotrebu), može se ispitivati postupkom penetracije ili površinskog nanošenja.

Sastav, količina, pH-vrijednost i fizički oblik vode važni su pri utvrĐivanju kvaliteta, sadržaja i prirode emisija iz drveta.

3. NAČELO ISPITNE METODE

Primjerci drveta tretiranog zaštitnim sredstvima prastvaraju se u vodu. Voda (emisat) se prikuplja i hemijski analizira više puta tokom perioda izlaganja, što je dovoljno za izradu statističkih proračuna. Stope emisije u mg/m^2/dan iizračunavaju se iz rezultata analize. Potrebno je evidentirati periode uzorkovanja. Ispitivanja na netretiranim uzorcima mogu se prekinuti ako se u prve tri tačke podataka ne otkrije pozadina.

Zahvaljujući uključivanju primjeraka netretiranog drveta moguće je odrediti prirodne nivoe emisata iz drveta za koji nijesu upotrijebljena zaštitna sredstva.

4. KRITERIJUMI KVALITETA

4.1. Tačnost

Tačnost ispitne metode za procjenu emisija zavisi od ispitnih primjeraka koji predstavljaju drvo tretirano komercijalnim sredstvima, mjeri u kojoj voda predstavlja stvarnu vodu i mjeri u kojoj režim izlaganja predstavlja prirodne uslove.

Tačnost, preciznost i ponovljivost analitičke metode potrebno je odrediti prije sprovođenja ispitivanja.

4.2. Mjerna reproduktivnost

Tri uzorka vode prikupljaju se i analiziraju i kao vrijednost emisije uzima se srednja vrijednost. Mjerna reproduktivnost rezultata unutar laboratorijae i između različitih laboratorijaa zavisi od režima prastvaranja i drvima koja su upotrijebljena kao ispitni primjerci.

4.3. Prihvatljivi opseg rezultata

Prihvatljivi opseg rezultata ovog ispitivanja je onaj u kojem se gornje i donje vrijednosti razlikuju manje od jednog reda veličine.

5. USLOVI ISPITIVANJA

5.1. Voda

Scenarijumi ispiranja slatkom vodom: preporučuje se upotreba dejonizovane vode (na primjer ASTM D 1193 vrsta II) za ispitivanje ispiranja radi ocjene drveta izloženog slatkoj vodi. Temperatura vode iznosi 20 °C +/– 2 °C, a izmjerena pH-vrijednost i temperatura vode navedene su u izvještaju o ispitivanju. Zahvaljujući analizi uzoraka vode uzetih prije prastvaranja tretiranih primjeraka moguća je procjena analiziranih hemikalija u vodi. Riječ je o kontroli radi utvrĐivanja prirodnih nivoa hemikalija koje se zatim hemijski analiziraju.

Scenarijumi ispiranja morskom vodom: preporučuje se upotreba sintetičke morske vode (na primjer ASTM D 1141 zamjenska voda iz okeana, bez teških metala) za ispitivanje ispiranja radi ocjene drveta izloženog morskoj vodi. Temperatura vode iznosi 20 °C +/– 2 °C, a izmjerena pHvrijednost i temperatura vode navedene su u izvještaju o ispitivanju. Zahvaljujući analizi uzoraka vode uzetih prije prastvaranja tretiranih primjeraka moguća je procjena analiziranih hemikalija u vodi. Riječ je o kontroli za analizu prirodnih nivoa važnih hemikalija.

5.2. Ispitni primjerci drveta

Primjerci drveta trebalo bi da budu tipični primjerci drveta koje se upotrebljava za ispitivanje efikasnosti zaštitnih sredstava za drvo. Preporučene su vrste *Pinus sylvestris L.* (obični bor), *Pinus resinosa Ait.* (američki crveni bor) ili *Pinus spp* (bor). Dodatna ispitivanja moguće je ssprovesti na drugim vrstama.

Potrebno je upotrijebiti drvo ravnih godova i bez čvorova. Potrebno je izbjegavati materijal s izgledom smole. Drvo bi trebalo da bude tipičan primjerak komercijalno dostupnog drveta. Potrebno je evidentirati izvor, gustinu i broj godova na 10 mm.

Preporučuje se da ispitni primjerci drveta budu u skladu sa standardom EN 113 kompleti od pet blokova veličine 25 mm × 50 mm × 15 mm s uzdužnim pločama paralelnim s godovima, iako se mogu upotrijebiti i ostale dimenzije poput 50 mm × 150 mm × 10 mm. Ispitni primjerak trebalo bi u potpunosti da bude potpoljen u vodu. Ispitni primjerci sastoje se od 100 %-tne sapanovine. Svaki primjerak jedinstveno se obilježava radi identifikacije tokom ispitivanja.

Ispitne primjerke potrebno je izblanjati ili direktnati, a površine nije potrebno brusiti.

Broj kompleta ispitnih primjeraka drveta radi analize iznosi najmanje pet: tri kompleta primjeraka tretiraju se zaštitnim sredstvima, jedan komplet se ne tretira, dok jedan komplet služi za procjenu sadržaja vlage u pećnici sušenih ispitnih primjeraka prije tretiranja. Priprema se dovoljno ispitnih primjeraka radi izbora tri kompleta uzoraka koji su unutar 5 % srednje vrijednosti zadržavanja zaštitnih sredstava grupe ispitnih primjeraka.

Svi ispitni primjerci završno se zapečate hemikalijom koja sprečava penetraciju zaštitnog sredstva u krajnje godove primjeraka ili ispiranje s krajnjih godova primjeraka. Potrebno je razlikovati primjerke za postupke površinskog nanošenja i penetracije radi nanošenja završnog zaptivača. Završni zaptivač treba nanijeti prije tretiranja samo u slučaju površinskog nanošenja.

Krajnji god treba da bude otvoren za tretiranje postupkom penetracije. Stoga primjerci moraju biti završno zapečaćeni na kraju perioda kondicioniranja. Emisiju je potrebno procijeniti samo za uzdužnu površinu. Zaptivače je potrebno provjeriti i ponovo nanijeti prije početka ispiranja i nakon toga ih nije potrebno ponovno nanositi.

5.3. Posuda za prastvaranje

Posuda je izraĐena od inertnog materijala i dovoljno je velika za prastvaranje pet primjeraka drveta u skladu sa standardom EN113 u 500 ml vode zbog čega odnos površine i zapremine vode iznosi 0,4 cm2/ml.

5.4. Sklop za ispitivanje primjeraka

Ispitni primjerci nalaze se na sklopu na kojem sve izložene površine primjerka mogu biti u kontaktu s vodom.

6. POSTUPAK TRETIRANJA ZAŠTITNIM SREDSTVIMA

6.1. Priprema tretiranih ispitnih primjeraka

Ispitni primjerak drveta koji je potrebno tretirati ispitivanim zaštitnim sredstvom tretira se metodom navedenom za to zaštitno sredstvo koja može uključivati postupak penetracije ili površinskog nanošenja prastvaranjem, raspršivanjem ili četkicom.

6.1.1. Zaštitna sredstva koja je potrebno nanijeti postupkom penetracije

Potrebno je pripremiti rastvor zaštitnog sredstva kojim će se postići utvrĐena apsorpcija ili zadržavanje u postupku penetracije. Ispitni primjerak drveta izvaga se i mjeri. Postupak penetracije trebalo bi da bude u skladu s postupkom za nanošenje zaštitnog sredstva na drvo za upotrebu u klasi upotrebe 4 ili 5. Primjerak se ponovo izvaga nakon tretiranja, a zadržavanje zaštitnog sredstva (kg/m3) računa se formulom:

$$\frac{Masa\ nakon\ tretiranja\ \ kg\ \ -masa\ prije\ tretiranja\ (kg)}{Zapremina\ ispitnog\ primjerka\ (m^3)}\ x\ \frac{koncentracija\ rastvora\ (\%\ mase/masa)}{100}$$

Obratiti pažnju da se u ovom ispitivanju može upotrijebiti drvo tretirano u postrojenjima za industrijsku preradu (na primjer vakuumskom impregnacijom). Primijenjene postupke potrebno je zabilježiti, a zadržavanje materijala tretiranog na ovaj način analizirati i zabilježiti.

6.1.2. Zaštitna sredstva koja je potrebno nanijeti pokolonama površinskog nanošenja

Postupak površinskog nanošenja uključuje prastvaranje, raspršivanje ili bojenje četkicom ispitnih primjeraka drveta. Postupak i količina nanošenja (na primjer litar/m^2) trebalo bi da budu u skladu s postupkom i količinom nanošenja za površinsko nanošenje zaštitnog sredstva.

I u ovom slučaju obratiti pažnju da se u ovom ispitivanju može upotrijebiti drvo tretirano u postrojenjima za industrijsku preradu. Primijenjene postupke potrebno je zabilježiti, a zadržavanje materijala tretiranog na ovaj način analizirati i zabilježiti.

6.2. Kondicioniranje ispitnih primjeraka nakon ispitivanja

Tretirane ispitne primjerke potrebno je nakon tretiranja kondicionirati u skladu s preporukama dobavljača ispitivanog zaštitnog sredstva prema zahtjevima za pakovanje zaštitnog sredstva ili u skladu s komercijalnim praksama tretiranja ili standardom EN 252.

6.3. Priprema i izbor ispitnih primjeraka

Srednje zadržavanje grupe ispitnih primjeraka iizračunava se poslije kondicioniranja nakon tretiranja i za mjerenja ispiranja nasumično se biraju tri reprezentativna kompleta primjeraka sa zadržavanjem unutar 5 % srednje vrijednosti grupe.

7. POSTUPAK MJERENJA EMISIJE ZAŠTITNIH SREDSTAVA

7.1. Metoda prastvaranja

Ispitni primjerci odmjeravaju se i zatim u potpunosti prastvaraju u vodu uz bilježenje datuma i vremena. Posuda je pokrivena radi smanjivanja isparavanja.

Voda se mijenja u sljedećim intervalima: nakon šest sati, jednog dana, dva dana, četiri dana, osam dana, 15 dana, 22 dana, 29 dana (napomena: riječ je o ukupnom trajanju, a ne o trajanju intervala). Potrebno je evidentirati vrijeme i datum izmjene vode i masu vode izvaĐenu iz posude.

Nakon svake izmjene vode uzorak vode u koju je bio potopljen komplet ispitnih primjeraka zadržava se za naknadnu hemijsku analizu.

Zahvaljujući postupku uzorkovanja moguće je iizračunavanje profila količine emisija tokom vremena. Uzorke je potrebno čuvati u uslovima za očuvanje predmeta analize, na primjer na tamnom mjestu u frižideru kako bi se smanjio rast mikroba u uzorku prije analize.

MJERENJA EMISIJE

8.1. Tretirani uzorci

Prikupljena voda se po potrebi hemijski analizira na aktivne supstance i/ili relevantne produkte degradacije/transformacije.

8.2. Netretirani uzorci

Zahvaljujući prikupljanju vode (emisata) u ovom sistemu i naknadnoj analizi hemikalija koje su isprane s netretiranih uzoraka drveta moguća je procjena moguće stope emisije zaštitnog sredstva s netretiranog drveta. Zahvaljujući prikupljanju i analizi emisata nakon dužih perioda izlaganja moguća je procjena stope promjene stope emisije tokom vremena. Ta analiza je kontrolni postupak za utvrĐivanje prirodnih nivoa ispitivane hemikalije u netretiranom drvetu kako bi se potvrdilo da drvo upotrijebljeno kao izvor uzoraka nije prethodno tretirano zaštitnim sredstvom.

9. PODACI I IZVJEŠTAVANJE

9.1. Hemijske analize

Prikupljena voda hemijski se analizira, a njen rezultat navodi se u odgovarajućim jedinicama, na primjer u µg/l.

9.2. Dostavljanje podataka

Svi rezultati se evidentiraju. U dodatku je naveden primjer predloženog obrasca za evidenciju za jedan komplet tretiranih ispitnih primjeraka i tabela sa rezimeom za iizračunavanje srednjih vrijednosti emisije tokom svakog intervala uzorkovanja.

Dnevno strujanje emisije u mg/m^2/dan iizračunava se uzimanjem tri izmjerene vrijednosti iz tri ponavljanja i dijeljenjem s brojem dana prastvaranja.

9.3. Izvještaj o ispitivanju

U izvještaju o ispitivanju navode se najmanje sljedeće informacije:

- naziv dobavljača ispitivanog zaštitnog sredstva,
- poseban ili jedinstven naziv ili oznaka ispitivanog zaštitnog sredstva, komercijalan
- ili uobičajen naziv aktivnih sastojaka uz generički opis pomoćnih supstanci

(na primjer pomoćnog rastvarača, smole) i sastav sastojaka u % m/m, – relevantno zadržavanje ili opterećenje (u kg/m^3, odnosno l/m^2) za drvo koje se upotrebljava u kontaktu s vodom,

- vrste upotrijebljenog drveta, uključujući njegovu gustinu i stopu rasta u godovima na 10 mm, – opterećenje ili zadržavanje ispitivanog zaštitnog sredstva i formula za iizračunavanje zadržavanja izraženog u l/m^2 ili kg/m^3,
- metoda nanošenja zaštitnog sredstva uz navoĐenje rasporeda tretiranja u postupku penetracije i metoda nanošenja u slučaju površinskog tretiranja,
- datum nanošenja zaštitnog sredstva i procjena sadržaja vlage ispitnih primjeraka izražena u procentu,
- primijenjeni postupci kondicioniranja uz navoĐenje vrste, uslova i trajanja, podaci
- o vrsti i broju nanošenja završnog zaptivača,
- podaci o svim naknadnim tretiranjima drveta, na primjer podaci o dobavljaču, vrsti, svojstvima i količini boje,
- vrijeme i datum svakog prastvaranja, količina vode u koju su prastvoreni svi ispitni primjerci pri svakom prastvaranju i količina vode koju je drvo apsorbovalo tokom prastvaranja,
- sva odstepena od opisane metode i svi faktori koji su mogli uticati na rezultate.

Dodatak 1

Obrazac za evidenciju za ispitnu metodu Procjena emisija u životnu sredinu iz drveta tretiranog zaštitnim sredstvima: laboratorijaska metoda za proizvode od drveta koji nijesu prastvoreni i koji su u kontaktu sa slatkom ili morskom vodom

Ispitna ustanova	

Sredstvo za zaštitu drveta	
Dobavljač zaštitnog sredstva	
Poseban ili jedinstveni naziv ili oznaka zaštitnog sredstva	
Komercijalan ili uobičajen naziv zaštitnog sredstva	
Pomoćne supstance	
Relevantno zadržavanje za drvo koje se upotrebljava u kontaktu s vodom	
Nanošenje	
Metoda nanošenja	
Datum nanošenja	
Formula za iizračunavanje zadržavanja:	
Postupak kondicioniranja	
Trajanje kondicioniranja	
Završni zaptivač / broj nanošenja	
Naknadno tretiranje	po potrebi
Ispitni primjerci	
Vrste drveta	
Gustina drveta	(najmanja … srednja vrijednost … najveća)
Stopa rasta (broj godova na 10 mm)	(najmanja … srednja vrijednost … najveća)
Sadržaj vlage	
Sklopovi za ispitivanje[77]	**Zadržavanje (na primjer u kg/m3)**
Tretirani „x—	Srednja vrijednost i standardno odstepene ili raspon od pet primjeraka
Tretirani „y—	Srednja vrijednost i standardno odstepene ili raspon od pet primjeraka
Tretirani „z—	Srednja vrijednost i standardno odstepene ili raspon od pet primjeraka
Netretirani	
Varijacija parametara ispitne metode	Na primjer kvalitet vode, dimenzija ispitnih primjeraka itd.

Vrijeme	Izmjena vode	Masa primjerka		Apsorpcija vode		Uzorak vode				
		Tretirani (srednja vrijednost)	Netretirani	Tretirani (srednja vrijednost)	Netretirani		Ispitna voda	x	y	z

[77] x, y, z su tri paralelna uzorka

	Datum	g	g	g	g	br.	pH-vrijednost	pH-vrijednost	pH-vrijednost	pH-vrijednost
početak										
šest sati						1				
24 sata						2				
dva dana						3				
četiri dana						4				
osam dana						5				
15 dana						6				
22 dana						7				
29 dana						8				

Za svaki aktivni sastojak popunite zasebnu tabelu

Vrijeme	Izmjena vode	Rezultati analize															
		Netretirani primjerci			Tretirani primjerci												
		Koncentracija aktivnog sastojka u vodi	Emitirana količina mg/m2	Stopa emisije mg/m^2/dan	Koncentracija aktivnog sastojka u vodi				Emitovana količina				Stopa emisije			
	Datum				x	y	z	Srednja vrijednost	x	y	z	Srednja vrijednost	x	y	z	Srednja vrijednost
					mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m2	mg/m2	mg/m2	mg/m^2	mg/m^2/dan	mg/m^2/dan	mg/m^2/dan	mg/m^2/dan
šest sati																
24 sata																
dva dana																
četiri dana																
osam dana																
15 dana																
22 dana																
29 dana																

Napomena: S obzirom na mogućnost upotrebe rezultata netretiranih uzoraka za ispravku stopa emisije tretiranih uzoraka, prvo je potrebno navesti rezultate netretiranih uzoraka, a

sve vrijednosti tretiranih uzoraka trebalo bi da budu „ispravljene vrijednosti—. Moguća je i ispravka za analizu početne vode.

C.46. BIOAKUMULACIJA U BENTIČKIM OLIGOHETAMA IZ SEDIMENTA

1. UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici za ispitivanje OECD (TG) 315 (2008), Endobentičke životinje koje konzumiraju sediment mogu biti izložene supstancama povezanim sa sedimentom. MeĐu tim konzumentima sedimenta vodeni maločekinjasti crvi (oligohete) imaju važnu ulogu na dnu vodenih sistema. Žive u sedimentu i često predstavljaju najbrojniju vrstu, naročito u staništima u kojima su uslovi životne sredine štetni za ostale životinje. Bioturbacijom sedimenta i time što služe kao plijen ove životinje mogu snažno uticati na biorapoloživost takvih supstanci ostalim organizmima, na primjer bentivornim ribama. Za razliku od epibentičkih organizama, endobentičke vodene oligohete kopaju po sedimentu i konzumiraju čestice sedimenta ispod površine sedimenta. Zbog toga su ovi organizmi izloženi supstancama brojnim ostalim načinima unošenja, uključujući direktni kontakt, konzumiranje kontaminiranih čestica sedimenta, pornu vodu i vodu iznad sedimenta. Neke vrste bentičkih oligoheta koje se trenutno upotrebljavaju u ekotoksikološkim ispitivanjima opisane su u Dodatku 6.

Parametri koji karakterišu bioakumulaciju supstanci prvo obuhvataju faktor bioakumulacije (BAF), konstantu brzine apsorpcije sedimenta (ks) i konstantu brzine eliminacije (ke). Detaljne definicije tih parametara navedene su u Dodatku 1.

Da bi se ocijenio bioakumulacioni potencijal supstanci generalno i da bi se istražila bioakumulacija supstanci koje se obično dijele u ili na sedimentima, potrebna je ispitna metoda specifična za ovaj odjeljak (1)(2)(3)(4).

Ova ispitna metoda namijenjena je za procjenu bioakumulacije supstanci povezanih sa sedimentom u endobentičkim oligohetnim crvima. Ispitivana supstanca se postupkom spajkinga dodaje u sediment. Sediment obogaćen u postupku spajkinga upotrebljava se u cilju simulacije kontaminiranog sedimenta.

Ova metoda zasniva se na postojećim metodama ispitivanja toksičnosti sedimenta i bioakumulacije. Ostali korisni dokumenti su: rasprave i rezultati meĐunarodne radionice i rezultat meĐunarodnog prstenastog ispitivanja.

Ovaj test primjenjuje na stabilne, neutralne organske supstance koje se obično vežu za sedimente. Ovom metodom može se mjeriti i bioakumulacija stabilnih metaloorganskih jedinjenja koji se vežu za sediment. Bez izmjene plana ispitivanja u pogledu zapremine supstrata i vode i možda veličine tkiva uzorka metoda nije primjenjiva na metale i ostale elemente u tragovima.

2. PREDUSLOVI I INFORMACIJE O ISPITIVANOJ SUPSTANCI

7. Postoji samo nekoliko dobro poznatih kvantitativnih odnosa strukture i aktivnosti (QSAR) o procesima bioakumulacije koji su trenutno dostupni (14). Najčešće upotrebljavani odnos je

korelacija između bioakumulacije i biokoncentracije stabilnih organskih supstanci i njihove lipofilnosti (izražena kao logaritam koeficijenta raspodjele oktanol/voda (log K_{ow}); v. Dodatak 1 za definiciju) koja je razvijena radi opisa podjele supstanci između vode i riba. Pomoću ovog odnosa utvrđene su i korelacije za odjeljke sedimenta (15)(16)(17)(18). Korelacija log K_{ow}-log

BCF kao najvažniji QSAR može pomoći u prvoj preliminarnoj procjeni potencijala bioakumulacije supstanci koje se vežu za sediment. Međutiim, na BAF može uticati sadržaj lipida ispitivanog organizma i sadržaj organskog ugljenika sedimenta. Stoga se koeficijent raspodjele organski ugljenik-voda (K_{oc}) može upotrebljavati i kao najvažniji determinant bioakumulacije organskih supstanci koje se vežu za sediment.

Ovo ispitivanje primjenjuje se na:

- stabilne organske supstance čije su log K_{ow} vrijednosti između 3,0 i 6,0 (5)(19) i na superlipofiličke supstance s vrijednostima log K_{ow} većim od 6,0 (5);
- supstance koje pripadaju klasau organskih supstanci poznatih po svom bioakumulacionom potencijalu u živim organizmima, na primjer surfaktantima ili jako adsorptivnim supstancama (na primjer visok K_{oc}).

Prije početka istraživanja potrebno je prikupiti informacije o ispitivanoj supstanci, poput mjera opreza, ispravnih uslova skladištenja i stabilnosti i analitičkim metodama. Smjernice za ispitivanje supstanci čija fizičko-hemijska svojstva otežavaju ispitivanje nalaze se u literaturi pod. Prije sprovođenja ispitivanja bioakumulacije s vodenim oligohetima trebalo bi da budu poznate sljedeće informacije o ispitivanoj supstanci:

- opšti naziv, hemijski naziv (po mogućnosti IUPAC naziv), strukturna formula, CAS registarski broj, čistoća;
- rastvorljivost u vodi [ispitna metoda A.6. (22)];
- koeficijent raspodjele oktanol-voda, K_{ow} [ispitne metode A.8, A.24 (22)];
- koeficijent raspodjele sediment-voda, izražen kao K_d ili K_{oc} [ispitna metoda
- C.19 (22)]; hidroliza [ispitna metoda C.7 (22)]; fototransformacija u vodi (23);
- napon pare [ispitna metoda A.4 (22)]; laka biorazgradivost [ispitne metode C.4 i
- C.29 (22)]; površinska napon [ispitna metoda A.5 (22)]; kritična micelarna
- koncentracija (24).
-
- Pored toga, sljedeće informacije, ako su dostupne,– bi bile važne:
- biorazgradnja u vodenoj sredini [ispitne metode C.24. i C.25. (22)]; Henrijeva
- konstanta.

Radioaktivno obilježene ispitivane supstance mogu olakšati analizu uzoraka vode, sedimenta i bioloških uzoraka i mogu se upotrijebiti u definisanju potrebe za identifikacijom i kvantifikacijom produkata razgradnje. Ovdje opisana metoda potvrđena je međunarodnim prstenastim ispitivanjem (12) za supstance obilježene s ^{14}C. Ako se mjere ukupni radioaktivni rezidijumi, faktor bioakumulacije (BAF) zasniva se na matičnoj supstanci, uključujući sve zadržane produkte razgradnje. Analizom i kvantifikacijom procenta matične supstance i njenih produkata razgradnje u uzorcima uzetim na kraju faze apsorpcije ili na vrhuncu bioakumulacije mogu se kombinovati istraživanje metabolizma i istraživanje bioakumulacije. U svakom slučaju preporučuje se da se proračun BAF zasniva na koncentraciji matične supstance u organizmima, a ne samo na ukupnim radioaktivnim rezidijumima.

Uz svojstva ispitivane supstance, ostale potrebne informacije su toksičnost za vrste oligoheta koje će biti upotrijebljene u ispitivanju, poput srednje smrtonosne koncentracije (LC_{50}) za vrijeme potrebno za fazu apsorpcije, kako bi se obezbijedile koncentracije izlaganja koje su mnogo niže od toksičnih nivoa. Ako su dostupne, prednost je potrebno dati vrijednostima toksičnosti dobijenim u dugotrajnim studijama o subletalnim parametrima praćenja (EC_{50}). Ako takvi podaci nijesu poznati, korisne informacije mogu se dobiti ispitivanjem akutne toksičnosti u uslovima koji su identični uslovima ispitivanja bioakumulacije ili iz podataka o toksičnosti ostalih surogatnih vrsta.

Mora biti dostupna odgovarajuća analitička metoda poznate tačnosti, preciznosti i osjetljivosti na kvantifikaciju supstanci u ispitnim rastvorima, u sedimentu i u biološkom materijalu, s pojedinostima o pripremi i skladištenju uzoraka kao i bezbjednosno-tehničkim listovima za materijale. Potrebno je poznavati i analitičke granice detekcije ispitivane supstance u vodi, sedimentu i u tkivu crva. Ako se upotrebljava radioaktivno obilježena ispitivana supstanca, moraju se znati i specifična radioaktivnost (na primjer Bq mol– 1), položaj radioaktivno obilježenih atoma i procenat radioaktivnosti povezan s nečistoćama. Specifična radioaktivnost ispitivane supstance trebalo bi da bude što veća kako bi se utvrdile što niže ispitivane koncentracije.

Trebalo bi da budu dostupne informacije o svojstvima sedimenta koji će se upotrijebiti (na primjer porijeklo sedimenta ili njegovih sastojaka, pH-vrijednost i koncentracija amonijaka porne vode (terenski sedimenti), sadržaj organskog ugljenika (TOC), distribucija veličine čestica (procenat pijeska, prašine i gline) i procenat suve mase) (6).

3. NAČELO ISPITIVANJA

Ispitivanje se sastoji od dvije faze: faze apsorpcije (faze izlaganja) i faze eliminacije (faze nakon izlaganja). Tokom faze apsorpcije crvi su izloženi sedimentu u koji je postupkom spajkinga dodata ispitivana supstanca, koji je preliven obrađenom vodom i uravnotežen po potrebi (11). Grupe kontrolnih crva drže se u istim uslovima, bez ispitivane supstance.

Za fazu eliminacije crvi se prenose u sistem sediment-voda u kojem nema ispitivane supstance. Faza eliminacije je neophodna kako bi se dobile informacije o brzini kojom ispitni organizmi izlučuju ispitivanu supstancu (19)(25). Faza eliminacije uvijek je potrebna, osim ukoliko apsorpcija ispitivane supstance tokom faze izlaganja nije bila neznatna (na primjer nema statističke razlike između koncentracije ispitivane supstance kod ispitnih i kontrolnih crva). Ako se tokom faze apsorpcije ne postigne stabilno stanje, rezultati faze eliminacije mogu se upotrijebiti za određivanje kinetičke – BAFk konstante i konstante brzine apsorpcije i eliminacije. Promjena koncentracije ispitivane supstance u/na crvima prati se tokom obje faze ispitivanja.

Tokom faze apsorpcije mjerenja se vrše dok BAF ne postigne plato ili stabilno stanje. Prema zadatim postavkama faza apsorpcije trebalo bi da traje 28 dana. Praktična iskustva pokazala su da je faza apsorpcije u trajanju od 12 do 14 dana dovoljna da nekoliko stabilnih, neutralnih organskih supstanci postigne stabilno stanje (6)(8)(9).

Međutiim, ako se u roku od 28 dana ne postigne stabilno stanje, prenosom izloženih oligoheta u posude koje sadrže isti medijumum bez ispitivane supstance pokreće se faza eliminacije. Faza eliminacije završava ili kada se postigne 10 % nivoa koncentracije izmjerene u crvima 28. dana faze apsorpcije ili nakon maksimalnog trajanja od deset dana. Kao dodatni parametar praćenja, odnosno kao neeliminisani ostaci (NER), navodi se nivo

ostataka u crvima na kraju faze eliminacije. Faktor bioakumulacije (BAF_{ss}) po mogućnosti se iizračunava i kao odnos koncentracije u crvima (C_a) i u sedimentu (C_s) u očigledno stabilnom stanju i kao faktor kinetičke bioakumulacije, BAF_K, kao odnos konstante brzine apsorpcije iz sedimenta (k_s) i konstante brzine eliminacije (k_e) pod pretpostavkom kinetike prvog reda. Ako se u roku od 28 dana ne postigne stabilno stanje, izračunajte BAF_K iz konstanti brzine apsorpcije i brzine eliminacije. V.

Dodatak 2 za proračun. Ako se ne može primijeniti kinetika prvog reda, potrebno je primijeniti složenije modele (Dodatak 2 i referenca (25)).

Ako se stabilno stanje ne postigne u roku od 28 dana, faza apsorpcije može se opciono produžiti podvrgavanjem grupa izloženih crva, ako ih ima, daljim mjerenjima dok se ne postigne stabilno stanje. Istovremeno, faza eliminacije trebalo bi, nezavisno od svega, da započne 28. dana faze apsorpcije.

Konstanta brzine apsorpcije, konstanta (ili konstante, kada su obuhvaćeni složeniji modeli) brzine eliminacije, faktor kinetičke bioakumulacije (BAF_K) i, kada je to moguće, granice pouzdanosti svih tih parametara iizračunavaju se iz jednačina kompjuterizovanog modela (v. Dodatak 2 za modele). Ispravnost usklađenosti bilo kojeg modela može se odrediti iz koeficijenta korelacije ili koeficijenta određivanja (koeficijenti blizu jedinice znak su dobre usklađenosti).

Da bi se smanjila varijabilnost rezultata ispitivanja za organske supstance visoke lipofilnosti, faktore bioakumulacije potrebno je dodatno izraziti u odnosu na sadržaj lipida ispitivanih organizama i na sadržaj organskog ugljenika (TOC) u sedimentu (faktor akumulacije biotasediment ili BSAF kg sedimenta TOC kg– 1 sadržaja lipida u crvima). Ovaj pristup zasniva se na iskustvima i teoretskim korelacijama za vodeni odjeljak kada za neke hemijske klase postoji jasna veza između potencijala supstance za bioakumulaciju i njene lipofilnosti, koja je dobro poznata za ribe kao organizme modele (14)(25)(27). Postoji i veza između sadržaja lipida u ispitivanim ribama i opažene bioakumulacije takvih supstanci. Slične korelacije utvrđene su i za bentičke organizme (15)(16)(17)(18). Ako je na rapolaganju dovoljno tkiva crva, sadržaj lipida ispitnih životinja može se odrediti na istom biološkom materijalu upotrijebljenom za određivanje koncentracije ispitivane supstance. Međutiim, praktično je upotrebljavati aklimatizovane kontrolne životinje makar na početku ili po mogućnosti na kraju faze apsorpcije za mjerenje sadržaja lipida, što se zatim može iskoristiti za normalizaciju vrijednosti BA_a.

4. VALJANOST ISPITIVANJA

Da bi ispitivanje bilo valjano, treba ispuniti sljedeće uslove:

- Kumulativna smrtnost crva (kontrolnih i ispitnih) do kraja ispitivanja ne bi trebalo da prelazi 20 % od početnog broja.
- Pored toga, potrebno je dokazati da crvi kopaju po sedimentu kako bi omogućili maksimalno izlaganje. V. stav 28 za detalje.

5. OPIS METODE

5.1. Ispitne vrste

Nekoliko vrsta vodenih oligoheta može se upotrijebiti za ispitivanje. Najčešće upotrebljavane vrste navedene su u Dodatku 6.

Testove toksičnosti (96 sati, samo u vodi) potrebno je sprovoditi u redovnim intrevalima (na primjer svakog mjeseca) s referentnom toksičnom supstancom, poput kalijum hlorida (KCl) ili bakar sulfata ($CuSO_4$) (1) radi dokazivanja zdravstvenih stanja ispitnih životinja (1) (6). Ako se referentni testovi toksičnosti ne sprovode u redovnim intervalima, potrebno je provjeriti seriju organizama koja će se upotrebljavati u ispitivanju bioakumulacije sedimenta pomoću referentne toksične supstance. I mjerenje sadržaja lipida može pružiti korisne informacije o stanju životinja.

5.1.1. Kultura ispitnih organizama

Kako bi se obezbijedio dovoljan broj crva za sprovođenje ispitivanja bioakumulacije, crvi se mogu čuvati u trajnoj laboratorijaskoj kulturi jedne vrste. Metode laboratorijaske kulture za odabrane ispitne vrste sumirane su u Dodatku 6.

5.2. Aparatura

Potrebno je voditi računa o tome da se za sve djelove opreme izbjegava upotreba materijala koji mogu rastvoriti, apsorbovati ispitivane supstance ili propuštati ostale supstance i koji imaju negativno dejstvo na ispitne životinje. Standardne pravougaone ili cilindrične posude od hemijski inertnog materijala odgovarajuće zapremine mogu se upotrebljavati u skladu s brzinom punjenja, odnosno brojem ispitnih crva. Potrebno je izbjegavati upotrebu mekih plastičnih cijevi za davanje vode ili vazduha. Za svu opremu koja dolazi u kontakt s ispitnim medijumumom potrebno je upotrebljavati politetrafluoroetilen, nerĐajući čelik /ili staklo. Za supstance s visokim koeficijentima apsorpcije, kao što su sintetički piretroidi, možda će biti potrebno silanizovano staklo. U tim situacijama oprema će se morati baciti nakon upotrebe (5). Kad je riječ o radioaktivno obilježenim ispitivanim supstancama i isparljivim supstancama, potrebno je voditi računa o tome da se izbjegne stripovanje i oslobaĐanje stripovane ispitivane supstance. Potrebno je upotrebljavati zamke (na primjer staklene posude za pranje gasova) koje sadrže odgovarajuće apsorbente kako bi se zadržali svi ostaci koji isparavaju iz ispitnih posuda (11).

5.3. Voda

Kvalitet vode iznad sedimenta mora omogućavati preživljavanje ispitne vrste tokom perioda aklimatizacije i ispitivanja bez pojave anomalija u izgledu i ponašanju riba. U skladu s ispitnom metodom C.1 (25) u ispitivanjima kao i u laboratorijaskim kulturama crva preporučuje se upotreba obraĐene vode kao vode iznad sedimenta. Dokazano je da nekoliko ispitnih vrsta u toj vodi (8) može preživjeti, rasti i razmnožavati se pa je omogućena maksimalna standardizacija uslova ispitivanja i kulture. Potrebno je zabilježiti najmanje pH-vrijednost, provodljivost i tvrdoću vode. Analiza vode na zagaĐujuće mikrosupstance prije upotrebe mogla bi da pruži korisne informacije.

Tokom perioda ispitivanja voda bi trebalo da bude konstantnog kvaliteta. pH-vrijednost vode iznad sedimenta trebalo bi da bude između šest i devet. Ukupna tvrdoća na početku ispitivanja trebalo bi da bude između 90 i 400 mg $CaCO_3$ po litru (7). Rasponi za pH-vrijednost i tvrdoću u toj obraĐenoj vodi navedeni su u ispitnoj metodi C.1 (25). Ako se sumnja u postojanje interakcije između jona tvrdoće i ispitivane supstance, potrebno je upotrebljavati vodu manje tvrdoće. U

Dodatku 4 sažeti su dodatni kriterijumi prihvatljive vode za razblaživanje u skladu sa Smjernicom za ispitivanje OECD TG 210 (34).

5.4. Sediment

Kvalitet sedimenta mora omogućiti preživljavanje i, po mogućnosti, razmnožavanje ispitnih organizama tokom trajanja aklimatizacije i perioda ispitivanja, a da tom prilikom oni ne pokazuju nikakav neuobičajeni izgled ili ponašanje. Crvi bi trebalo da kopaju po sedimentu. Ponašanje pri kopanju može uticati na izlaganje i, posljedično, na BAF. Stoga je, kada zamućenost vode iznad sedimenta dozvoljava takva posmatranja, potrebno zabilježiti izbjegavanje sedimenta ili ponašanje pri kopanju ispitnih organizama. Crvi (kontrolni i ispitni) bi trebalo da kopaju po sedimentu u periodu od 24 sata nakon dodavanja u ispitne posude. Ako se uoči trajno nekopanje ili izbjegavanje sedimenta (na primjer više od 20 % tokom više od polovine trajanja faze apsorpcije), to je znak da ili uslovi ispitivanja nijesu odgovarajući ili ispitni organizmi nijesu zdravi, ili da koncentracija ispitivane supstance izaziva takvo ponašanje. U takvom slučaju ispitivanje bi bilo potrebno prekinuti i ponoviti pri poboljšanim uslovima. Dodatne informacije o konzumiranju sedimenta mogu se dobiti primjenom metoda opisanih pod (35) (36) u kojima se navodi konzumiranje sedimenta ili izbor čestica u ispitnim organizmima. Ako su vidljive, potrebno je zabilježiti najmanje prisutnost ili odsutnost fekalnih peleta na površini sedimenta koji ukazuju na to da crvi konzumiraju sediment i navedeno je potrebno razmotriti pri tumačenju rezultata ispitivanja u smislu puteva izloženosti.

Za upotrebu i u ispitivanim i u laboratorijaskim kulturama crva preporučuje se vještački sediment na osnovu vještačkog tla opisanog u ispitnoj metodi C.8 (40) (Dodatak 5) jer prirodni sedimenti odgovarajućeg kvaliteta možda neće biti dostupni tokom cijele godine. Pored toga, na ispitivanje mogu uticati prirodni organizmi kao i moguće prisustvo zagaĐujućih mikrosupstanci u prirodnim sedimentima. Nekoliko ispitnih vrsta može preživjeti, rasti i razmnožavati se u vještačkom sedimentu (8).

Za vještački sediment potrebno je zabilježiti najmanje porijeklo sastojaka, distribuciju veličine zrna (procenat pijeska, prašine i gline), sadržaj organskog ugljenika (TOC), sadržaj vode i pHvrijednost. Mjerenje redoks-potencijala je opciono. Međutiim, prirodni sedimenti s nezagaĐenih mjesta mogu poslužiti kao ispitni sediment i/ili sediment kulture (1). Za prirodne sedimente potrebno je zabilježiti najmanje porijeklo (mjesto skupljanja), pH-vrijednost i amonijak porne vode, sadržaj organskog ugljenika (TOC), distribuciju veličine čestica (procenat pijeska, prašine i gline) i procenat sadržaja vode (6). Ako se očekuje stvaranje amonijaka, preporučuje se da se prirodni sediment prije dodavanja ispitivane supstance postupkom spajkinga prethodno priprema sedam dana u istim uslovima koji prevladavaju i u narednom ispitivanju. Na kraju tog perioda pripreme potrebno je ukloniti i baciti vodu iznad sedimenta. Analiza sedimenta ili njegovih sastojaka na zagaĐujuće mikrosupstance prije upotrebe mogla bi dati korisne informacije.

5.4.1. Priprema

Rukovanje prirodnim sedimentima prije njihove upotrebe u laboratorijai opisano je pod (1)(6)(44).

Priprema vještačkog sedimenta opisana je u Dodatku 5.

5.4.2. Skladištenje

Prirodni sedimenti u laboratorijai trebalo bi da se što kraće skladište. Agencija za zaštitu životne sredine SAD (6) preporučuje maksimalni period skladištenja od osam sedmica pri temperaturi od 4 ± 2 °C u mraku. Iznad sedimenta u posudama za skladištenje ne bi trebalo da bude parnog prostora. Preporuke za skladištenje vještačkog sedimenta navedene su u Dodatku 5.

5.5. Primjena ispitivane supstance

U sediment je postupkom spajkinga dodata ispitivana supstanca. Postupak spajkinga obuhvata premazivanje jednog ili većeg broja sastojaka sedimenta ispitivanom supstancom. Na primjer, kvarcni pijesak ili njegov dio (na primjer 10 g kvarcnog pijeska po ispitnoj posudi) može se natopiti u rastvoru ispitivane supstance u odgovarajućen rastvaraču koji onda polako isparava dok ne ostane suvi pijesak. Premazani dio se zatim može umiješati u mokri sediment. Pri pripremi sedimenta u obzir se mora uzeti količina pijeska koja nastane miješanjem ispitivane supstance i pijeska, odnosno sediment je stoga potrebno pripremiti s manje pijeska (6).

S prirodnim sedimentom, ispitivana supstanca može se dodati postupkom spajkinga sušenog dijela sedimenta na prethodno opisani način za vještački sediment ili miješanjem ispitivane supstance u vlažni sediment, uz naknadno isparavanje bilo kakvog sredstva za rastvaranje. Odgovarajući rastvarači za postupak spajkinga su etanol, metanol, etilen-glikol-monometil eter, etilen-glikol-dimetil eter, dimetilformamid i trietilenglikol (5)(34). Glavni kriterijumi za izbor odgovarajućeg sredstva za rastvaranje trebalo bi da budu toksičnost i isparljivost rastvarača i rastvorljivost ispitivane supstance u odabranom rastvaraču. Dodatna smjernica o pokolonama spajkinga navedena je u dokumentu Environment Canada (1995)(41). Potrebno je voditi računa o tome da se ispitivana supstanca koja se dodaje u sediment temeljno i ravnodnosno raspršiu sedimentu. Potrebno je analizirati poduzorke ponavljanja sedimenta obogaćenog u postupku spajkinga kako bi se provjerile koncentracije ispitivane supstance u sedimentu i utvrdio stepen homogenosti raspodjele ispitivane supstance.

Kada se pripremi sediment obogaćen u postupku spajkinga s vodom iznad sedimenta, poželjno je dozvoliti podjelu ispitivane supstance između sedimenta i tečnog stanja. To je po mogućnosti potrebno učiniti u uslovima temperature i aeracije koji se primjenjuju pri ispitivanju. Odgovarajuće vrijeme uravnoteženja specifično je za svaki sediment i supstancu, a može se kretati od nekoliko sati pa sve do nekoliko dana, pa čak u rijetkim slučajevima i do nekoliko sedmica (od četiri do pet sedmica) (28)(42). U ovom ispitivanju ne čeka se uravnoteženje, već se preporučuje vrijeme uravnoteženja od 48 sati do sedam dana. Zavisno od svrhe istraživanja, na primjer kada se imitiraju uslovi životne sredine, sediment obogaćen u postupku spajkinga može biti uravnotežen ili se može ostaviti duže vrijeme da stari (11).

6. SSPROVOĐENJE ISPITIVANJA

6.1. Preliminarno ispitivanje

Preliminarni eksperiment može biti koristan za optimizaciju uslova ispitivanja za glavno ispitivanje, na primjer izbor koncentracije, odnosno koncentracija ispitivane supstance, trajanje faze apsorpcije i izlučivanja. Tokom preliminarnog ispitivanja potrebno je posmatrati i bilježiti ponašanje crva, na primjer izbjegavanje sedimenta, odnosno bijeg crva iz sedimenta, koje može biti prouzrokovano ispitivanom supstancom i/ili samim sedimentom. Izbjegavanje sedimenta u preliminarnom ispitivanju može se upotrijebiti kao subletalni parametar za procjenu koncentracije(a) ispitivane supstance koja će se upotrijebiti u ispitivanju bioakumulacije.

6.2. Uslovi izloženosti

6.2.1. Trajanje faze apsorpcije

Ispitni organizmi izlažu se ispitivanoj supstanci tokom faze apsorpcije. Prvi uzorak potrebno je uzeti između četiri i 24 sata nakon početka faze apsorpcije. Faza apsorpcije trebalo bi da traje do 28 dana (1)(6)(11), osim ukoliko se ne može dokazati da je ravnoteža uspostavljena

prije toga. Stabilno stanje postiže se kada: (i) su grafički podaci faktora bioakumulacije u svakom periodu uzorkovanja u zavisnosti od vremena paralelni s vremenskom osom; (ii) se tri uzastopne analize BAF sprovedene na uzorcima uzetim u intervalima od najmanje dva dana ne razlikuju više od ± 20 % i (iii) ne postoje velike razlike između tri perioda uzorkovanja (na osnovu statističkih poreĐenja, na primjer analize varijanse, regresione analize). Ako se do 28. dana ne postigne stabilno stanje, faza apsorpcije može se završiti pokretanjem faze eliminacije, a BAF_K se može izračunati iz konstanti apsorpcije i brzine eliminacije (v. st. 16 do 18).

6.2.2. Trajanje faze eliminacije

38. Prvi uzorak potrebno je uzeti između četiri i 24 sata nakon početka faze eliminacije jer tokom početnog perioda može doći do brzih promjena u ostacima u tkivu. Preporučuje se prekinuti fazu eliminacije ili kada je koncentracija ispitivane supstance niža od 10 % koncentracije stabilnog stanja ili nakon maksimalnog trajanja od deset dana. Nivo ostataka u crvima na kraju faze eliminacije prijavljuje se kao sekundarni parametar praćenja. Međutiim, taj period može biti uslovljen periodom tokom kojeg se koncentracija ispitivane supstance u crvima zadržava iznad analitičke granice detekcije.

6.3. Ispitni organizmi

6.3.1. Broj ispitnih crva

Broj crva po uzorku mora pružiti masu tkiva crva tako da masa ispitivane supstance po uzorku na početku faze apsorpcije, odnosno na kraju faze eliminacije bude značajno veća od granice detekcije za ispitivanu supstancu u biološkom materijalu. U navedenim fazama apsorpcije i eliminacije koncentracija u ispitnim životinjama obično je relativno niska (6)(8)(18). Budući da je pojedinačna masa brojnih vrsta vodenih oligoheta vrlo niska (od pet do deset miligrama mokre mase po jedinici za vrste *Lumbriculus variegatus* i *Tubifex tubifex*), mogu se pridružiti i crvi iz ispitnih posuda za ponavljanje za vaganje i analizu ispitivane hemikalije. Za ispitne vrste veće pojedinačne mase (na primjer *Branchiura sowerbyi*) mogu se upotrebljavati ponavljanja koja sadrže jednu jedinku, no u tim slučajevima potrebno je povećati broj ponavljanja na pet po mjestu uzorkovanja (11). Međutiim, potrebno je napomenuti da vrsta *B. sowerbyi* nije bila uključena u prstenasto ispitivanje (12) i da se stoga ne preporučuje kao poželjna vrsta u metodi.

Potrebno je upotrebljavati crve slične veličine (v. Dodatak 6 za vrstu *L. variegatus*). Trebalo bi da budu iz istog izvora i kao odrasle ili velike životinje trebalo bi da pripadaju istom starosnom klasau (v. Dodatak 6). Budući da masa i starost životinje mogu značajno da utiču na vrijednosti BAF (na primjer zbog različitog sadržaja lipida i/ili prisutnosti jajašaca), te parametre potrebno je tačno zabilježiti. Prije početka ispitivanja potrebno je izvagati poduzorak crva kako bi se izmjerila srednja mokra i suva masa.

Kad je riječ o vrstama *Tubifex tubifex* i *Lumbriculus variegatus*, očekuje se da će tokom ispitnog perioda doći do razmnožavanja. Potrebno je zabilježiti izostanak razmnožavanja u ispitivanju bioakumulacije i to razmotriti prilikom tumačenja rezultata ispitivanja.

6.3.2. Punjenje

Potrebno je upotrijebiti visoke odnose sediment-crv i voda-crv kako bi se minimizovalo smanjenje koncentracije ispitivane supstance u sedimentu tokom faze apsorpcije i kako bi se izbjegla smanjenja u koncentraciji rastvorenog kiseonika. Odabrana brzina punjenja trebalo bi da odgovara prirodno nastalim gustinama naseljenosti odabrane vrste (43). Na primjer, za vrstu

Tubifex tubifex preporučuje se brzina punjenja od jednog do četiri miligrama tkiva crva (mokra masa) po gramu mokrog sedimenta (8)(11). Za vrstu *L. variegatus* reference (1) i (6) preporučuje se brzina punjenja od ≤ 1 g suve mase tkiva crva po 50 g organskog ugljenika sedimenta.

Crvi koji će se upotrebljavati u ispitivanju uklanjaju se iz kulture prosijavanjem kulture sedimenta. Životinje (odrasli ili veliki crvi bez znakova nedavne fragmentacije) prenose se u staklene zdjele (na primjer Petrijeve šolje) s čistom vodom. Ako se uslovi ispitivanja razlikuju od uslova uzgoja kulture, trebalo bi da bude dovoljna faza aklimatizacije od 24 sata. Prije vaganja iz crva je potrebno odstraniti višak vode. To se može učiniti nježnim stavljanjem crva na prethodno navlažen papirni ubrus. Za sušenje crva ne preporučuje se upotreba upijajućeg papira jer može prouzrokovati stres crva ili ih oštetiti. Branson i drugi (*Brunson et al*.) (1998.) preporučuju upotrebu crva iz kojih nije uklonjen višak tečnosti koji predstavljaju približno 1,33 puta ciljane biomase. Tih dodatnih 33 % odgovara razlici između crva iz kojih je uklonjen višak tečnosti i onih iz kojih to nije učinjeno (28).

Na početku faze apsorpcije (0. dan ispitivanja) ispitni organizmi uklanjaju se iz aklimatizovane komore i nasumično se raspoređuju po posudama (na primjer Petrijevim šoljama) koje sadrže obrađenu vodu dodavanjem grupa od po dva crva u svaku posudu sve dok u svakoj posudi ne bude deset crva. Svaka od tih grupa crva zatim se nasumično prenosi u zasebne ispitne posude, na primjer pomoću hvataljki od mekog čelika). Ispitne posude zatim se inkubiraju u skladu s uslovima ispitivanja.

6.3.3. Hranjenje

S obzirom na nizak hranjivi sadržaj vještačkog sedimenta, sediment je potrebno obogatiti izvorom hrane. Kako se ne bi potcijenila izloženost ispitnih organizama, na primjer selektivnim hranjenjem nekontaminiranom hranom, hranu potrebnu za razmnožavanje i rast ispitnih organizama potrebno je dodati sedimentu jednom prije ili tokom primjene ispitivane supstance.

6.4. Odnos sedimenta i vode

Preporučeni odnos sedimenta i vode je 1: 4 (45). Ovaj odnos smatra se stabilnim za održavanje koncentracija kiseonika na odgovarajućim nivoima i za izbjegavanje stvaranja amonijaka u vodi iznad sedimenta. Sadržaj kiseonika u vodi iznad sedimenta potrebno je održavati na nivou od ≥ 40 % zasićenosti. Vodu iznad sedimenta u ispitnim posudama trebalo bi lagano aerirati (na primjer dva do četiri mjehurića po sekundi) Pasterovom pipetom smještenom približno dva centimetra iznad površine sedimenta kako bi se smanjilo uznemiravanje sedimenta.

6.5. Svjetlo i temperatura

Fotoperiod u kulturi i ispitivanju je 16 sati (1)(6). Intenzitet svjetla u ispitnom području potrebno je održavati na otprilike 500 – 1 000 lx. Temperatura bi trebalo da iznosi 20 ± 2 °C tokom cijelog ispitivanja.

6.6. Ispitne koncentracije

Za utvrđivanje kinetike apsorpcije upotrebljava se jedna ispitna koncentracija (što je moguće niža), ali može se upotrijebiti i druga (veća) koncentracija (na primjer (46)). Uzorci se u tom slučaju uzimaju i analiziraju u stabilnom stanju ili nakon 28 dana kako bi se potvrdio BAF izmjeren pri nižoj koncentraciji (11). Potrebno je izabrati veću koncentraciju

kako bi se mogli isključiti štetni efekti (na primjer izborom približno 1 % najniže poznate koncentracije s vidljivim hroničnim efektom ECx dobijenim iz relevantnih studija hronične toksičnosti). Niža ispitna koncentracija trebalo bi da bude značajno veća od granice detekcije u sedimentu i biološkim uzorcima iz primijenjene analitičke metode. Ako je koncentracija s vidljivim efektom ispitivane hemikalije blizu granice analitičke detekcije, preporučuje se upotreba radioaktivno obilježene ispitne hemikalije visoke specifične radioaktivnosti.

6.7. Ispitna i kontrolna ponavljanja

Najmanji broj ispitnih ponavljanja za kinetička mjerenja trebalo bi da bude tri po mjestu uzorkovanja (11) tokom faze apsorpcije i eliminacije. Potrebno je upotrijebiti dodatna ponavljanja, na primjer za fakultativne dodatne datume uzorkovanja. Za fazu eliminacije pripremljen je odgovarajući broj ponavljanja sa sedimentom koji nije obogaćen u postupku spajkinga i vodom iznad sedimenta kako bi se ispitni crvi na kraju faze apsorpcije mogli prebaciti iz određenih ispitnih posuda u neispitne posude. Ukupan broj ispitnih ponavljanja trebalo bi da bude dovoljan i za fazu apsorpcije i za fazu eliminacije.

Alternativno, crvi koji su tokom faze eliminacije određeni za uzorkovanje mogu biti izloženi u jednoj velikoj posudi sa sedimentom koji je podvrgnut postupku spajkinga iste serije koja je upotrijebljena za kinetiku apsorpcije. Potrebno je dokazati da su uslovi ispitivanja (na primjer dubina sedimenta, odnos sedimenta i vode, dodavanje, temperatura, kvalitet vode) uporedivi s ponavljanjima određenim za fazu apsorpcije. Na kraju faze apsorpcije iz ove posude potrebno je uzeti uzorke vode, sedimenta i tla za analizu. Potrebno je pažljivo ukloniti dovoljan broj velikih crva koji ne pokazuju znake nedavne fragmentacije i premjestiti ih u posude za ponavljanje pripremljene za fazu eliminacije (na primjer deset organizama po posudi za ponavljanje). Ako se osim vode ne upotrebljava drugi rastvarač, za biološku i pozadinsku analizu potrebno je obezbijediti najmanje devet ponavljanja iz negativne kontrole (najmanje tri uzorkovana na početku, tri na kraju apsorpcije i tri na kraju eliminacije). Ako je za primjenu ispitivane supstance upotrijebljeno bilo kakvo sredstvo za rastvaranje, potrebno je oformiti kontrolnu grupu s rastvaračem (najmanje tri ponavljanja trebalo bi da budu uzorkovana na početku, tri na kraju apsorpcije i tri na kraju eliminacije). U tom slučaju potrebno je pružiti najmanje četiri ponavljanja iz negativne kontrole (bez rastvarača) za uzorkovanje na kraju faze apsorpcije. Ta ponavljanja mogu se biološki uporediti s kontrolnim grupama s rastvaračem da bi se dobile informacije o mogućem uticaju rastvarača na ispitne organizme. Detalji su navedeni u Dodatku 3.

6.8. Učestalost mjerenja kvaliteta vode

Tokom faze apsorpcije i eliminacije u vodi iznad sedimenta potrebno je mjeriti najmanje sljedeće parametre kvaliteta vode:

temperatura — u jednoj posudi svakog nivoa ispitivanja po datumu uzorkovanja i u jednoj kontrolnoj posudi jednom sedmično i na početku i na kraju perioda apsorpcije i eliminacije; može se i zabilježiti temperatura u medijumumu koji okružuje (okolni vazduh ili vodeno kupatilo) ili u jednoj reprezentativnoj ispitnoj posudi, na primjer kontinuirano ili u intervalima po satima;

sadržaj rastvorenog kiseonika u jednoj posudi svakog nivoa ispitivanja i u jednoj kontrolnoj posudi po datumu uzorkovanja; izražen kao mg/l i % ASV (vrijednosti zasićenosti kiseonikom);

dovod vazduha	kontroliše se najmanje jednom dnevno (tokom radnih dana) i prilagoĐava se po potrebi;
pH-vrijednost	u jednoj ispitnoj posudi svakog nivoa ispitivanja po datumu uzorkovanja i u jednoj kontrolnoj posudi jednom sedmično i na početku i na kraju perioda apsorpcije i eliminacije;
ukupna tvrdoća vode	najmanje u jednoj ispitnoj posudi i jednoj kontrolnoj ispitnoj posudi na početku i kraju perioda apsorpcije i eliminacije, izraženo kao mg/l $CaCO_3$;
ukupni sadržaj amonijaka	najmanje u jednoj ispitnoj posudi i jednoj kontrolnoj ispitnoj posudi na početku i kraju perioda apsorpcije i eliminacije, izraženo kao mg/l NH_4^+ ili NH_3 ili ukupni amonijak – N.

6.9. Uzorkovanje i analiza crva, sedimenta i vode

Raspored uzorkovanja

Primjeri rasporeda uzorkovanja za fazu apsorpcije od 28 dana i fazu eliminacije od deset dana nalaze se u Dodatku 3.

Uzorkujte vodu i sediment iz ispitnih posuda za određivanje koncentracije ispitivane supstance prije dodavanja crva i tokom faze apsorpcije i faze eliminacije. Tokom ispitivanja utvrĐuju se koncentracije ispitivane supstance u crvima, sedimentu i vodi kako bi se nadgledala distribucija ispitivane supstance u segmentima ispitnog sistema.

Crve, sediment i vodu uzorkujte u najmanje šest navrata tokom faze apsorpcije kao i eliminacije.

Nastavite s uzorkovanjem sve dok se ne postigne plato (stabilno stanje) (v. Dodatak 1) ili 28 dana. Ako se u roku od 28 dana ne postigne plato, počnite s fazom eliminacije. Prilikom započinjanja faze eliminacije određene crve prenesite u posude za ponavljanje koje sadrže netretirani sediment i vodu (v. st. 17 i 18).

Uzorkovanje i priprema uzoraka

Uzorke vode dobijte procjeĐivanjem, ispuštanjem ili pipetiranjem zapremine koja je dovoljna za mjerenje količine ispitne supstance u uzorku.

Preostala voda iznad sedimenta pažljivo se procjeĐuje ili ispušta iz ispitne(ih) posude(a). Uzorke sedimenta potrebno je uzimati pažljivo, uz minimalno ometanje crva.

Uklonite sve crve iz ispitnih posuda za ponavljanje u vrijeme uzorkovanja, na primjer suspendovanjem sedimenta s vodom iznad sedimenta i rasprostiranjem sadržaja svakog ponavljanja u plitkoj posudi i vaĐenjem crva hvataljkom od mekog čelika. Brzo ih isperite vodom u plitkoj staklenoj ili čeličnoj ladici. Uklonite višak vode. Crve pažljivo prenesite u prethodno izvaganu posudu i izvagajte ih. Crve usmrtite zamrzavanjem (na primjer ≤ – 18 °C). Potrebno je zabilježiti prisutnost i broj kokona i/ili mladih.

Generalno, crve je potrebno izvagati i usmrtiti odmah nakon uzorkovanja, bez faze pražnjenja crijeva, kako bi se dobio konzervativni BAF koji obuhvata kontaminirani sadržaj crijeva i kako bi se izbjegli gubici tjelesnih ostataka tokom perioda pražnjenja crijeva samo u vodi (8). Tokom bilo kojeg perioda pražnjenja crijeva samo u vodi ne očekuje se značajna eliminacija supstanci čiji je log K_{ow} preko pet, dok može doći do gubitka značajnih količina supstanci čiji je log K_{ow} niži od četiri (47).

Tokom faze eliminacije crvi prazne crijeva u čistom sedimentu. To znači da mjerenja odmah nakon faze eliminacije uključuju kontaminirani sediment crijeva, dok se pretpostavlja da se kontaminirani sadržaj crijeva nakon početnih četiri do 24 sata faze eliminacije zamjenjuje čistim sedimentom (11) (47). Koncentracija u crvima u ovom uzorku tada se može smatrati koncentracijom tkiva nakon pražnjenja crijeva. Kako bi se uzelo u obzir i razblaživanje koncentracije ispitivane supstance u nekontaminiranom sedimentu tokom faze eliminacije, masa sadržaja crijeva može se procijeniti iz odnosa mokre mase crva / mase pepela crva ili iz suve mase crva / mase pepela crva.

Ako je svrha specifičnog istraživanja da se izmjeri biorapoloživost i ostaci pravog tkiva u ispitnim organizmima, tada je najmanje poduzorak ispitnih životinja (na primjer iz tri dodatne posude za ponavljanje) koji je, po mogućnosti, uzorkovan tokom stabilnog stanja, potrebno izvagati, pročišćavati u čistoj vodi šest sati (47) i ponovo izvagati prije analize. Tada se podaci o masi i tjelesnoj koncentraciji crva ovog poduzorka mogu uporediti s vrijednostima dobijenim od nepročišćenih crva. Crve određene za mjerenje eliminacije potrebno je pročistiti prije prenosa u čisti sediment kako bi se za životinje smanjio dodatni stres.

Po mogućnosti, uzorke vode, sedimenta i crva analizirajte neposredno nakon njihovog vađenja (odnosno u roku od jednog do dva dana) kako bi se spriječila razgradnja ili ostali gubici i kako bi se izračunale približne brzine apsorpcije i eliminacije tokom nastavka ispitivanja. Osim toga, trenutnom analizom izbjegava se kašnjenje u određivanju platoa.

Ako se analiza ne obavi odmah, uzorke je potrebno uskladištiti pod odgovarajućim uslovima. Prije početka istraživanja pribavite informacije o stabilnosti i ispravnim uslovima skladištenja za određenu ispitivanu supstancu (na primjer trajanje i temperatura skladištenja, postupci ekstrakcije itd). Ako takve informacije nijesu dostupne i ako se procijeni da su neophodne, istovremeno se mogu analizirati kontrolna tkiva podvrgnuta postupku spajkinga kako bi se utvrdila stabilnost skladištenja.

Kvalitet analitičke metode

Budući da čitav postupak uglavnom zavisi od tačnosti, preciznosti i osjetljivosti analitičke metode koja se primjenjuje u odnosu na ispitivanu supstancu, eksperimentima treba provjeriti da li su preciznost i reproduktivnost hemijske analize i izdvajanje ispitivane supstance iz uzoraka vode, sedimenta i crva zadovoljavajući za metodu u pitanju. Provjerite i da li se ispitivana supstanca može detektovati u kontrolnim posudama u koncentracijama većim od fonskih. Ako je to potrebno, ispravite vrijednosti C_w, C_s i C_a za iskorišćenje i pozadinske vrijednosti kontrola. Tokom ispitivanja svim uzorcima rukujte na način da smanjite kontaminaciju i gubitak (na primjer nastali kao rezultat adsorpcije ispitivane supstance na uređaj za uzorkovanje).

Potrebno je zabilježiti i u izvještaj uključiti i ukupno iskorišćenje i iskorišćenje ispitivane supstance u crvima, sedimentu, vodi i, ako se upotrebljavaju, u zamkama koje sadrže apsorbente radi zadržavanja isparene ispitivane supstance.

Budući da se preporučuje upotreba radioaktivno obilježenih supstanci, moguće je analizirati cjelokupnu radioaktivnost (odnosno matični produkti i produkti razgradnje). Međutiim, ako je to analitički izvodivo, korisne informacije može pružiti kvantifikacija matične supstance i produkata razgradnje u stabilnom stanju ili na kraju faze apsorpcije. Ako je predviđeno sprovođenje takvih mjera, tada je uzorke potrebno podvrgnuti odgovarajućim pokolonama ekstrakcije kako bi se matična supstanca mogla posebno kvantitativno odrediti. Kada uočeni produkt razgradnje predstavlja značajan procenat (na primjer > 10 %) radioaktivnosti izmjerene u ispitnim organizmima u stabilnom stanju ili na kraju faze apsorpcije, preporučuje se identifikovanje takvih produkata razgradnje (5).

Zbog niske pojedinačne biomase često nije moguće utvrditi koncentraciju ispitivane supstance u svakom pojedinačnom crvu, osim ukoliko se kao ispitivana vrsta ne upotrebljava *Branchiura sowerbyi* (40 – 50 mg mokre mase po crvu) (11). Stoga je udruživanje jedinki uzorkovanih iz date ispitne posude prihvatljivo, ali ograničava statističke postupke koji se mogu primijeniti na podatke. Ako su određeni statistički postupak i snaga bitni, u ispitivanje je potrebno uključiti dovoljan broj ispitnih životinja i/ili broj posuda za ponavljanje kako bi se omogućilo željeno spajanje, postupak i snaga.

Preporučuje se da se BAF izražava i kao funkcija ukupne mokre mase i, kada je to potrebno (na primjer za jako lipofilne supstance), kao funkcija sadržaja lipida i TOC sedimenta. Za određivanje sadržaja lipida potrebno je upotrebljavati odgovarajuće metode (48)(49). Postupak ekstrakcije hloroform-metanola (50) može se preporučiti kao standardna metoda (48). Međutiim, radi izbjegavanja upotrebe hlorisanih rastvarača može se upotrebljavati metoda Blaja i Dajera (Bligh/Dyer) izmijenjena u prstenastom ispitivanju (50) kako je opisano pod (51). Budući da razne metode ne daju identične vrijednosti (48), vrlo je važno navesti pojedinosti primijenjene metode. Kada je to moguće, odnosno ako postoji dovoljno tkiva crva, sadržaj lipida mjeri se na istom uzorku ili ekstraktu kao i onaj proizveden za analizu ispitivane supstance jer se lipidi često moraju ukloniti iz ekstrakta prije nego što se on hromatografski analizira (5). Međutiim, praktično je upotrebljavati aklimatizovane kontrolne životinje makar na početku ili po mogućnosti na kraju faze apsorpcije za mjerenje sadržaja lipida, odnosno u tri uzorka.

7. PODACI I IZVJEŠTAVANJE

7.1. Obrada rezultata

Kriva apsorpcije ispitivane supstance dobija se grafičkim prikazom koncentracije u/na crvima tokom faze apsorpcije u zavisnosti od vremena na aritmetičkoj ljestvici. Ako je kriva dostigla plato, izračunajte BAF_{ss} u stabilnom stanju:

$$\frac{C_a \; pri \; stabilnom \; stanju \; ili \; 28. dana \; (srednja \; vrijednost)}{C_s \; pri \; stabilnom \; stanju \; ili \; 28. dana \; (srednja \; vrijednost)}$$

Odredite faktor kinetičke bioakumulacije (BAF_K) kao odnos k_s/k_e. Konstanta eliminacije (ke) obično se određuje iz krive eliminacije (odnosno grafičkog prikaza koncentracije ispitivane supstance u crvima tokom faze eliminacije). Zatim se iizračunava konstanta brzine apsorpcije k_s iz krive kinetike apsorpcije. Za dobijanje BAF_K i konstanti brzine, k_s, i k_e prednost se daje metodama upotrebe procjene nelinearnih parametara na kompjuteru (v.

Dodatak 2). Ako eliminacija očigledno nije prvog reda, potrebno je primijeniti složenije modele (25)(27)(52).

Faktor akumulacije biota-sedimenta (BSAF) određuje se normalizovanjem BAFK za sadržaj lipida u crvima i za ukupni sadržaj organskog kiseonika u sedimentu.

7.2. Tumačenje rezultata

Rezultate je potrebno tumačiti s oprezom ako se izmjerene koncentracije ispitnih koncentracija kreću u blizini granice detekcije upotrijebljene analitičke metode.

Jasno definisane krive apsorpcije i eliminacije znak su dobrog kvaliteta podataka o bioakumulaciji. Granice pouzdanosti za vrijednosti BAF iz dobro osmišljenih studija generalno ne bi trebalo da prelaze 25 % (5).

7.3. zvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju mora obuhvatati sljedeće informacije:

Ispitivana supstanca fizička priroda i fizičko-hemijska svojstva, na primjer log K_{ow},

- rastvorljivost u vodi; podaci za identifikaciju hemikalije, izvor ispitivane supstance,
- identitet i koncentracija upotrijebljenog rastvarača;
- kod radioaktivno obilježenih supstanci: tačan položaj obilježenih atoma, specifična radioaktivnost i procenat radioaktivnosti povezan s nečistoćama.

Ispitivane vrste – naučni naziv, soj, izvor, sve vrste prethodne obrade, aklimatizacija, starost, red veličina itd.

Uslovi ispitivanja ispitni postupak (na primjer statički, polustatički ili protočni); vrsta i

- svojstva korišćene rasvjete i fotoperiod(i);
- plan ispitivanja (na primjer broj, materijal i veličina ispitnih posuda, zapremina vode, masa i zapremina sedimenta, brzina izmjene zapremina vode (za protočne ili polustatičke postupke), bilo kakva aeracija upotrijebljena prije ili tokom ispitivanja, broj ponavljanja, broj crva po ponavljanju, broj ispitnih koncentracija, dužina faza apsorpcije i eliminacije, učestalost uzorkovanja);
- metoda pripreme i primjene ispitivane supstance kao i obrazloženje izbora specifične metode;
- nominalne ispitne koncentracije; izvor sastojaka vještačke vode i sedimenta ili,
- ako se upotrebljavaju prirodni medijumumi, porijeklo tla, opis svake prethodne obrade, rezultati svake demonstracije sposobnosti ispitnih životinja da žive i/ili se reprodukuju u upotrijebljenom medijumumu, karakteristike sedimenta (pH-vrijednost i amonijak porne vode (prirodni sedimenti), sadržaj organskog ugljenika (OC), distribucija veličine čestica (procenat pijeska, prašine i gline), procenat sadržaja vode i sva ostala mjerenja) i karakteristike vode (pH-vrijednost, tvrdoća, provodljivost, temperatura, koncentracija rastvorenog kiseonika, rezidualni hlor (ako se mjeri) i sva ostala mjerenja);
- nominalna i izmjerena suva masa u % mokre mase (ili odnos suve i mokre mase) vještačkog sedimenta; izmjerena suva masa u % mokre mase (ili odnos suve i mokre mase) za terenske sedimente;
- kvalitet vode u ispitnim posudama koju karakteriše temperatura, pH-vrijednost, amonijak, ukupna tvrdoća i koncentracija rastvorenog kiseonika;

- detaljni podaci o tretiranju uzoraka vode, sedimenta i crva, uključujući i pojedinosti o pripremi, skladištenju, pokolonama spajkinga, ekstrakcije i analitičkim pokolonama (i preciznosti) za ispitivanu supstancu i sadržaj lipida i iskorišćenje ispitivane supstance.

Rezultati – smrtnost kontrolnih crva i crva u svakoj ispitnoj posudi i svi opaženi subletalni efekti, uključujući neuobičajeno ponašanje (na primjer izbjegavanje sedimenta, prisutnost ili odsutnost fekalnih peleta, nedostatak razmnožavanja);

- izmjerena suva masa u % mokre mase tla (ili odnos suve i mokre mase) sedimenta i ispitivanih organizama (korisno za normalizaciju);
- sadržaj lipida crvi;
- krive koje pokazuju kinetiku apsorpcije i eliminacije ispitivane supstance u crvima i vrijeme do stabilnog stanja;
- C_a, C_s i C_w (sa standardnim odstepenem i rasponom, prema potrebi) za sva vremena uzorkovanja (C_a izražen u g kg^{-1} mokre i suve mase čitavog tijela, C_s izražen u g kg^{-1} mokre i suve mase sedimenta i C_w u mg l^{-1}). Ako se traži i faktor akumulacije biotasedimenta (BSAF; v. Dodatak 1 za definicije) (na primjer radi poređenja rezultata dva ili većeg broja ispitivanja sprovedenih sa životinjama različitog sadržaja lipida), C_a bi trebalo dodatno da se izrazi kao g kg^{-1} sadržaja lipida u organizmu, a C_s bi trebalo da se izrazi kao g kg^{-1} organskog ugljenika (OC) u sedimentu;
- BAF (izražen u kg mokrog sedimenta kg^{-1} mokrog crva), konstanta brzine apsorpcije sedimenta k_s (izražena u g mokrog sedimenta kg^{-1} mokrog crva d^{-1}) i konstanta brzine eliminacije k_e (izražena u d^{-1}); naknadno se može izvijestiti o BSAF (izražen u kg OC u sedimentu kg^{-1} sadržaja lipida u crvu);
- Neeliminisani ostaci (NER) na kraju faze eliminacije;
- ako su mjereni: procenti matične supstance, produkata razgradnje i vezanih ostataka

(odnosno procenat ispitivane supstance koja se ne može ekstrahovati uobičajenim metodama ekstrakcije) detektovani kod ispitnih životinja; – metode upotrijebljene za statističke analize podataka.

Ocjena rezultata usklađenost rezultata s kriterijumima validacije navedenim u
- stavu 21;
- neočekivani ili neobični rezultati, na primjer nepotpuna eliminacija ispitivane supstance iz ispitnih životinja; u takvim slučajevima rezultati iz bilo kojeg preliminarnog istraživanja mogu pružiti korisne informacije.

Dodatak 1

Definicije i jedinice

Vještački sediment ili formulisani, obrađeni ili sintetički sediment je smješa supstanci koja se upotrebljava za imitiranje fizičkih sastojaka prirodnog sedimenta.

Bioakumulacija je porast koncentracije ispitivane supstance u ili na organizmu u odnosu na koncentraciju ispitivane supstance u medijumumu koji je okružuje. Bioakumulacija nastaje i iz procesa biokoncentracije i iz procesa biomagnifikacije (v. u nastavku teksta).

Faktor bioakumulacije (BAF) u bilo kojem trenutku tokom faze apsorpcije ovog ispitivanja bioakumulacije je koncentracija ispitivane hemikalije u/na ispitnom organizmu (C_a u g kg^{-1}

mokre ili suve mase) podijeljena s koncentracijom te supstance u medijumumu koji je okružuje (C_s kao g kg^{-1} mokre ili suve mase sedimenta). Da bi se odnosio na jedinice C_a i C_s, BAF ima jedinice kg sedimenta kg^{-1} crva (15).

Faktori bioakumulacije izračunati direktno iz odnosa konstante brzine apsorpcije sedimenta i konstante brzine eliminacije (k_s, odnosno k_e – v. u nastavku teksta) nazivaju se faktorom kinetičke bioakumulacije (BAF_K).

Biokoncentracija je porast koncentracije ispitivane supstance u ili na organizmu, koja nastaje uglavnom kao direktni rezultat apsorpcije preko površine tijela, u odnosu na koncentraciju ispitivane supstance u očvrstenju.

Biomagnifikacija je porast koncentracije ispitivane supstance u ili na organizmu, koja nastaje uglavnom kao rezultat apsorpcije iz zagađene hrane ili plijena, u odnosu na koncentraciju ispitivane supstance u hrani ili plijenu. Biomagnifikacija može dovesti do prenosa akumulacije ispitivane supstance unutar mreža hrane.

Faktor akumulacije biota-sediment (BSAF) je koncentracija ispitivane hemikalije u/na ispitnom organizmu u stabilnom stanju, normalizovana lipidima, podijeljena koncentracijom ispitivane supstance u sedimentu, normalizovanom organskim ugljenikom u stabilnom stanju. C_a je stoga izražen kao g kg^{-1} sadržaja lipida organizma, a C_s kao g kg^{-1} organskog sadržaja sedimenta.

Period kondicioniranja služi za stabilizaciju mikrobne komponente sedimenta i za uklanjanje na primjer amonijaka koji nastaje u odjeljcima sedimenta. Odvija se prije dodavanja ispitivane supstance u sediment postupkom spajkinga. Voda iznad sedimenta obično se baca nakon kondicioniranja.

Eliminacija ispitivane supstance je gubitak te supstance iz tkiva ispitnog organizma aktivnim ili pasivnim procesima koji se odvijaju nezavisno od prisustva ili odsustva ispitivane supstance u medijumumu koji je okružuje.

Faza eliminacije je vrijeme, nakon prenosa ispitnih organizama iz zagađenog medijumuma u medijumum bez ispitivane supstance, tokom kojeg se proučava eliminacija (ili neto gubitak) supstanci iz ispitnih organizama.

Konstanta brzine eliminacije (k_e) je brojčana vrijednost koja definiše brzinu opadanja koncentracije ispitivane supstance u/na ispitnim organizmima nakon prenosa ispitnih organizama iz medijumuma koji sadrži ispitivanu supstancu u medijumum bez te hemikalije; k_e se izražava u d^{-1}.

Period uravnoteženja služi za omogućavanje raspodjele ispitivane supstance između čvrste faze, porne vode i vode iznad sedimenta. Odvija se nakon dodavanja ispitivane supstance u sediment postupkom spajkinga i prije dodavanja ispitnih organizama.

Koeficijent raspodjele oktanol-voda (K_{ow}) je odnos rastvorljivosti supstance u n-oktanolu i vodi u ravnoteži, a ponekad se izražava i kao P_{ow}. Logaritam K_{ow} (log K_{ow}) upotrebljava se kao indikator potencijala supstance za bioakumulaciju vodenim organizmima.

Koeficijent raspodjele organski ugljenik-voda (K_{oc}) je odnos koncentracije supstance u/na dijelu sedimenta s organskim ugljenikom i koncentracije supstance u vodi u ravnoteži.

Voda iznad sedimenta je voda koja se u ispitnoj posudi nalazi iznad sedimenta.

Plato ili stabilno stanje definiše se kao uravnoteženje između procesa apsorpcije i eliminacije koji se odvijaju istovremeno tokom faze izlaganja. Stabilno stanje postiže se na grafičkom prikazu BAF u svakom periodu uzorkovanja u zavisnosti od vremena kada kriva postane paralelna s vremenskom osom i kada se rezultati tri uzastopne analize BAF sprovedene na uzorcima koji se uzimaju u intervalima od najmanje dva dana nalaze u 20 % i kada ne postoje statistički značajne razlike između tri perioda uzorkovanja. Za ispitivane supstance koje se sporo apsorbuju prikladniji vremenski interval bi bio sedam dana (5).

Porna voda ili međuprostorna voda je voda u prostoru među česticama sedimenta ili tla.

Konstanta brzine apsorpcije sedimenta (k_s) je brojčana vrijednost koja definiše brzinu porasta koncentracije ispitivane supstance u/na ispitnom organizmu, a koja nastaje kao rezultat apsorpcije iz faze sedimenta. k_s se izražava kao g sedimenta kg^{-1} crva d^{-1}.

Sediment obogaćen u postupku spajkinga je sediment u koji je dodata ispitivana supstanca.

Faktor bioakumulacije stabilnog stanja (BAF_{ss}) je BAF u stabilnom stanju i ne mijenja se značajno tokom dužeg perioda, a koncentracija ispitivane supstance u medijumumu koji je okružuje (C_s kao g kg^{-1} mokre ili suve mase sedimenta) konstantna je tokom tog perioda.

Faza apsorpcije ili izlaganja je vrijeme tokom kojeg su ispitni organizmi izloženi ispitivanoj supstanci.

Dodatak 2

Proračun parametara apsorpcije i eliminacije

Osnovni parametar praćenja ispitivanja bioakumulacije je faktor bioakumulacije, BAF. Izmjereni BAF može se izračunati dijeljenjem koncentracije u ispitnom organizmu, C_a, koncentracijom u sedimentu, C_s, u stabilnom stanju. Ako se stabilno stanje ne postigne tokom faze apsorpcije,
BAF se iizračunava na isti način za 28. dan. Međutiim, ipak je potrebno zabilježiti da li se BAF zasniva na koncentracijama u stabilnom stanju.

Poželjni način dobijanja faktora kinetičke bioakumulacije (BAF_K), konstante brzine apsorpcije sedimenta (k_s) i konstante brzine eliminacije (k_e) je upotreba metoda procjene nelinearnih parametara na kompjuteru. Imajući u vidu vremenske serije prosječnih faktora akumulacije (C_a, srednje vrijednosti datuma svakog uzorkovanja/C_s, srednje vrijednosti datuma svakog uzorkovanja = AF) faze apsorpcije na osnovu mokre mase crva i sedimenta i modela jednačine:

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{ke \times t}) \qquad \text{[jednačina 1]}$$

pri čemu je AF(t) odnos koncentracije ispitivane supstance u crvima i njena koncentracija u sedimentu u bilo kojoj datoj vremenskoj tački (t) faze apsorpcije, ti kompjuterski programi iizračunavaju vrijednosti za BAF_K, k_s i k_e.

Kada se tokom faze apsorpcije postigne stabilno stanje (odnosno t = ∞), jednačina 1 može se redukovati na:

$$BAF_k = \frac{k_s}{k_e}$$ [jednačina 2]

pri čemu je ks = konstanta brzine apsorpcije u tkivu [g sedimenta kg^{-1} crva d^{-1}] ke = konstanta brzine eliminacije [d^{-1}]

Tada je $k_s/k_e \times C_s$ pristup koncentraciji ispitivane supstance u tkivu crva u stabilnom stanju ($C_{a,ss}$).

Faktor akumulacije biota-sediment (BSAF) potrebno je izračunati na sljedeći način:

$$BSAF = BAF_k \; x \; \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

pri čemu je f_{oc} frakcija organskog ugljenika u sedimentu, dok je f_{lip} frakcija lipida crva, a zasniva se ili na suvoj ili na mokroj masi.

Imajući u vidu vremenske serije vrijednosti koncentracije, kinetika eliminacije može se oblikovati pomoću sljedećih modela jednačina i metode procjene nelinearnog parametra zasnovane na kompjuterskom proračunu.

Kao zadata početna tačka preporučuje se srednji mjereni tjelesni ostatak na kraju faze apsorpcije. Potrebno je upotrebljavati samo vrijednost koja je oblikovana/procijenjena u fazi apsorpcije, na primjer ako mjerena supstanca značajno odstupa od oblikovanog tjelesnog ostatka. U stavu 50 pročitajte i o alternativnom prethodnom izlaganju crva određenih za eliminaciju. U ovom pristupu smatra se da uzorci tih crva prethodno izloženih 0. dana faze eliminacije pružaju realističan ostatak tijela za započinjanje kinetike eliminacije.

Ako podaci na grafičkom prikazu u zavisnosti od vremena ukazuju na konstantni eksponencijalni pad koncentracije ispitivane supstance u životinjama, model s jednim odjeljkom (jednačina 4) može se upotrijebiti za opis trajanja eliminacije.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-ket}$$ [jednačina 3]

Ponekad se čini da su procesi eliminacije dvofazni i da u njima dolazi do rapidnog pada C_a tokom početnih faza, a to se pretvara u sporiji gubitak ispitivanih supstanci u kasnijim fazama eliminacije. Te dvije faze mogu se protumačiti pretpostavkom da u organizmu postoje dva odjeljka iz kojih se gubi ispitivana supstanca, i to različitom brzinom. U tim slučajevima potrebno je proučiti specifičnu literaturu (15)(16)(17)(25).

Opisana je eliminacija iz dva odjeljka, na primjer sljedećom jednačinom (25):

$$C_a = A \times e^{-ka \times t} + B \times e^{kb \times t}$$ [jednačina 4]

A i B predstavljaju veličinu odjeljaka (u procentu cjelokupnog ostatka tkiva), pri čemu je odjeljak A onaj s brzim gubitkom supstance, a odjeljak B onaj sa sporim gubitkom supstance. Zbir A i B jednak je 100 % cjelokupne zapremine odjeljka životinja u stabilnom stanju. k_a i k_b predstavljaju odgovarajuće konstante eliminacije [d^{-1}]. Ako se model s dva

odjeljka prilagodi podacima izlučivanja, konstanta brzine apsorpcije k_s može se odrediti na sljedeći način (53)(54):

$$k_s = \frac{A\ x\ k_a + B\ x\ k_b\ x\ BAF}{A+B}$$ [jednačina 5]

Uprkos tome, ove modele jednačina potrebno je oprezno upotrebljavati, naročito kada tokom ispitivanja doĐe do promjena biorapoloživosti ispitivane supstance (42).

Kao druga mogućnost u odnosu na opisani model jednačine, u istom ispitivanju može se izračunati i kinetika (k_s i k_e) primjenom kinetičkog modela prvog reda istovremeno na sve podatke iz faze apsorpcije i iz faze eliminacije. Za opis metode koja bi omogućila takav kombinovani proračun konstanti brzine apsorpcije i eliminacije mogu se konsultovati reference (55), (56) i (57).

Neeliminisani ostaci (NER) trebalo bi da se iizračunavaju kao sekundarni parametar praćenja množenjem odnosa prosječne koncentracije u crvima (C_a) 10. dana faze eliminacije i prosječne koncentracija u crvima (C_a) u stabilnom stanju (28. dan faze apsorpcije) sa 100:

$$NER_{10d}[\%] \frac{C_a na\ kraju\ eliminacije\ \ prosjek\ x\ 100}{C_a\ u\ stabilnom\ stanju\ (prosjek)}$$

Dodatak 3

Primjer rasporeda uzorkovanja za ispitivanje bioakumulacije u trajanju od 28 dana

a) Faza apsorpcije (uključujući četvorodnevnu fazu uravnoteženja)

Dan	Djelatnosti
– 6	Pripremanje suspenzije treseta za sediment; kondicioniranje suspenzije 48 sati;
– 4	Obrada sedimenta ili frakcije sedimenta postupkom spajkinga; miješanje svih sastojaka sedimenta; uklanjanje uzoraka sedimenta iz tretiranih grupa i kontrolnih grupa s rastvaračem radi utvrĐivanja koncentracije ispitivane supstance; dodavanje vode iznad sedimenta; inkubacija u uslovima ispitivanja (faza ujednačavanja);
– 3/– 2	VaĐenje ispitnih organizama iz uzgojene kulture radi aklimatizacije;
0	Mjerenje kvaliteta vode (v. stav 52); uklanjanje ponavljanja radi uzimanja uzoraka vode i sedimenta za određivanje koncentracije ispitivane supstance; nasumično raspoređivanje crva u ispitne posude; zadržavanje dovoljnog broja poduzoraka crva za određivanje analitičkih pozadinskih vrijednosti; kontrolisanje dovoda vazduha ako se upotrebljava zatvoreni sistem ispitivanja;
1	Uklanjanje ponavljanja radi uzorkovanja; kontrolisanje dovoda vazduha, ponašanje crva, kvalitet vode (v. stav 56); uzimanje uzoraka vode, sedimenta i crva radi određivanja koncentracije ispitivane supstance;

2	Kontrola dovoda vazduha, ponašanja crva i temperature;
3	Isto kao i 1. dan;
4 – 6	Isto kao i 2. dan;
7	Isto kao i 1. dan; nadoknađivanje isparene vode ako je potrebno;
8 – 13	Isto kao i 2. dan;
14	Isto kao i 1. dan; nadoknađivanje isparene vode ako je potrebno;
15 – 20	Isto kao i 2. dan;
21	Isto kao i 1. dan; nadoknađivanje isparene vode ako je potrebno;
22 – 27	Isto kao i 2. dan;
28	Isto kao i 1. dan; mjerenje kvaliteta vode (v. stav 52); završetak faze apsorpcije, zadržavanje dovoljnog broja poduzoraka crva radi određivanja analitičkih pozadinskih vrijednosti, mokre i suve mase i sadržaja lipida; prenošenje crva iz preostalih izloženih ponavljanja u posude koje sadrže čisti sediment radi faze eliminacije (nema pražnjenja crijeva); uzorkovanje vode, sedimenta i crva iz kontrolnih grupa s rastvaračem; uzorkovanje rastvora koji zarobljavaju, ako su postavljeni.
	Djelatnosti prethodnog izlaganja (faza uravnoteženja) potrebno je planirati uzimajući u obzir svojstva ispitivane supstance. Ako je to potrebno, kondicioniranje pripremljenog sedimenta pod vodom iznad sedimenta pri temperaturi od 20 ± 2 °C sedam dana; u ovom slučaju, ranija priprema sedimenta!
	Djelatnosti opisane za drugi dan potrebno je sprovoditi svakodnevno (makar tokom radnih dana).

b) Faza eliminacije

Dan	Djelatnosti
– 6	Pripremanje suspenzije treseta za sediment; kondicioniranje suspenzije 48 sati;
– 4	Miješanje svih sastojaka sedimenta; uklanjanje uzoraka sedimenta iz tretiranih grupa i kontrolnih grupa s rastvaračem radi utvrđivanja koncentracije ispitivane supstance; dodavanje vode iznad sedimenta; inkubacija u uslovima ispitivanja;
0 (28. dan faze apsorpcije)	Mjerenje kvaliteta vode (v. stav 52); prenošenje crva iz preostalih izloženih ponavljanja u posude koje sadrže čisti sediment; uklanjanje ponavljanja nakon četiri do šest sati radi uzimanja uzoraka vode, sedimenta i crva radi određivanja koncentracije ispitivane supstance; nasumično raspoređivanje crva u ispitne posude;
1	Uklanjanje ponavljanja radi uzorkovanja; kontrolisanje dovoda vazduha, ponašanje crva, kvalitet vode (v. stav 52); uzimanje uzoraka vode, sedimenta i crva radi određivanja koncentracije ispitivane supstance.
2	Kontrola dovoda vazduha, ponašanja crva i temperature;
3	Isto kao i 1. dan;
4	Isto kao i 2. dan;

5	Isto kao i 1. dan;
6	Isto kao i 2. dan;
7	Isto kao i 1. dan; nadoknaĐivanje isparene vode ako je potrebno;
8 – 9	Isto kao i 2. dan;
10	Isto kao i 1. dan; kraj faze eliminacije; mjerenje kvaliteta vode (v. stav 52); uzorkovanje vode, sedimenta i crva iz kontrolnih grupa s rastvaračem; uzorkovanje rastvora koji zarobljavaju, ako su postavljeni.
	Pripremu sedimenta prije početka faze eliminacije potrebno je obaviti na isti način kao i prije faze apsorpcije.
	Djelatnosti opisane za drugi dan potrebno je sprovoditi svakodnevno (makar tokom radnih dana).

Dodatak 4

Neka fizičko-hemijska svojstva prihvatljive vode za razblaživanje

SASTOJAK	KONCENTRACIJE
Čestice	< 20 mg/l
Ukupni organski ugljenik	< 2µg/l
Nejonizovani amonijak	< 1 µg/l
Rezidualni hlor	< 10 µg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
Ukupni organofosforni pesticidi plus polihlorisani bifenili	< 50 ng/l
Ukupni organski hlor	< 25 ng/l

SASTAV PREPORUČENE OBRAĐENE VODE

(a) Rastvor kalcijum hlorida
Rastvoriti 11,76 g $CaCl_2$ 2H2O u dejonizovanoj vodi; dopuniti dejonizovanom vodom do 1 l

(b) Rastvor magnezijum sulfata
Rastvoriti 4,93 g $MgSO_4$ $7H_2O$ u dejonizovanoj vodi; dopuniti dejonizovanom vodom do 1 l

(c) Rastvor natrijum bikarbonata
Rastvoriti 2,59 g $NaHCO_3$ u dejonizovanoj vodi; dopuniti dejonizovanom vodom do 1 l (d) Rastvor kalijum hlorida
Rastvoriti 0,23 g KCl u dejonizovanoj vodi; dopuniti dejonizovanom vodom do 1 l

Sve hemikalije moraju biti analitički čiste.

Sprovodljivost destilovane ili dejonizovane vode ne bi trebalo da prelazi 10 µScm– 1.

Pomiješa se 25 ml svakog rastvora od (a) do (d) pa se ukupna zapremina dopuni dejonizovanom vodom do 1 l. Zbir jona kalcijuma i magnezijuma u ovom rastvoru je 2,5 mmol/l.

Odnos Ca: Mg jona je 4: 1, dok je odnos Na: K jona 10: 1. Kapacitet kisjeline KS4.3 ovog rastvora je 0,8 mmol/l.

Aerirajte vodu za razblaživanje dok se ne postigne zasićenost kiseonikom, a zatim je skladištite približno dva dana bez dodatne aeracije prije upotrebe.

pH-vrijednost prihvatljive vode za razblaživanje trebalo bi da bude u rasponu od šest do devet.

Dodatak 5

Vještački sediment – preporuke za pripremu i skladištenje

Za razliku od zahtjeva u ispitnoj metodi C.8 (40), preporučuje se da sadržaj treseta vještačkog sedimenta bude 2 % umjesto 10 % suve mase kako bi odgovarao niskom do umjerenom organskom sadržaju prirodnih sedimenata.

Procenat suvih sastojaka vještačkog sedimenta:

Sastojak	Svojstva	% suvog sedimenta
Treset	Tresetnica, stepen razgradnje: „srednji—, sušena na vazduhu, bez vidljivih ostataka biljke, fino usitnjena (veličina čestice ≤ 0,5 mm)	2 ± 0,5
Kvarcni pijesak	Veličina zrna: ≤ 2 mm, ali > 50 % čestica trebalo bi da bude u rasponu od 50 – 200 µm	76
Kaolinitska glina	Sadržaj kaolinita ≥ 30 %	22 ± 1
Izvor hrane	Vrsta *Folia urticae*, listovi u prahu vrste *Urtica sp.* (kopriva), fino usitnjeni (veličina čestice ≤ 0,5 mm) ili mješavina listova u prahu vrste *Urtica sp.* s alfa-celulozom (1: 1); u skladu s farmakološkim standardima, za ljudsku potrošnju; dodatak suvom sedimentu	0,4 – 0,5 %
Kalcijum karbonat	CaCO3, u prahu, hemijski čisti, dodatak suvom sedimentu	0,05 – 1
Dejonizovana voda	Provodljivost ≤ 10 µS/cm, kao dodatak suvom sedimentu	30 – 50

Ukoliko se očekuju povećane koncentracije amonijaka, na primjer ako se za ispitivanu supstancu zna da inhibira nitrifikaciju, može biti korisno zamijeniti 50 % koprive u prahu bogate azotom celulozom (na primjer α-celulozom u prahu, hemijski čistom, veličina čestica ≤ 0,5 mm).

Priprema

Treset se suši na vazduhu i usitnjava u fini prašak (veličina zrna ≤ 0,5 mm, bez vidljivih ostataka biljke). Suspenzija potrebne količine treseta u prahu priprema se pomoću dijela dejonizovane vode koja se dodaje suvom sedimentu (zapremina vode od 11,5 x suva masa treseta korisna je za proizvodnju smješe treseta koja se može miješati (8)) pomoću uređaja za homogenizaciju visoke efikasnosti.

pH-vrijednost te suspenzije podešava se do 5,5 ± 0,5 pomoću $CaCO_3$. Suspenzija se kondicionira najmanje dva dana blagim miješanjem na 20 ± 2 °C kako bi se stabilizovala pHvrijednost i uspostavila stabilna mikrobna komponenta. Ponovo se mjeri pH-vrijednost i trebalo bi da iznosi 6,0 ± 0,5. Zatim se suspenzija miješa s ostalim suvim sastojcima uzimajući u obzir bilo koji udio upotrijebljen za postupak spajkinga. Dodaje se ostatak dejonizovane vode kako bi se dobio homogeni sediment. Po potrebi se ponovo mjeri pH-vrijednost i sa $CaCO_3$ se podešava od 6,5 do 7,5. Međutiim, ukoliko se očekuje stvaranje amonijaka, moglo bi biti korisno pH-vrijednost sedimenta držati ispod 7,0 (na primjer između 6,0 i 6,5). Uzimaju se uzorci sedimenta kako bi se odredili suva masa i sadržaj organskog ugljenika. Ukoliko se očekuje stvaranje amonijaka, vještački sediment može se kondicionirati sedam dana pod istim uslovima koji prevladavaju u narednom ispitivanju (na primjer odnos sedimenta i vode 1: 4, visina sloja sedimenta kao u ispitnim posudama) prije nego što mu se postupkom spajkinga doda ispitivana supstanca, odnosno potrebno ga je prekriti vodom koja bi trebalo da bude aerirana. Na kraju perioda kondicioniranja potrebno je ukloniti i baciti vodu iznad sedimenta. Uzimaju se uzorci sedimenta kako bi se odredili suva masa i ukupni sadržaj organskog ugljenika (na primjer tri uzorka).

Stoga se kvarcni pijesak obogaćen u postupku spajkinga miješa sa sedimentom za svaki nivo obrade, sediment se razdjeljuje u ispitne posude za ponavljanja i preliva se ispitnom vodom (na primjer odnos sedimenta i vode 1: 4, visina sloja sedimenta kao u ispitnim posudama). Posude se tada inkubiraju pod istim uslovima koji prevladavaju u narednom ispitivanju. Tada počinje period ujednačavanja. Vodu iznad sedimenta potrebno je aerirati.

Prije ili tokom dodavanja ispitne supstance u sediment postupkom spajkinga potrebno je dodati odabrani izvor hrane. U početku se može pomiješati sa suspenzijom treseta (v. prethodno). Međutiim, pretjerana degradacija izvora hrane prije dodavanja ispitivanih organizama, na primjer u slučaju dugog perioda ujednačavanja, može se izbjeći tako što će se period između dodavanja hrane i početka izlaganja održavati što kraćim. Kako bi se obezbijedio dovoljan kontakt s ispitivanom supstancom, potrebno je izvor hrane pomiješati sa sedimentom najkasnije na dan kada se sedimentu postupkom spajkinga dodaje ispitivana supstanca. Izuzeci se mogu učiniti kada dužina perioda ujednačavanja vodi do pretjerane mikrobne degradacije hrane prije dodavanja ispitivanih organizama. Uzimaju se uzorci sedimenta kako bi se odredili suva masa i ukupni organski ugljenik (na primjer tri uzorka obogaćenog u postupku spajkinga ili kontrolnog sedimenta).

O suvoj masi komponenata (treset, pijesak, kaolin) potrebno je izvještavati u g i u procentu ukupne suve mase.

O zapremini vode koja se dodaje suvim komponentama tokom pripreme sedimenta potrebno je izvijestiti i u procentima ukupne suve mase (na primjer 100 % suve mase + 46 % vode znači da 1 000 g suve mase ukupno primi 460 ml vode, što rezultira s 1 460 g mokrog sedimenta.

Skladištenje

Suvi sastojci vještačkog sedimenta mogu se skladištiti na suvom, hladnom mjestu na sobnoj temperaturi. Pripremljeni mokri sediment može se skladištiti (za dalju upotrebu samo u kulturi) na temperaturi od 4 ± 2 °C u mraku na period od dvije do četiri sedmice od dana pripremanja.

Sediment u koji je ispitivana supstanca dodata postupkom spajkinga potrebno je upotrijebiti odmah, osim ukoliko ne postoje podaci koji ukazuju na to da bi se taj određeni sediment mogao skladištiti, a da to nema uticaja na toksičnost i biorapoloživost ispitivane supstance. Tada se uzorci sedimenta obogaćenog u postupku spajkinga mogu skladištiti do analize u uslovima preporučenim za određenu ispitivanu supstancu.

Dodatak 6

Preporučene vrste oligoheta za ispitivanje bioakumulacije

Tubifex tubifex *(MÜLLER),*Tubificidae, Oligochaeta
Tubificidna oligoheta (*Tubificidae, Oligochaeta*) *Tubifex tubifex* (Müller) živi u slatkovodnim sedimentima u cijevima obloženim sluzi. Crvi u tim cijevima borave s glavom prema dolje, konzumirajući čestice sedimenta i koristeći se povezanim mikroorganizmima i organskim otpadom. Zadnji dio obično se talasa u vodi iznad sedimenta u respiratorne svrhe. Iako ova vrsta naseljava širok raspon vrsta sedimenta širom čitave sjeverne polulopte, *Tubifex tubifex* preferira relativno finu veličinu zrna (59).

Metode uzgoja

Kako bi se obezbijedio dovoljan broj vrste *Tubifex tubifex* za sprovođenje ispitivanja bioakumulacije, crvi treba da se čuvaju u trajnoj laboratorijskoj kulturi. Za kulturu *T. tubifex* (8) preporučuje se sistem koji se sastoji od vještačkog sedimenta na bazi vještačkog tla u skladu s ispitnom metodom C.8 (40) i obrađene vode u skladu s ispitnom metodom C.1.

Kao posude za uzgoj kulture mogu se upotrebljavati posude od stakla ili nerđajućeg čelika visine od 12 do 20 cm. Svaka posuda za uzgoj kulture puni se slojem mokrog vještačkog sedimenta pripremljenog kako je opisano u Dodatku 5. Dubina sloja sedimenta trebalo bi da omogući prirodno kopanje crva (minimalna dubina od dva cm za *T. tubifex*). Sistemu se dodaje obrađena voda. Potrebno je paziti da se smanji miješanje sedimenta. Vodena cjelina se blago aerira (na primjer dva do četiri mjehurića po sekundi s 0,45 µm filtriranog vazduha) Pasterovom pipetom smještenom približno dva centimetra iznad površine sedimenta. Preporučena temperatura kulture iznosi 20 ± 2 °C.

Crvi se dodaju sistemu kulture, a maksimalno doziranje iznosi 20 000 jedinki/m^2 površine sedimenta. Veće doziranje može prouzrokovati smanjenje brzine rasta i razmnožavanja (43). U kulturama vještačkog sedimenta crve je potrebno hraniti. Kao dodatak može se upotrebljavati prehrana koja se sastoji od fino usitnjene hrane za ribu, na primjer TetraMin® (8); Klerks 1994, lična komunikacija. Količina hrane trebalo bi da omogući dovoljan rast i

razmnožavanje i stvaranje amonijaka i rast gljivica u kulturi trebalo bi svesti na minimum. Hrana se može davati dva puta sedmično (na primjer, 0,6 – 0,8 mg po cm2 površine sedimenta). Praktično iskustvo pokazalo je da upotreba hrane koja je suspendovana i homogenizovana u dejonizovanoj vodi može olakšati raspodjelu homogenizovane hrane po površini sedimenta u posudama za uzgoj kulture.

Da bi se izbjeglo stvaranje amonijaka, vodu iznad sedimenta potrebno je mijenjati protočnim sistemom ili, najmanje jednom sedmično, ručno. Sediment je potrebno mijenjati svaka tri mjeseca u matičnim kulturama.

Ako su potrebne samo odrasle jedinke, crvi iz kulture mogu se uzorkovati prosijavanjem kulture sedimenta kroz sito od jednog milimetra. Za zadržavanje kokona pogodna je mrežica od
0,5 mm, a za mlade crve sito od 0,25 mm. Sita se mogu spustiti u obraĐenu vodu nakon što sediment prođe. Crvi izlaze iz sita i tada se mogu vaditi iz vode hvataljkom od mekog čelika ili pipetom s ivicama poliranim vatrom.

Za početak ispitivanja ili novih kultura upotrebljavaju se samo netaknute i jasno utvrĐene jedinke vrste *Tubifex tubifex* (na primjer (64)). Bolesni i povrijeĐeni crvi kao i kokoni zaraženi hifa gljivama moraju se baciti.

Sinhronizovana kultura može da obezbijedi crve određene starosne dobi u odgovarajućim intervalima po želji. Posude za uzgoj nove kulture postavljaju se u odabranim intervalima (na primjer svake dvije sedmice), počevši sa životinjama određene starosne dobi (na primjer kokonima). U opisanim uslovima kulture crvi su odrasli nakon osam do deset sedmica. Kulture se mogu skupiti kada crvi polože nove kokone, odnosno nakon deset sedmica. Uzorkovani odrasli primjerci mogu se upotrijebiti za ispitivanja, a nove kulture mogu se pokrenuti s kokonima.

Lumbriculus variegatus *(MÜLLER),* Lumbriculidae, Oligochaeta
I vrsta *Lumbriculus variegatus* (Lumbriculidae, Oligochaeta) nastanjuje slatkovodne sedimente širom svijeta i često se upotrebljava u ekotoksikološkim ispitivanjima. Informacije o biologiji, uslovima kulture i osjetljivosti vrste mogu se dobiti iz (1)(6)(9)(36). U skladu s (8) i unutar određenih ograničenja, i kultura vrste *Lumbriculus variegatus* može se uzgajati u vještačkom sedimentu preporučenom za vrstu *T. tubifex*. Budući da vrsta *L. variegatus* u prirodi preferira grublje sedimente od vrste *T. tubifex* (59), laboratorijaske kulture s vještačkim sedimentom koji se upotrebljava za vrstu *T. tubifex* mogu uginuti nakon četiri do šest mjeseci. Praktično iskustvo pokazalo je da se vrsta *L. variegatus* u pjeskovitom supstratu (na primjer kvarcni pijesak, fini šljunak) u protočnim sistemima u kojima se kao izvor prehrane upotrebljava riblja hrana može držati nekoliko godina, a da se ne obnavlja supstrat. Velika prednost vrste *L. variegatus* u odnosu na ostale vrste vodenih oligoheta je njeno brzo razmnožavanje čiji je rezultat brzo povećanje biomase u laboratorijaski uzgojenim populacijama (1)(6)(9)(10).

Metode uzgoja

Uslovi kulture za vrstu *Lumbriculus variegatus* detaljno su navedeni u: Fips i drugi (*Phipps et al.*) (1993) (10), Branson i drugi (*Brunson et al*.) (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Kratak rezime tih uslova naveden je u nastavku.

Crvi se mogu uzgajati u velikim akvarijumima (57 – 80 l) na temperaturi od 23 °C s fotoperiodom od 16L: 8D (100 – 1 000 luxa) pomoću svakodnevno obnovljene prirodne vode

(45 – 50 l po akvarijumu). Supstrat se priprema rezanjem nebijeljenih braon papirnih ubrusa u trake koje se potom nekoliko sekundi mogu miješati s vodom kulture, što rezultira malim komadima papirnog supstrata. Ovaj supstrat se zatim može direktno upotrebljavati u akvarijumima kulture *Lumbriculus* tako da se pokrije dno akvarijuma ili da se smrznut uskladišti u dejonizovanoj vodi za kasniju upotrebu. Novi supstrat u posudi obično će trajati otprilike dva mjeseca.

Svaka kultura crva pokreće se s 500 – 1 000 crva koji se hrane sa suspenzijom od 10 ml koja sadrži šest grama prve hrane za pastrmke triput sedmično u uslovima obnavljanja ili protoka.
Statičke ili polustatičke kulture trebalo bi da dobijaju manje količine hrane kako bi se spriječio rast bakterija i gljivica. Potrebno je analizirati hranu i papirni supstrat za supstance koji će se upotrebljavati u ispitivanjima bioakumulacije. Pod tim uslovima broj jedinki u kulturi se obično udvostruči za otprilike deset do 14 dana.

Vrsta *Lumbriculus variegatus* može se ukloniti iz kultura, na primjer prenošenjem supstrata finom mrežicom ili organizama u zasebnu čašu pomoću vatrom polirane staklene pipete širokog otvora (prečnik od približno 5 mm). Ako se supstrat koprenosi u tu čašu, čaša koja sadrži crve i supstrat ostavlja se tokom noći u uslovima protoka u kojima će se iz čaše ukloniti supstrat, dok će crvi ostati na dnu posude. Mogu se dodati u novopripremljene posude za uzgoj kulture ili se dalje obraĐivati za ispitivanje, kao što je navedeno pod (1) i (6). Potrebno je spriječiti povrede ili autotomiju crva, na primjer upotrebom pipeta čije su ivice polirane vatrom ili iglicama od nerĐajućeg čelika za rukovanje tim crvima.

Prilikom upotrebe vrste *L. variegatus* u ispitivanjima bioakumulacije u sedimentu kritički treba razmotriti problem njenog načina razmnožavanja (arhitomija nakon koje slijedi morfalaksa). Ovakvo aseksualno razmnožavanje rezultira s dva fragmenta koji se ne hrane tokom određenog perioda dok se ne regeneriše dio s glavom ili repom (na primjer (36)(37)). To znači da apsorpcija konzumiranjem sedimenta i supstance koja zagaĐuje u vrsti *L. variegatus* možda neće biti kontinuirana kao u tubificidima koji se ne razmnožavaju fragmentacijom.

Stoga bi trebalo ssprovesti sinhronizaciju radi minimalizovanja nekontrolisanog razmnožavanja i regeneracije i naknadne visoke varijacije u rezultatima ispitivanja. Na primjer, do takve varijacije može doći kada su neke jedinke, koje su se fragmentirale i stoga ih ne treba hraniti tokom određenog perioda, manje izložene ispitivanoj supstanci od ostalih jedinki koje se tokom ispitivanja ne fragmentišu (38). Crve je potrebno vještački fragmentisati (sinhronizacija) deset do 14 dana prije početka izlaganja (65). Trebalo bi upotrebljavati velike crve koji, po mogućnosti, ne pokazuju znake nedavne fragmentacije. Ti crvi se mogu staviti na staklo u kapi vode iz kulture i skalpelom izrezati u središnjem području tijela. Potrebno je paziti da zadnji djelovi budu slične veličine. Zadnje djelove je tada potrebno ostaviti da u posudi za uzgoj kulture koja sadrži isti supstrat koji je upotrijebljen u kulturi i obraĐenu vodu regenerišu nove glave do početka izlaganja. Regeneracija novih glava indikovana je kada sinhronizovani crvi kopaju u supstratu (prisutnost regenerisanih glava može se potvrditi pregledom reprezentativnog poduzorka pod binokularnim mikroskopom). Stoga se od ispitnih organizama očekuje da budu u sličnom fiziološkom stanju. To znači da se, kada tokom ispitivanja kod sinhronizovanih crva dolazi do regeneracije morfalaksijom, očekuje da sve životinje budu jednako izložene sedimentu koji je obogaćen u postupku spajkinga. Sinhronizovane crve potrebno je nahraniti čim počnu da kopaju po supstratu ili sedam dana nakon seciranja. Režim hranjenja trebalo bi da bude uporediv s regularnim kulturama, ali može se savjetovati hranjenje sinhronizovanih crva istim izvorom hrane koji će se upotrebljavati u ispitivanju. Crve je potrebno držati na ispitnoj temperaturi, na 20 ± 2 °C. Nakon regeneracije za ispitivanje bi

trebalo upotrebljavati netaknute cijele crve slične veličine koji aktivno plivaju ili puze na nježan mehanički podsticaj. Potrebno je spriječiti povrede ili autotomiju crva, na primjer upotrebom pipeta čije su ivice polirane vatrom ili iglicama od nerĐajućeg čelika za rukovanje tim crvima.

Zbog specifičnog načina razmnožavanja ove vrste, kada se prilikom ispitivanja upotrebljava *Lumbriculus variegatus*, tokom ispitivanja bi, ako su uslovi odgovarajući, moglo doći do povećanja u broju crva (6). Potrebno je zabilježiti izostanak razmnožavanja u ispitivanju bioakumulacije s vrstom *L. variegatus* i to razmotriti prilikom tumačenja rezultata ispitivanja.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), *Tubificidae, Oligochaeta* (nije potvrĐeno u prstenastom ispitivanju)**

Vrsta *Branchiura sowerbyi* nastanjuje različite vrste sedimenata ležišta, jezera, jezeraca i rijeka, izvorno u tropskim područjima. Može se pronaći i u tijelima tople vode sjeverne hemisfere. Međutiim, više ih je u sedimentima mulja i gline s visokim udjelom organske materije. Pored toga, crvi žive u sloju sedimenta. Čak je i zadnji dio crva obično ukopan. Ova vrsta se lako identifikuje po filamentima škrga na njihovom zadnjem dijelu. Odrasle jedinke mogu dostići dužinu od devet do 11 cm i mokru masu od 40 do 50 mg. Crvi imaju visoku stopu razmnožavanja, pokazuju vrijeme udvostručavanja populacije od najmanje dvije sedmice u uslovima temperature i hranjenja navedenim u nastavku (Aston i drugi (*Aston et al.*), 1982, (65)). Vrsta *B. sowerbyi* upotrijebljena je i u ispitivanjima toksičnosti i bioakumulacije (Markez i

Brinkarst (*Marchese & Brinkhurst*) 1996, (31), odnosno Roger i drugi (*Roghair et al*.) 1996, (67)).

Metode uzgoja

Rezime uslova kulture za vrstu *Branchiura sowerbyi* naveden je u nastavku (prema Mercedes R. Markez (*Mercedes R. Marchese*), INALI, Argentina, i Karli J. Roger (*Carli J. Roghair*), RIVM, Holandija).

Za uzgoj kulture ispitivanih organizama nije potrebna nikakva tehnika. Organizmi se mogu uzgajati pomoću nekontaminiranog prirodnog segmenta (31). Praktično iskustvo pokazalo je da, u poreĐenju s čistim prirodnim sedimentom, medijumum koji se sastoji od prirodnog sedimenta i pijeska poboljšava stanje crva. Za uzgoj kulture mogu se upotrebljavati 3 L-čaše koje sadrže 1 500 ml medijumuma sediment-voda koji se sastoji od 375 ml prirodnog nekontaminiranog sedimenta (približno 10 % ukupnog organskog ugljenika; približno 17 % čestica ≤ 63 µm), 375 ml čistog pijeska (M32) i 750 ml obraĐene vode ili vode iz slavine iz koje je uklonjen hlor. I papirni ubrusi mogu se upotrebljavati kao supstrat za uzgoj kulture, no rast populacije niži je nego u prirodnom sedimentu. U polustatičkim sistemima sloj vode u čaši polako se aerira i vodu nad sedimentom potrebno je obnavljati na sedmičnoj osnovi.

Svaka čaša na početku sadrži 25 mladih crva. Nakon dva mjeseca iz sedimenta se pincetom vade veliki crvi i stavljaju u novu čašu s novim medijumumom sedimenta-vode. I stara čaša sadrži kokone i mlade crve. Na ovaj način se po čaši može skupiti do 400 mladih crva. Odrasli crvi se za razmnožavanje mogu upotrebljavati najmanje jednu godinu.

Kulture je potrebno održavati na temperaturi od 21 do 25 °C. Varijaciju temperature potrebno je držati ispod ± 2 °C. Vrijeme potrebno za embrionalni razvoj od jajašca koje je sneseno dok mladi ne izaĐu iz kokona iznosi približno tri sedmice pri 25 °C. UtvrĐeno je da je raspon proizvodnje jajašaca dobijenih po crvu koji je preživio iz vrste *B. sowerbyi* od 6,36 (31) do 11,2

(30) u mulju pri 25 °C. Broj jajašaca po kokonu u rasponu je od 1,8 do 2,8 (66) (69) ili sve do osam (68).

Svake sedmice potrebno je mjeriti rastvoreni kiseonik, tvrdoću vode, temperaturu i pHvrijednost. Riblja hrana (na primjer TetraMin®) može se dodavati kao suspenzija dvaput ili triput sedmično *ad libitum*. Crvi se mogu hraniti i odmrznutom salatom *ad libitum*.

Velika prednost ove vrste je visoka pojedinačna biomasa (do 40 – 50 mg mokre mase po jedinki). Stoga se ova vrsta može upotrebljavati za ispitivanje bioakumulacije ispitnih supstanci koje nijesu radioaktivno obilježene. Ona se može se izložiti u sistemima koji se upotrebljavaju za *T. tubifex* ili *L. variegatus* sa samo jednom jedinkom po ponavljanju (11). Međutiim, posude za ponavljanja je tada potrebno povećati, osim ako se ne upotrebljavaju veće ispitne posude (11). Isto tako, uslov valjanosti koji je povezan s kopanjem potrebno je prilagoditi za ovu vrstu.

C.47. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI NA RIBAMA U RANOM ŽIVOTNOM STADIJUMU

1. Uvod

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 210 (2013.). Cilj je ispitivanja na ribama u ranom životnom stadijumu određivanje letalnih i subletalnih efekata hemikalija na ispitivane stadijume i vrste. Njima se dobijaju važni podaci za procjenu hroničnih letalnih i subletalnih efekata hemikalije na druge vrste riba.

1.1 Načelo ispitivanja

Ribe u ranom životnom stadijumu izlažu se različitim koncentracijama ispitivane hemikalije rastvorene u vodi. Prednost imaju protačni uslovi, no prihvatljivi su i polustatički uslovi ako to nije moguće. Dodatne informacije mogu se pronaći u Smjernici OECD-a za ispitivanje toksičnosti analitički zahtjevnih supstanci i smješa za vodene organizme. Ispitivanje započinje stavljanjem oploĐenih jajašaca u ispitne komore i nastavlja se u periodu potrebnom da ribe iz kontrolnih grupa dosegnu stadijum juvenilnih riba koje je specifično za pojedinu vrstu. Letalni i subletalni efekti procjenjuju se i upoređuju s kontrolnim vrijednostima radi određivanja najniže koncentracije s vidljivim efektom (LOEC) kako bi se utvrdilo najvišu koncentraciju bez vidljivog efekta (NOEC) i/ili vrijednost ECx (npr. EC10, EC20) primjenom regresionog modela za procjenu koncentracije koja bi izazvala x-postotnu promjenu izmjerenog efekta. Izvještavanje o koncentracijama s relevantnim efektom i parametrima može zavisiti od zakonodavnog okvira. Ispitne koncentracije trebale bi obuhvatati ECx tako da se ECx može dobiti interpolacijom, a ne ekstrapolacijom (za definicije vidjeti Dodatak 1.).

1.2 Podaci o ispitivanoj hemikaliji

Ispitivana hemikalija odnosi se na ono što se ispituje. Treba biti poznata rastvorljivost u vodi (vidjeti poglavlje A.6. ovog Priloga) i napon pare (vidjeti poglavlje A.4. ovog Priloga) ispitivane hemikalije te treba biti raspoloživa pouzdana analitička metoda za kvantifikaciju hemikalije u ispitnim rastvor s poznatom i dokumentovanom tačnošću i granicom kvantifikacije. Iako nisu nužni za sprovoĐenje ispitivanja, rezultati ispitivanja akutne toksičnosti za ribe (vidjeti poglavlja C.1. ili C.49. ovog Priloga), po mogućnosti ssprovedenog s vrstom odabranom za ovo ispitivanje, mogu pružiti korisne podatke.

Ako se ispitna metoda primjenjuje za ispitivanje smješe, potrebno je što više informacija o sastavu smješe, npr. o hemijskom identitetu njenih sastojaka, njihovoj količinskoj zastupljenosti i specifičnim svojstvima (poput prethodno navedenih). Prije upotrebe ispitne metode za
regulatorno ispitivanje smješe trebalo bi razmotriti hoće li se njome dobiti prihvatljivi rezultati za predviĐenu regulatornu svrhu.

Korisno je imati informacije o strukturnoj formuli, čistoći supstanci, rastvorljivosti u vodi, stabilnosti u vodi i na svjetlosti, vrijednostima pK_a i P_{ow} te rezultatima ispitivanja lake biorazgradivosti (vidjeti npr. poglavlja C.4. ili C.29. ovog Priloga).

1.3 Valjanost ispitivanja

Da bi ispitivanje bilo valjano, treba zadovoljiti sljedeće uslove:

— tokom cijelog ispitivanja koncentracija rastvorenog kiseonika trebala bi iznositi >60 % vrijednosti zasićenja vazduhom,

— razlike u temperaturi vode između ispitnih komora odnosno između uzastopnih dana ne bi smjele ni u jednom trenutku tokom ispitivanja biti veće od ±1,5 °C i trebale bi biti unutar temperaturnih raspona utvrĐenih za predmetnu ispitnu vrstu (Dodatak 2.),

— obavezno je analitičko mjerenje ispitnih koncentracija,

— ukupno preživljavanje oploĐenih jajašaca i uspješnost poslije izlijeganja u kontrolama i, prema potrebi, kontrolama s rastvaračem trebalo bi biti veće ili jednako graničnim vrijednostima definisanim u Dodatku 2.

Ako se uoči manje odstepene od kriterijuma valjanosti, potrebno je razmotriti posljedice u odnosu na pouzdanost podataka iz ispitivanja i ta razmatranja uključiti u izvještaj. Efekte na preživljavanje, izlijeganje ili rast koji se pojave u kontroli s rastvaračem u poređenju s negativnom kontrolom treba navesti i razmotriti u kontekstu pouzdanosti podataka iz ispitivanja.

2. opis metode

Ispitne komore

Može se upotrijebiti bilo kakva posuda od stakla, nerĐajućeg čelika ili nekog drugog hemijski inertnog materijala. Budući da je poznata velika sposobnost silikona da apsorbuje lipofilne supstanci, upotrebu silikonskih cijevi u protačnim studijama i upotrebu silikonskih brtvi u dodiru s vodom treba svesti na najmanju moguću mjeru, na primjer upotrebom jednodijelnih staklenih akvarijuma. Posude moraju biti dovoljno velike da se omogući odgovarajući rast u kontrolnoj grupi, održavanje koncentracije rastvorenog kiseonika (npr. za manje riblje vrste dovoljan je akvarijum zapremine 7 l) i usklaĐenost s kriterijumima za gustinu punjenja. Poželjno je da se ispitne posude nasumično smješte unutar ispitnog prostora. Prednost se daje nasumičnom bloknom rasporedu u kojem je svako tretiranje prisutno u svakom bloku u odnosu na posve nasumičan raspored. Ispitne posude treba zaštititi od neželjenog uznemiravanja. Ispitni sistem trebalo bi po mogućnosti kondicionirati koncentracijama ispitivane hemikalije dovoljno dugo da se prije unošenja ispitnih organizama pokažu stabilne koncentracije za izlaganje.

Izbor vrste

Preporučene riblje vrste navedene su u tabeli 1. Ne isključuje se upotreba drugih vrsta, ali to može zahtijevati prilagođavanje ispitnog postupka kako bi se osigurali prikladni ispitni uslovi. U tom slučaju treba navesti razloge za izbor vrste i eksperimentalnu metodu.

Držanje uzgojnih riba

Podaci o prikladnim uslovima za držanje uzgojnog jata mogu se naći u Dodatku 3.

Postepene s oploĐenim jajašcima, embrionima i larvama

Na početku izlaganja oploĐena jajašca, embrioni i larve mogu se položiti u manje staklene posude ili posude od nerĐajućeg čelika smještene unutar glavne posude i opremljene mrežastim stranicama odnosno krajevima kako bi se omogućio protok ispitnog rastvora kroz posudu. Neturbulentno strujanje kroz male posude može se postići na način da se posude objese o polugu koja posude njiše gore-dolje, ali tako da ispitni organizmi ostanu čitavo vrijeme uronjeni. OploĐena jajašca salmonida mogu se položiti na stalke ili mreže s otvorima koji su dovoljno veliki da larve nakon što se izliježu mogu kroz njih propasti.

Ako se za držanje jajašaca unutar glavne ispitne posude upotrebljavaju rezervoari za jajašca, rešetke ili mreže, njih je potrebno ukloniti nakon što se larve izliježu, u skladu sa smjernicama iz Dodatka 3., osim mreža, koje je potrebno zadržati kako bi se onemogućio bijeg larvi. Ako larve treba premjestiti, ne bi ih trebalo izložiti vazduhu; larve iz rezervoara za jajašca ne bi trebalo vaditi mrežicom. Vrijeme premještanja različito je zavisi od vrste i treba ga zabilježiti u izvještaju. Ipak, premještanje nije uvijek potrebno.

Voda

Kao ispitna voda može se koristiti svaka voda koja je prikladna za preživljavanje i rast ispitne vrste u dovoljno dugom periodu (vidjeti Dodatak 4.). Ona treba biti stalnog kvaliteta tokom perioda ispitivanja. Kako voda za razrjeđivanje ne bi neprimjereno uticala na rezultat ispitivanja (npr. kompleksiranjem ispitivane hemikalije) ili imala negativan uticaj na uspješnost uzgojnog jata, potrebno je u određenim razmacima uzimati uzorke na analizu. Mjerenja teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), glavnih anjona i katjona (npr. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, $SO4^{2-}$), amonijaka, ukupnih rezidualnih hlorovih pesticida, ukupnog organskog ugljenika i suspendovane čvrste supstance treba obavljati npr. svake dvije godine ako se zna da je voda za razrjeđivanje relativno stalnog kvaliteta. Ako je poznato da kvalitet vode varira, ta mjerenja treba obavljati češće; učestalost mjerenja zavisi od toga koliko kvalitet vode varira. Neka hemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje navedena su u Dodatku 4.

Ispitni rastvori

Kod protačnih je ispitivanja za dopremanje niza koncentracija u ispitne komore potreban sistem koji stalno odmjerava i razrjeĐuje matični rastvor ispitivane hemikalije (npr. dozirna pumpa, proporcionalni razrjeĐivač, sistem za zasićavanje). Protok matičnih rastvora i vode za razrjeđivanje tokom ispitivanja potrebno je provjeravati u intervalima i on tokom cijelog ispitivanja ne smije odstupati više od 10 %. Pokazalo se da je prikladan protok ekvivalentan barem pet puta većoj količini tečnosti od one sadržane u ispitnoj komori u 24 sata. Ipak, ako se poštuje gustina punjenja moguć je i manji protok (npr. dva do tri puta veći od količine tečnosti u ispitnoj komori) da se spriječi brzo ispiranje hrane.

Ispitni rastvori odabranih koncentracija pripremaju se razrjeđivanjem matičnog rastvora. Matični rastvor potrebno je po mogućnosti pripremiti jednostavnim miješanjem ili mućkanjem ispitivane hemikalije u vodi za razrjeđivanje mehaničkim sredstvima (na primjer miješanjem i/ili ultrazvukom). Za postizanje odgovarajuće koncentracije matičnog rastvora mogu se upotrebljavati kolone za zasićavanje (kolone za rastvorljivost) ili pasivne metode doziranja. Upotreba rastvarača nosača ne preporučuje se. Međutim, ako je potreban rastvarač, istovremeno je potrebno primijeniti i kontrolu sa rastvaračem s jednakom koncentracijom rastvarača kao što je ona upotrijebljena u grupama tretiranima hemikalijom; drugim riječima, nivo rastvarača trebao bi po mogućnosti biti jednak u svim koncentracijama kao i u kontroli s rastvaračem. U nekim sistemima za razrjeđivanje to bi moglo biti tehnički zahtjevno i u tom bi slučaju koncentracija rastvarača u kontroli s rastvaračem trebala biti jednaka najvišoj koncentraciji rastvarača u tretiranoj grupi. Za supstanci koje se teško ispituju potrebno je pročitati Smjernicu OECD-a br. 23 za ispitivanje toksičnosti analitički zahtjevnih supstanci i smješa za vodene organizme. Ako se upotrebljava rastvarač, izbor rastvarača će biti određen hemijskim svojstvima supstanci. U Smjernici OECD-a br. 23 preporučuje se maksimalna koncentracija od 100 µl/l. Kako bi se izbjegao eventualni efekat rastvarača na izmjerene krajnje tačke, preporučuje se da se koncentracija rastvarača svede na najmanju moguću mjeru.

Kod polustatičkog ispitivanja mogu se koristiti dva različita postupka obnavljanja. Mogu se pripremiti novi ispitni rastvori u čistim posudama te u njih oprezno premjestiti jajašca i larve koji su preživjeli, a druga mogućnost je zadržavanje ispitnih organizama u ispitnim posudama uz izmjenu dijela (najmanje dvije trećine) ispitnog rastvora ili kontrolne tečnosti.

2.1. Postupak

Uslovi izlaganja

Trajanje Ispitivanje bi trebalo početi što je prije moguće nakon oplodnje jajašaca i, po mogućnosti, njihova uranjaja u ispitni rastvor prije ili što je prije moguće nakon početka brazdanja blastodiska. Trajanje ispitivanja zavisi od vrste na kojoj se ono vrši. Informacije o preporučenom trajanju nalaze se u Dodatku 2.

Punjenje

Broj oploĐenih jajašaca na početku ispitivanja treba biti dovoljan da se zadovolje statistički zahtjevi. Jajašca treba nasumično podijeliti po tretiranim grupama, pri čemu se upotrebljava najmanje 80 jajašaca po koncentraciji, ravnodnosno rasporeĐenih u najmanje četiri ispitne komore s ponovljenim uzorcima. Gustina punjenja (biomasa po volumenu ispitnog rastvora) treba biti dovoljno niska da se koncentracija rastvorenog kiseonika može održati barem na nivou 60 % vrijednosti zasićenja vazduhom bez aeracije tokom stadijuma jajašaca i larvi. Preporučena gustina punjenja kod protačnih ispitivanja iznosi najviše 0,5 g/l mokre mase u 24 sata i najviše 5 g/l rastvora u bilo kojem trenutku. *Svjetlo i temperatura*

Fotoperiod i temperaturu vode potrebno je prilagoditi ispitnoj vrsti (vidjeti Dodatak 2.).

Hranjenje

Hrana i hranjenje kritični su i bitno je za svaki stadijum osigurati pravilnu hranu u odgovarajuće vrijeme i u količinama dovoljnim za normalan rast. Hranjenje bi trebalo biti približno jednako u svim posudama s ponovljenim uzorcima osim ako se prilagođava kako bi se u obzir uzela smrtnost. Višak hrane i izmet potrebno je po potrebi ukloniti kako bi se izbjeglo nakupljanje otpada. Detaljan opis režima hranjenja nalazi se u Dodatku 3., a na osnovu stečenog iskustva hrana i režimi hranjenja neprestano se unapreĐuju u cilju optimizacije rasta i poboljšavanja preživljavanja. Živa hrana način je poboljšavanja uslova za život riba i stoga bi je trebalo upotrebljavati umjesto suve ili smrznute hrane ili kao dopunu takvoj hrani kad god je to primjereno za vrstu i životni stadijum. *Ispitne koncentracije*

U pravilu je potrebno pet koncentracija ispitivane hemikalije s najmanje četiri ponovljena uzorka po koncentraciji koje se meĐusobno razlikuju za stalni faktor koji ne prekoračuje 3,2. Pri izboru raspona ispitnih koncentracija trebalo bi uzeti u obzir, ako su dostupni, podatke iz ispitivanja akutne toksičnosti, po mogućnosti s istom vrstom, i/ili iz ispitivanja za utvrđivanje raspona. Pri izboru raspona ispitnih koncentracija trebalo bi razmotriti sve izvore informacija uključujući i izvore kao što je, na primjer, analogno prenošenje podataka iz ispitivanja akutne toksičnosti za embrione riba. Ispitivanje granične koncentracije, ili prošireno ispitivanje granične koncentracije, s manje od pet koncentracija kao glavno ispitivanje može biti prihvatljivo ako treba utvrditi samo empirijske vrijednosti NOEC-a. Ako se upotrebljava manje od pet koncentracija, treba dati obrazloženje. Ne treba ispitivati koncentracije ispitivane hemikalije iznad LC_{50} nakon 96 sati ili 10 mg/l, zavisno od toga što je manje.

Kontrole

Ispitivanje niza koncentracija ispitivane hemikalije trebalo bi biti propraćeno kontrolom s vodom za razrjeđivanje i, prema potrebi, kontrolom koja sadrži samo rastvarač nosač.

Učestalost analitičkih određivanja i mjerenja

Prije početka perioda izlaganja potrebno je osigurati pravilno funkcionisanja sistema dovoda hemikalije za sve posude s ponovljenim uzorcima (na primjer mjerenjem ispitnih koncentracija). Potrebno je utvrditi potrebne analitičke metode, uključujući odgovarajuću granicu kvantifikacije (LOQ), i saznanja o stabilnosti supstanci u ispitnom sistemu. Tokom ispitivanja, koncentracije ispitivane hemikalije utvrĐuju se u redovnim vremenskim razmacima kako bi se odredila izloženost. Potrebno je najmanje pet određivanja. U protačnim sistemima trebalo bi barem jedanput nedeljno ssprovesti analitička mjerenja

ispitivane hemikalije u jednoj posudi s ponovljenim uzorcima za svaki nivo koncentracije sistemno mijenjajući posude s ponovljenim uzorcima. Dodatnim analitičkim određivanjima često će se poboljšati kvalitet rezultata ispitivanja. Može biti potrebno filtriranje uzoraka kako bi se uklonile lebdeće čestice (npr. primjenom veličine pora 0,45 μm) ili njihovo centrifugiranje kako bi se osiguralo da se određivanja sprovode na hemikaliji u stvarnom rastvoru. Radi smanjivanja adsorpcije ispitivane hemikalije filtri trebaju biti zasićeni prije upotrebe. Ako se izmjerene koncentracije ne zadržavaju u granicama od 80 do 120 % nazivne koncentracije, koncentracije s efektom trebalo bi odrediti i izraziti u odnosu na aritmetičku sredinu koncentracije u protačnim ispitivanjima (vidjeti Dodatak 6. koji se odnosi na ispitnu metodu C.20. za izračunavanje aritmetičke sredine), odnosno u odnosu na geometrijsku sredinu izmjerenih koncentracija u polustatičkim ispitivanjima (vidjeti Poglavlje 5. u Smjernici OECD-a za ispitivanje toksičnosti analitički zahtjevnih supstanci i smješa za vodene organizme).

Tokom ispitivanja trebalo bi barem jedanput nedeljno mjeriti rastvoreni kiseonik, pH i temperaturu u svim ispitnim posudama te salinitet i tvrdoću vode, ako je potrebno, na početku i na kraju ispitivanja. Temperaturu po mogućnosti treba neprekidno pratiti u najmanje jednoj ispitnoj posudi. **Zapažanja**

Stadijum embrionalnog razvoja: embrionalni stadijum na početku izlaganja ispitivanoj hemikaliji treba provjeriti što je preciznije moguće. To se može učiniti pomoću reprezentativnog uzorka jajašaca koja su na prikladan način konzervirana i očišćena.

Izlijeganje i preživljavanje

Izlijeganje i preživljavanje treba pdokumentovati. Ako se u ranoj fazi embrionalnog razvoja primijete gljivice na jajašcima (npr. osmatrati najmanje jedanput dnevno i relevantne brojke tokom prvog ili drugog dana ispitivanja), ta jajašca treba prebrojiti i ukloniti. Mrtve embrione, larve i juvenilne ribe treba ukloniti čim ih se uoči jer se mogu brzo raspasti i druge ih ribe mogu raskomadati. Kod uklanjanja mrtvih jedinki nužan je krajnji oprez kako bi se izbjeglo fizičko ozljeĐivanje susjednih jajašaca i larvi. Znaci smrti razlikuju se u zavisnosti od vrste i životnom stadijumu jedinke. Na primjer za oploĐena jajašca: posebno u ranim stadijimima, vidan gubitak prozirnosti i promjena boje zbog koagulacije i/ili taloženja proteina, što rezultira bjelkasto-mutnim izgledom, dok za embrione, larve i juvenilne ribe: nepokretnost i/ili odsutnost pokreta disanja i/ili odsutnost otkucaja srca i/ili izostanak reakcije na mehaničke podražaje.

Neuobičajen izgled: broj larvi ili juvenilnih riba u kojih su vidljive anomalije u obliku tijela treba bilježiti u odgovarajućim vremenskim razmacima u zavisnosti od trajanja ispitivanja i vrste opisane anomalije. Važno je napomenuti da je pojava abnormalnih larvi i juvenilnih riba prirodna i da ih kod nekih vrsta u kontroli odnosno kontrolama može biti i više postotaka. U slučajevima kad se deformacije i s njima povezano neuobičajeno ponašanje smatraju toliko ozbiljnima da uzrokuju značajnu patnju organizma te kad je anomalija došla do tačke nakon koje oporavak nije moguć, organizam se može ukloniti iz testiranja. Te životinje treba usmrtiti i u kasnijoj analizi podataka tretirati kao uginule. Za većinu vrsta preporučenih u ovoj ispitnoj metodi zabilježen je normalan embrionalni razvoj.

Neuobičajeno ponašanje: anomalije, npr. hiperventilaciju, nekoordinirano plivanje, neuobičajenu mirnoću i neuobičajeno ponašanje pri hranjenju, treba bilježiti u odgovarajućim vremenskim razmacima, u zavisnosti od trajanja ispitivanja (npr. jednom dnevno za toplovodne vrste). Iako ih je teško kvantifikovati, ti efekti mogu, ako se uoče, pomoći pri tumačenju podataka o smrtnosti.

Težina: na kraju ispitivanja sve preživjele ribe vagaju se najmanje na osnovi posuda s ponovljenim uzorcima (pri čemu se izvještava o broju životinja u posudama s ponovljenim uzorcima i o srednjoj težini po životinji); prednost se daje mokroj masi (ribe osušene upijajućim materijalom), ali se mogu dostaviti i podaci o suvoj masi.

Dužina: na kraju ispitivanja mjere se pojedinačne dužine. Preporučuje se mjerenje ukupne dužine, ali u slučaju truleži repne peraje ili erozije peraje treba koristiti standardnu dužinu. Trebalo bi primjenjivati istu metodu za sve ribe u određenom ispitivanju. Pojedinačna dužina može se izmjeriti, na primjer, digitalnom kamerom ili kalibrisanim okularnim mikrometrom. Tipične minimalne dužine definisane su u Dodatku 2.

3. Podaci i izvještavanje Obrada rezultata

Preporučuje se da plan ispitivanja i izbor statističkog testa omogućuju odgovarajuću snagu (80 % ili više) za otkrivanje promjena od biološke važnosti na krajnjim tačkama na kojima se izvještava o NOEC-u. Ako je potrebno izvijestiti o vrijednosti EC_x, plan ispitivanja i izbor regresionog modela trebali bi omogućiti procjenu vrijednosti EC_x tako da

1) interval pouzdanosti od 95 % za vrijednost EC_x ne sadrži nulu i nije preširok,
2) interval pouzdanosti od 95 % za predviĐenu srednju vrijednost na EC_x ne sadrži kontrolnu srednju vrijednost
3) nema značajne neprilagoĐenosti regresionog modela u odnosu na podatke.

Svaki od tih pristupa zahtijeva utvrđivanje postotka promjene na svakoj krajnjoj tački koji je važan za otkrivanje ili procjenu. Plan ispitivanja trebao bi biti osmišljen tako da to omogući. Kada prethodno navedeni uslovi za određivanje vrijednosti EC_x nisu ispunjeni, treba primijeniti pristup NOEC. Nije vjerovatno da će se isti postotak promjene odnositi na sve krajnje tačke kao ni da će se moći osmisliti izvediv eksperiment koji bi zadovoljio te kriterijume za sve krajnje tačke i stoga je važno povesti računa na krajnje tačke koje su bitne za eksperiment pri odgovarajućem planiranju eksperimenta. Statistički dijagrami toka i smjernice za svaki pristup navedeni su u dodacima 5. i 6. kao vodič za obradu podataka i prilikom izbora najprimjerenijeg statističkog testa ili modela. Mogu se primjenjivati i drugi statistički pristupi uz uslov da su naučno opravdani.

Bit će potrebna analiza varijacija u svakom skupu ponovljenih uzoraka primjenom analize varijance ili tabela kontingencije i primjena odgovarajućih metoda statističke analize na osnovu te analize. Kako bi se izvršila višestruko poređenje između rezultata pojedinačnih i kontrolnih koncentracija, preporučuje se Jonckheere-Terpstraov ili Williamsov test trenda postupnim snižavanjem za kontinuirane odgovore odnosno Cochran-Armitageov test trenda postupnim snižavanjem za kvantalne odgovore koji su u skladu s monotoničnim odnosom između koncentracije i odgovora i kod kojih nema znakova ekstrabinomne varijance. Kad postoje znaci ekstrabinomne varijance, preporučuje se Rao-Scottova modifikacija Cochran-Armitageova testa odnosno Williamsov ili Dunnettov test (nakon transformacije arkus sinusa drugog korijena) ili Jonckheere-Terpstraov test primijenjen na udjele ponovljenih uzoraka. Ako podaci nisu u skladu s monotoničnim odnosom između koncentracije i odgovora, za kontinuirane odgovore mogle bi biti korisne Dunnettova ili Mann-Whitneyjeva metoda, a za kvantalne odgovore Fisherov egzaktni test. Pri primjeni bilo koje statističke metode ili modela treba paziti da se ispune zahtjevi metode ili modela (npr. varijabilnost od jedne komore do druge procjenjuje se i uzima u obzir u planu ispitivanja te u primijenjenom ispitivanju ili modelu). Treba ocijeniti normalnost podataka, a u Dodatku 5. navedeno je što treba učiniti s rezidualima iz ANOVA-e. U Dodatku 6. nalaze se dodatna razmatranja u pogledu regresionog pristupa. Razmotriti primjenu transformacija radi ispunjavanja uslova

statističkog testa. Međutim, transformacije kojima se omogućava prilagođavanje regresionog modela zahtijevaju veliku pažnju budući da, na primjer, promjena od 25 % u netransformisanom odgovoru ne odgovara promjeni od 25 % u transformisanom odgovoru. U svim je analizama jedinica analize ispitna komora, a ne pojedina riba, pa bi eksperimentalna jedinica, testovi hipoteze i regresija trebali to odražavati.

3.1. Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži sljedeće podatke:

Ispitivana hemikalija:

supstanca s jednim sastojkom:

— fizički izgled, rastvorljivost u vodi i druga relevantna fizičko-hemijska svojstva,

— podaci za hemijsku identifikaciju supstanci, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, oznaka SMILES ili InChI, strukturna formula, čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je praktički izvodivo itd. (uključujući udio organskog ugljenika, prema potrebi), supstanca s više sastojaka, supstance nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcioni proizvodi i biološki materijali (UVCB supstanci) i smješe:

— opis (koliko je to moguće) hemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativni udio i relevantna fizičko-hemijska svojstva sastojaka.

Ispitne vrste:

— naučni naziv, soj, porijeklo, metoda sakupljanja oplođenih jajašaca i kasnije postepene. *Uslovi ispitivanja:*

— ispitni postupak (npr. polustatički ili protačni, punjenje),
— fotoperiod(i),

— plan ispitivanja (npr. broj ispitnih komora i ponovljenih uzoraka, broj jajašaca u svakom ponovljenom uzorku, materijal i veličina ispitne komore (visina, širina, zapremina), količina vode po ispitnoj komori),

— način pripreme matičnih rastvora i učestalost obnavljanja (ako se koristi sredstvo za rastvaranje, trebalo bi ga navesti zajedno s koncentracijom),

— metoda doziranja ispitivane hemikalije (npr. pumpama, sistemima za razrjeđivanje),

— iskoristivost metode i nazivnih ispitnih koncentracija, granica kvantifikacije, srednje izmjerene vrijednosti i njihove standardne devijacije u ispitnim posudama te metoda kojom su one dobijene i dokazi da se izmjerene vrijednosti odnose na koncentracije ispitivane hemikalije u stvarnoj rastvoru,

— svojstva vode za razrjeđivanje: pH, tvrdoća, temperatura, koncentracija rastvorenog kiseonika, rezidualni hlor (ako se mjeri), ukupni organski ugljenik (ako se mjeri), suspendovana čvrsta supstncaa (ako se mjeri), salinitet ispitnog medijumuma (ako se mjeri) i ostala sprovedena mjerenja,

— kvalitet vode u ispitnim posudama, pH, tvrdoća, temperatura i koncentracija rastvorenog kiseonika,

— detaljne informacije o hranjenju (npr. vrsta ili vrste hrane, izvor, količina hrane i učestalost hranjenja).

Rezultati o kojima se izvještava pojedinačno (ili na osnovu ponovljenih uzoraka) te kao srednja vrijednost i koeficijent varijacije, prema potrebi, za sljedeće krajnje tačke:

— dokaz da kontrole zadovoljavaju opšti standard prihvatljivosti stopa preživljavanja za ispitnu vrstu (Dodatak 2.),

— podaci o smrtnosti u svakom stadijumu (embrioni, larve i juvenilne ribe) i ukupnoj smrtnosti,

— broj dana do izlijeganja, broj larvi koje se svaki dan izliježu i kraj izlijeganja,

— broj zdravih riba na kraju ispitivanja,

— podaci o dužini (navesti je li riječ o standardnoj ili ukupnoj dužini) i težini preživjelih životinja,

— pojavnost, opis i broj morfoloških anomalija, ako ih ima,

— pojavnost, opis i broj efekata na ponašanje, ako ih ima,

— pristup za statističku analizu (regresijska analiza ili analiza varijance) i obrada podataka (primijenjeni statistički test ili model),

— najviša koncentracija bez vidljivog efekta (NOEC) za svaki ocijenjeni odgovor,

— najniža koncentracija s vidljivim efektom (pri p = 0,05) za svaki ocijenjeni odgovor (LOEC),

— EC_x za svaki ocijenjeni odgovor, ako je primjenjivo, intervali pouzdanosti (npr. 90 % ili 95 %) i grafikon prilagođenog modela primijenjenog za izračunavanje vrijednostosti ECx, nagib krive koncentracija-odgovor, formula regresionog modela, procijenjeni parametri modela i njihove standardne greške.

Sva odstepena od ove ispitne metode.

Rasprava o rezultatima, uključujući i sve uticaje odstepena od ove ispitne metode na rezultate ispitivanja.

Tabela 1. Preporučene riblje vrste za ispitivanje

SLATKOVODNE	**ESTUARIJSKE i MORSKE**
Oncorhynchus mykiss kalifornijska pastrva	*Cyprinodon variegatus* ovčjeglava gavčica
Pimephales promelas debeloglava gavčica	Menidia sp. Menidia sp.
Danio rerio zebrica	
Oryzias latipes medaka	

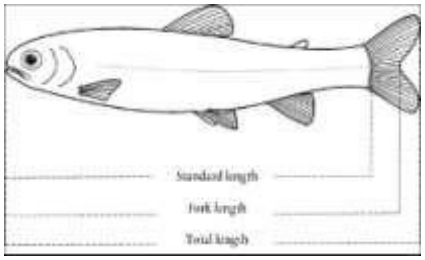
Dodatak 1.

DEFINICIJE

Vilična dužina (FL): odnosi se na dužinu od vrha usta do kraja srednjih šipčica repne peraje i primjenjuje se na ribe kod kojih je teško odrediti gdje završava kičma.

Standardna dužina (SL): odnosi se na dužinu ribe izmjerenu od vrha usta do zadnjeg kraja zadnjeg pršljena ili do zadnjeg kraja srednjeg bočnog dijela hipuralne ploče. Jednostavnije rečeno, pri mjerenju se isključuje dužina repne peraje.

Ukupna dužina (TL): odnosi se na dužinu od vrha usta do vrha dužeg režnja repne peraje, obično mjereno na režnjevima stisnutima duž središnje linije. Mjeri se u ravnoj liniji, a ne uz krivu tijela.



Slika 1. Opis različitih dužina koje se primjenjuju

EC_x: (koncentracija s efektom od x %) je koncentracija koja u određenom periodu izlaganja izaziva x-postotni efekat na ispitne organizme u poređenju s kontrolom. Na primjer, EC_{50} je koncentracija za koju se procjenjuje da stvara efekat na krajnju tačku ispitivanja u 50 % izložene populacije tokom određenog perioda izlaganja.

Najniža koncentracija s vidljivim efektom (LOEC) najniža je ispitana koncentracija ispitivane hemikalije kod koje je uočen statistički značajan efekat hemikalije (pri $p < 0,05$) u poređenju s kontrolom. Ipak, sve ispitne koncentracije iznad LOEC-a trebale bi imati štetan efekat jednak onom koji je zabilježen pri LOEC-u ili veći od njega. Ako ta dva uslova nisu ispunjena, treba dati detaljno obrazložiti kako je odabran LOEC (a prema tome i NOEC). Smjernice se nalaze u dodacima 5. i 6.

Najviša koncentracija bez vidljivog efekta (NOEC) ispitna je koncentracija neposredno ispod LOEC-a koja unutar navedenog perioda izlaganja nema statistički značajan efekat ($p < 0,05$) u poređenju s kontrolom.

UVCB: supstance nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcioni proizvodi i biološki materijali.

IUPAC: MeĐunarodna unija za čistu i primijenjenu hemiju.

SMILES: *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*.

Dodatak 2.

USLOVI ISPITIVANJA, TRAJANJE I KRITERIJUMI PREŽIVLJAVANJA ZA PREPORUČENE VRSTE

Vste	Uslovi ispitivanja			Preporučeno trajanje ispitivanja	Tipična minimalna srednja ukupna dužina riba iz kontrolnih grupa na kraju istraživanja (mm)[78]	Preživljavanje u kontrolnim grupama (minimalno)	
	Temperatura (° C)	Salinitet (0/00)	Fotoperiod (u satima)			Uspješnost izlijeganja	Uspješnost poslije izlijeganja

[78] Tipična minimalna srednja ukupna duţina nije kriterijum valjanosti, no trebalo bi paţljivo razmotriti odstupanja ispod navedenih vrijednosti u odnosu na osjetljivost ispitivanja. Minimalna srednja ukupna duţina bazira se na odabranim podacima kojima se raspolaţe.

Slatkovodne:							
Oncorhynchus mykiss kalifornijska pastrva	10 ± 1,5[79]		12 – 16[80]	dvije nedelje nakon početka samostalnog uzimanja hrane riba iz kontrolnih grupa (ili 60 dana nakon izlijeganja)	40	75 %	75 %
Pimephales promelas debeloglava gavčica	25 ± 1,5		16	32 dana nakon početka ispitivanja (ili 28 dana nakon izlijeganja)	18	70 %	75 %
Danio rerio zebrica	26 ± 1,5		12 – 16[4]	30 dana nakon izlijeganja	11	70 %	75 %
Oryzias latipes medaka	25 ± 2		12 – 16	30 dana nakon izlijeganja	17	80 %	80 %
Estuarijske i morske:							
Cyprinodon variegatus ovčjeglava gavčica	25 ± 1,5	15 – 35[5]	12 – 16	32 dana nakon početka ispitivanja (ili 28 dana nakon izlijeganja)	17	75 %	80 %
Menidia sp. Menidia sp.	22 – 25	15 – 35	13	28 dana	20	80 %	60 %

SMJERNICE ZA HRANJENJE UZGOJNIH I ISPITNIH RIBA PREPORUČENIH VRSTA I
ZA POSTEPENE S NJIMA

VRSTE	HRANA[6]			VRIJEME PREMJEŠTAJA NAKON	VRIJEME DO PRVOG
	Uzgojne	**Novoizvaljene**	**Juvenilne ribe**		

[79] Zavisi od soja kalifornijske pastrve koji se ispituje, moţda će trebati primijeniti druge temperature. Uzgojno jato mora se drţati na temperaturi jednakoj onoj koja se upotrebljava za jajašca. Nakon primanja jajašaca od komercijalnog uzgajivača potrebno je kratko prilagoĎavanje (npr. sat ili dva) na ispitnu temperature.

[80] Larve se drţe u tami nedelju dana nakon izlijeganja, osim za vrijeme pregleda, a zatim se tokom cijelog ispitivanja drţe pod prigušenom rasvjetom (fotoperiod 12 – 16 sati) 4 U svim uslovima ispitivanja reţim svjetlosti mora biti konstantan.

	ribe	larve	Vrsta	Učestalost	IZLIJEGANJA	HRANJENJA
Slatkovodne:						
Oncorhynchus mykiss kalifornijska pastrva	hrana za pastrve	nema[7]	početna hrana za pastrve BSN	2 – 4 hranjenja dnevno	14 – 16 dana nakon izlijeganja ili pri isplivavanju (nije nužno)	19 dana nakon izlijeganja ili pri isplivavanju (nije nužno)
Pimephales promelas debeloglava gavčica	BSN, hrana u listićima FBS	BSN	BSN48, hrana u listićima	2 – 3 puta dnevno	pri izlijeganju od 90 %	2 dana nakon izlijeganja
Danio rerio zebrica	BSN, hrana u listićima	komercijalno dostupna hrana za larve, praživotinje[8], proteini[9]	BSN48, hrana u listićima	BSN jednom dnevno; hrana u listićima dvaput dnevno	pri izlijeganju od 90 %	2 dana nakon izlijeganja
Oryzias latipes medaka	hrana u listićima	BSN, hrana u listićima (ili praživotinje ili kolnjaci)	BSN48, hrana u listićima (ili kolnjaci)	BSN jednom dnevno; hrana u listićima dvaput dnevno ilihrana u listićima i kolnjaci jednom dnevno	nije primjenjivo	6 – 7 dana nakon mriješćenja
Estuarijske i morske:						
Cyprinodon variegatus ovčjeglava gavčica	BSN, hrana u listićima FBS	BSN	BSN48	2 – 3 hranjenja dnevno	nije primjenjivo	1 dan nakon izlijeganja ili po isplivavanju
Menidia sp. Menidia sp.	BSN48, hrana u listićima	BSN	BSN48	2 – 3 hranjenja dnevno	nije primjenjivo	1 dan nakon izlijeganja ili po isplivavanju

5 Za svako ispitivanje mora biti u okvirima ± 2 0/00.

6 Hranu treba davati do sitosti. Suvišnu hranu i izmet potrebno je po potrebi ukloniti kako bi se izbjeglo nakupljanje otpada.

7 larvama sa žumanjčanom vrećicom nije potrebna hrana

8 filtrirane iz miješane kulture
9 granule iz procesa fermentacije

FBS zamrznuti račići Artemia; odrasli račići Artemia
BSN larve račića Artemia; novoizvaljene
BSN48 larve račića Artemia; starost 48 sati

Dodatak 4.

NEKA HEMIJSKA SVOJSTVA PRIHVATLJIVE VODE ZA RAZRJEĐIVANJE

Komponenta	**Granična koncentracija**
lebdeće čestice	5 mg/l
ukupni organski ugljenik	2 mg/l
nejonizovani amonijak	1 µg/l
rezidualni hlor	10 µg/l
ukupni organofosforni pesticidi	50 ng/l
ukupni organohlorni pesticidi plus polihlorovani bifenili	50 ng/l
ukupni organski hlor	25 ng/l
aluminijum	1 µg/l
arsen	1 µg/l
krom	1 µg/l
kobalt	1 µg/l
bakar	1 µg/l
gvožĐe	1 µg/l
olovo	1 µg/l
nikal	1 µg/l
cink	1 µg/l
kadmijum	100 ng/l
živa	100 ng/l

srebro	100 ng/l

Dodatak 5.

STATISTIČKE SMJERNICE ZA ODREĐIVANJE NOEC-A

Jedinica analize je akvarijum s ponovljenim uzorkom. Stoga za kontinuirana mjerenja, na primjer veličine, treba izračunati srednju vrijednost ili medijan ponovljenog uzorka i te su vrijednosti ponovljenog uzorka podaci za analizu. Treba dokazati snagu testova, po mogućnosti na osnovu odgovarajuće baze podataka sa podacima za svaku laboratorijau. Za svaku krajnju tačku treba navesti promjenu veličine koja se može otkriti sa snagom od 75 do 80 % uz statistički test koji će se primijeniti.

Pomoću baza podataka koje su na rapolaganju u trenutku razvoja ove ispitne metode utvrĐuje se snaga koja je moguća uz primjenu preporučenih statističkih postupaka. Pojedine laboratorijae trebaju dokazati svoju sposobnost ispunjavanja tog uslova u pogledu snage sprovoĐenjem analize snage ili dokazivanjem da koeficijent varijacije (CV) za svaki odgovor ne prelazi 90 posto koeficijenata varijacije primijenjenih u razvoju smjernice za ispitivanje. Ti se koeficijenti nalaze u tabeli 1. Ako su dostupne samo srednje vrijednosti ili medijani ponovljenog uzorka, koeficijent varijacije unutar ponovljenog uzorka može se zanemariti.

Tabela 1. 90 posto koeficijenata varijacije (CV) za odabrane slatkovodne vrste

Vrsta	Odgovor	CV meĐu ponovljenim uzorcima	CV unutar ponovljenih uzoraka
kalifornijska pastrva	dužina	17,4	9,8
	težina	10,1	28
debeloglava gavčica	dužina	16,9	13,5
	težina	11,7	38,7
zebrica	dužina	43,7	11,7
	težina	11,9	32,8

Za gotovo sve statističke testove koji se primjenjuju za ocjenu laboratorijaskih toksikoloških studija od interesa su poređenja između tretiranih grupa i kontrole. Stoga nije primjereno zahtijevati značajan F-test analize varijance (ANOVA) prije primjene Dunnettova ili Williamsova testa ili značajan Kruskal-Wallisov test prije primjene Jonckheere-Terpstraova, Mann-Whitneyjeva ili Dunnova testa.

Dunnettov test ima ugrađeno prilagođavanje multipliciteta i na njegov udio lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata negativno utiče primjena F-testa kao mjere nadzora. Na sličan se način Williamsovim i Jonckheere-Terpstraovim testom trenda postupnim snižavanjem primjenom nivoa značajnosti od 0,05 u svakom koraku održava ukupan udio lažno pozitivnih rezultata od 5 %, a na taj udio i snagu testa negativno utiče primjena F-testa ili KruskalWallisova testa kao mjere nadzora. Mann-

Whitneyjev i Dunnov test treba prilagoditi s obzirom na multiplicitet; preporučuje se Bonferroni-Holmova prilagođavanje.

Detaljna rasprava o većini preporuka u pogledu testiranja hipoteza i provjere valjanosti pretpostavki na kojima se baziraju ti testovi nalazi se u Smjernici OECD-a iz 2006., koja sadržava i opsežnu bibliografiju.

Postepene s kontrolama ako se upotrebljava rastvarač

Ako se upotrebljava rastvarač, treba uključiti kontrolu s vodom za razrjeđivanje i kontrolu s rastvaračem. Te dvije kontrole treba uporediti u odnosu na svaki odgovor i kombinovati za statističku analizu ako se među njima ne utvrdi znatna razlika. U suprotnom bi trebalo primijeniti kontrolu s rastvaračem za određivanje NOEC-a ili procjenu vrijednosti EC_x, a kontrola s vodom se ne primjenjuje. Vidjeti ograničenja kriterijuma valjanosti.

Za vrijednosti dužine, težine, udjela izlijeganja iz jajašaca, smrtnosti larvi ili abnormalnih larvi te za prvi ili zadnji dan izlijeganja ili isplivavanja treba primijeniti T-test ili Mann-Whitneyjev test radi poređenja kontrole s vodom za razrjeđivanje i kontrole s rastvaračem s nivoom značajnosti od 0,05, zanemarujući sve tretirane grupe. U izvještaju treba navesti rezultate tih testova.

Mjerenja veličine (dužine i težine)

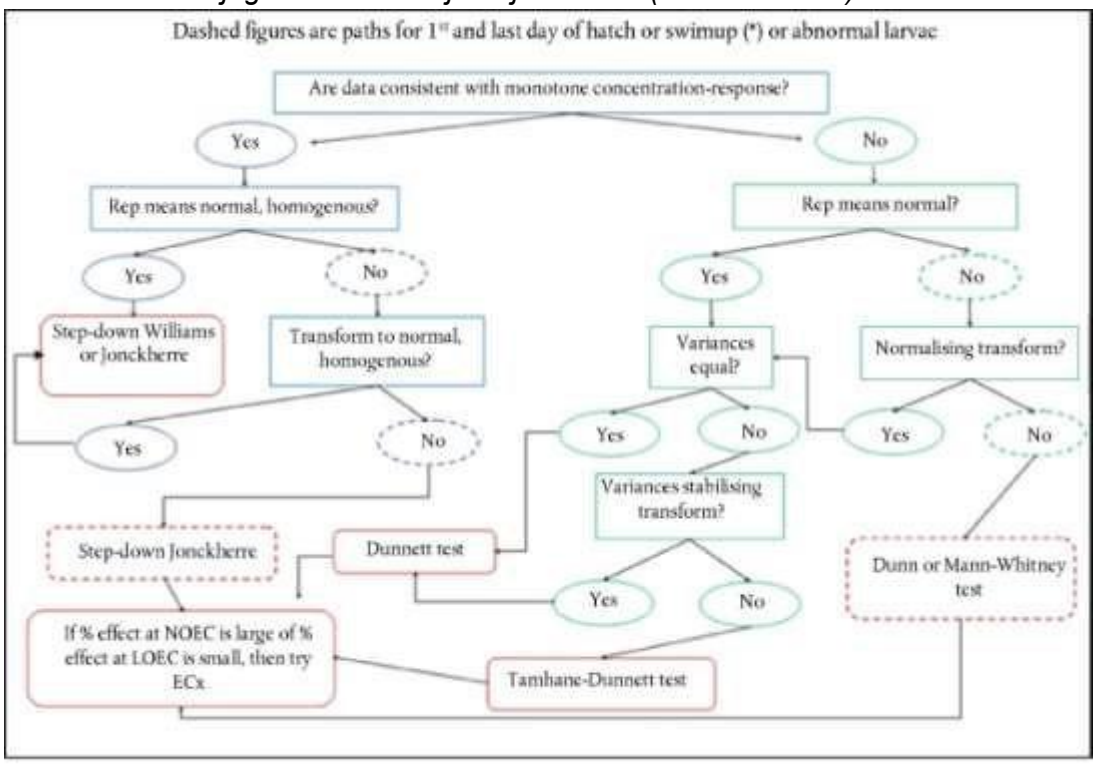
Vrijednosti dužine i težine pojedinih riba mogu biti normalno ili lognormalno distribuirane. U oba su slučaja srednje vrijednosti ponovljenih uzoraka obično normalno distribuirane zahvaljujući centralnom graničnom teoremu i potvrđene podacima iz preko 100 studija na ribama triju slatkovodnih vrsta u ranom životnom stadijumu. Ako podaci ili baze podataka s prošlim podacima ukazuju na lognormalnu distribuciju vrijednosti veličine pojedinih riba, druga je mogućnost izračunavanje logaritama srednjih vrijednosti ponovljenih uzoraka za pojedine ribe, a u tom slučaju podaci za analizu mogu biti antilogaritmi tih logaritama srednjih vrijednosti ponovljenih uzoraka.

Dosljednost podataka treba ocijeniti normalnom distribucijom i homogenošću varijance. U tu svrhu treba upotrijebiti reziduale iz ANOVA-e s koncentracijom kao jedinom eksplanatornom varijablom klase. Može se primijeniti vizualno određivanje na osnovu dijagrama rasipanja i histograma ili dijagrama „stabljika – list". Druga je mogućnost primjena formalnog testa kao što je Shapiro-Wilkov ili Anderson-Darlingov test. Dosljednost s homogenošću varijance može se ocijeniti vizualnim pregledom istog dijagrama rasipanja ili, formalno, Leveneovim testom. Normalnost ili homogenost varijance treba ocijeniti samo za parametarske testove kao što su Williamsov ili Dunnettov test. Treba obratiti pažnju na moguće netipične vrijednosti (eng. *outliers*) i njihov uticaj na analizu. Mogu se primijeniti Tukeyev test netipičnih vrijednosti i vizualni pregled istih gore opisanih dijagrama reziduala. Treba imati na umu da su zapažanja čitavi ponovljeni uzorci, pa se ispuštanje netipičnih vrijednosti iz analize može učiniti tek nakon pomnog razmatranja.

Statistički testovi u kojima se primjenjuju plan ispitivanja i biološka očekivanja su testovi trenda postupnim snižavanjem, na primjer Williamsov i Jonckheere-Terpstraov test. U tim se testovima pretpostavlja monoton odnos između koncentracije i odgovora, a dosljednost podataka treba ocijeniti vodeći računa o toj pretpostavci. To se može učiniti vizualno na osnovu dijagrama rasipanja srednje vrijednosti ponovljenih uzoraka u odnosu na ispitnu koncentraciju. Pritom je korisno prekriti taj dijagram rasipanja djelimično linearnim dijagramom i povezati srednje vrijednosti koncentracije ponderisane veličinom ponovljenog uzorka. Veliko odstepene tog djelimično linearnog dijagrama od monotoničnosti ukazivalo bi na moguću potrebu primjene testova koji

nisu testovi trenda. Kao druga mogućnost mogu se primijeniti formalna ispitivanja. Jednostavan formalni test je izračunavanje linearnih i kvadratnih kontrasta srednjih vrijednosti koncentracije. Ako je kvadratni kontrast značajan, a linearni kontrast nije značajan, to ukazuje na mogući problem s monotoničnošću koju bi trebalo dodatno ocijeniti na osnovu dijagrama. Ako bi normalnost ili homogenost varijance mogla predstavljati problem, ti se kontrasti mogu konstruisati na osnovu transformisanja apsolutnih podataka u raspored. Mogu se primijeniti i alternativni postupci, na primjer Bartholomewov test monotoničnosti, no njima se ispitivanje čini složenijim.

Slika 2.: *NOEC – dijagram toka za mjerenja veličine (dužine i težine)*



(*) Ti odgovori nikad ne udovoljavaju pretpostavkama za parametarsku analizu ili modele.

Osim ako podaci nisu u skladu sa zahtjevima za te testove, NOEC se određuje primjenom
Williamsova ili Jonckheere-Terpstraova testa trenda postupnim snižavanjem. Detaljni opis tih postupaka nalazi se u dokumentu OECD-a iz 2006. Za podatke koji nisu u skladu sa zahtjevima za testove trenda postupnim snižavanjem može se primijeniti Dunnettov test ili Tamhane-Dunnettov test (T3); oba testa imaju ugrađena prilagođavanja za multiplicitet. U tim se testovima pretpostavlja normalnost i, u slučaju Dunnettova testa, homogenost varijance. Ako ti uslovi nisu ispunjeni, može se primijeniti Dunnov neparametarski test. Detaljni opis svih tih testova nalazi se u dokumentu OECD-a iz 2006. Na slici 2. nalazi se pregled kako pronaći odabrani test.

Izlijeganje iz jajašaca i preživljavanje larvi

Podaci su udio jajašaca iz kojih se izliježu larve ili larve koje prežive u pojedinim ponovljenim uzorcima. Te bi udjele trebalo ocijeniti u pogledu ekstrabinomne varijance, što je uobičajeno za ta mjerenja, ali ne i univerzalno. U dijagramu toka prikazanom na slici 3. daju se smjernice za odabrani test; detaljni opisi nalaze se u tekstu.

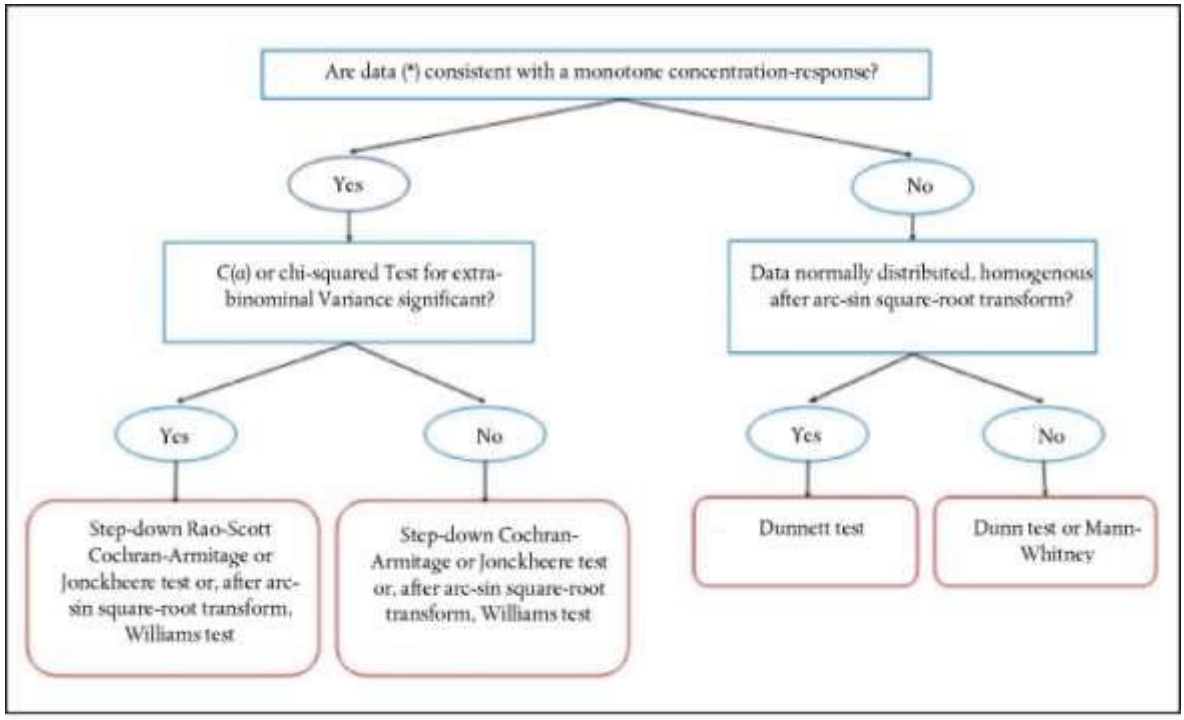
Obično se upotrebljavaju dva testa. Riječ je o Taroneovu C(α) testu (Tarone 1979) i testovima hi-kvadratom, koji se odvojeno primjenjuju na svaku ispitnu koncentraciju. Ako se makar u jednoj ispitnoj koncentraciji pronađe ekstrabinomna varijanca, treba primijeniti metode kojima se ona uzima u obzir.

Formula 1. *Taroneov C (α) test (Tarone 1979)*

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^{m} \frac{x_j - n_j}{1 -}^{2} - \sum_{j=1}^{m} n_j}{2 \sum_{j=1}^{m} n_j \; n_j - 1}^{1/2}$$

pri čemu je srednji udio za danu koncentraciju, **m** je broj akvarijuma s ponovljenim uzorcima, $\mathbf{n_j}$ je broj jedinki u ponovljenom uzorku **j** i $\mathbf{x_j}$ je broj jedinki s odgovorom u tom ponovljenom uzorku, npr. Neizlijegnutih ili mrtvih životinja. Taj se test odvojeno primjenjuje na svaku koncentraciju. On se može posmatrati kao prilagođeni test hi-kvadratom, no ograničene simulacije snage koje je sproveo Tarone pokazale su da je snažniji od testa hikvadratom.

Slika 3. NOEC – dijagram toka za izlijeganje iz jajašaca i smrtnost larvi



(*) Podaci su udio ponovljenih uzoraka

Ako nema značajnih dokaza u pogledu ekstrabinomne varijance, može se primijeniti Cochran-Armitageov test trenda postupnim snižavanjem. U tom se testu zanemaruju ponovljeni uzorci, pa ako postoje takvi dokazi, Rao-Scottova prilagođavanje CochranArmitageova testa (RSCA) uzima u obzir ponovljene uzorke, veličine ponovljenih uzoraka i ekstrabinomnu varijancu i preporučuju se. Alternativni testovi su Williamsov i JonckheereTerpstraov test trenda postupnim snižavanjem te Dunnettov test kako je opisano za mjerenje veličine. Ti se testovi primjenjuju bez obzira na to postoji li ekstrabinomna varijanca ili ne, no njihova je snaga nešto niža.

Prvi ili zadnji dan izlijeganja ili isplivavanja

Odgovor je cijeli broj koji se odnosi na broj dana od početka ispitivanja do trenutka kad je primijećeno predmetno zapažanje za određeni akvarijum s ponovljenim uzorkom. Raspon vrijednosti je vrlo malen i čest je velik udio povezanih vrijednosti, npr. isti prvi dan izlijeganja primjećuje se u svim kontrolnim ponovljenim uzorcima i možda u jednoj ili dvije niske ispitne koncentracije. Parametarski testovi kao što su Williamsov ili Dunnettov test nisu primjereni za takve podatke. Osim ako postoje dokazi o ozbiljnoj nemonotoničnosti, JonckheereTerpstraov test trenda postupnim snižavanjem vrlo je snažan kad je riječ o otkrivanju efekata ispitivane hemikalije. U suprotnom se može primijeniti Dunnov test.

Abnormalnosti larvi

Odgovor je broj larvi u kojih je utvrđen neki oblik abnormalnosti. Taj je odgovor često niske pojavnosti i kod njega se pojavljuju neki problemi kao i za prvi dan izlijeganja, a ponekad i nepredvidivost u odnosu između koncentracije i odgovora. Ako podaci barem ugrubo slijede monotoničan oblik koncentracije, Jonckheere-Terpstraov test trenda postupnim snižavanjem snažan je test za otkrivanje efekata. U suprotnom se može primijeniti Dunnov test.

Dodatak 6.

STATISTIČKE SMJERNICE ZA PROCJENE REGRESIJE

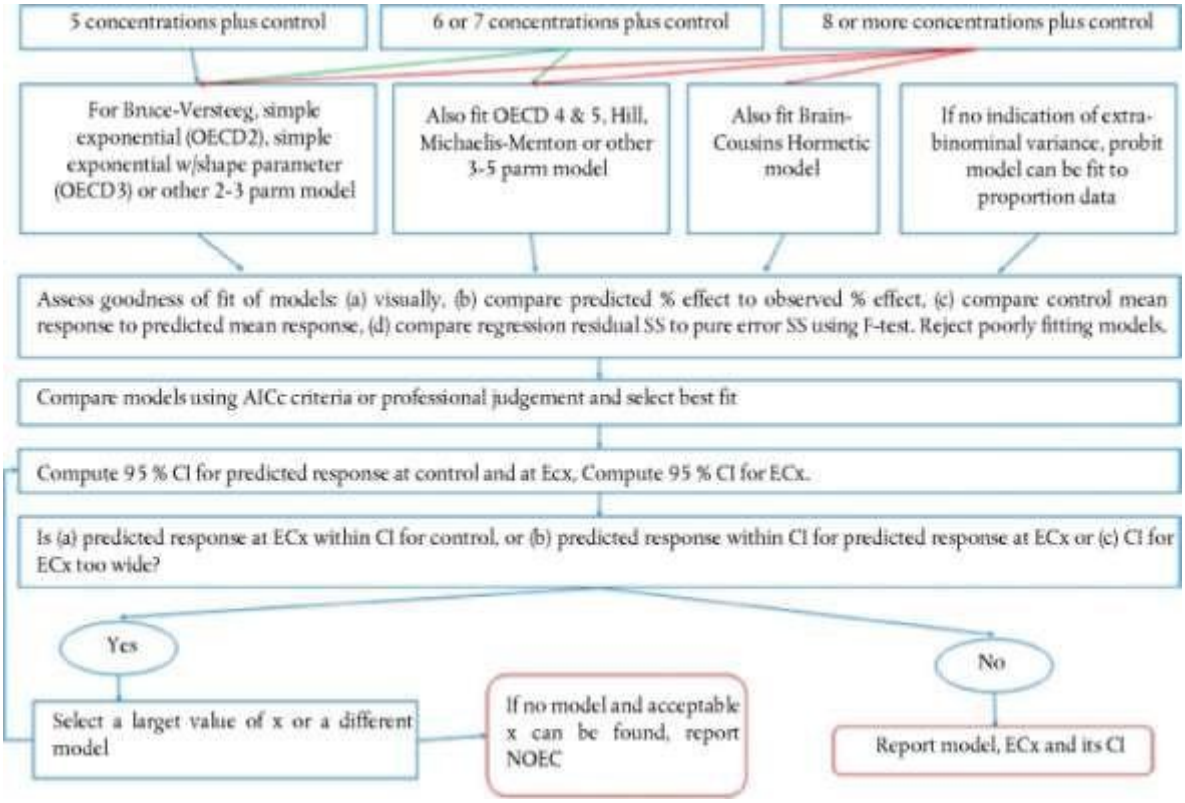
Zapažanja koja se upotrebljavaju za prilagođavanje modela su srednje vrijednosti ponovljenih uzoraka (dužina i težina) ili udio ponovljenih uzoraka (izlijeganje iz jajašaca i smrtnost larvi) (OECD 2006).

Primjenjuje se ponderisana regresija u kojoj je ponder veličina ponovljenog uzorka. Moguće su i druge sheme ponderisanja kao što su ponderisanje predviđenom srednjom vrijednošću odgovora ili kombinacija toga i veličine ponovljenog uzorka. Ne preporučuje se ponderisanje recipročnom vrijednošću varijance uzorka unutar koncentracije (Bunke *et al.* 1999, Seber i Wild 2003, Motulsky i Christopoulos 2004, Huet *et al.* 2003).

U eventualnim transformacijama odgovora prije analize trebala bi se sačuvati nezavisnost zapažanja, a vrijednost ECx i njene granice pouzdanosti trebalo bi izraziti u izvornim mjernim jedinicama umjesto u transformisanim jedinicama. Na primjer, promjena od 20 % u logaritmu dužine nije ista kao promjena od 20 % dužine (Lyles *et al.* 2008, Draper i Smith 1999).

U dijagramu toka prikazanom na slici 4. nalazi se pregled procjena vrijednosti ECx. Pojedinosti su opisane u tekstu u nastavku.

Slika 4. Dijagram toka za procjenu vrijednosti ECx za srednju vrijednost dužine, težine ili udjela izlijeganja iz jajašaca ili smrtnosti larvi u ponovljenom uzorku.



Razmatranja u pogledu izlijeganja iz jajašaca i smrtnosti larvi

Za podatke o izlijeganju iz jajašaca i smrtnosti larvi uopšteno je najbolje prilagoditi modelu smanjenja osim ako se prilagodi probni model kako je opisano u nastavku. Drugim riječima, treba modelirati udio jajašaca iz kojih se ne izliježu larve ili larve koje uginu. Razlog tome je da se vrijednost ECx odnosi na koncentraciju kod koje postoji promjena jednaka x % srednje vrijednosti odgovora u kontroli. Ako se iz 5 % kontrolnih jajašaca ne izlegnu larve i modelira se izostanak izlijeganja, tada se vrijednost EC20 odnosi na koncentraciju pri kojoj je promjena jednaka 20 % od 5 % izostanaka izlijeganja u kontroli, a to je promjena od 0,2 × 0,05 = 0,01 ili jedan postotni bod na 6 % izostanaka izlijeganja. Takva se mala razlika ne može procijeniti ni na kakav smisleni način na osnovu rapoloživih podataka i nije biološki značajna. Međutim, ako se modeluje udio jajašaca iz kojih se izliježu larve, kontrolni bi udio u ovom primjeru iznosio 95 %, a smanjenje od 20 % u odnosu na kontrolnu srednju vrijednost bila bi promjena od 0,95 × 0,2 = 0,18, dakle od uspješnosti izlijeganja od 95 % na 77 % (= 95 – 18) uspješnosti izlijeganja; ta se koncentracija s efektom može procijeniti i pretpostavlja se da je od većeg interesa. To ne predstavlja problem u mjerenjima dužine, iako negativni efekti na veličinu uopšteno znače smanjenje veličine.

Modeli za veličinu (dužinu ili težinu) i uspješnost izlijeganja odnosno preživljavanje larvi

Svi su modeli, osim Brain-Cousensova modela hormeze, opisani i preporučeni u OECD (2006). Slob (2002) razmatra Smjernice OECD-a od 2. do 5. i za eksperimente u pogledu ekotoksičnosti. Naravno, postoje i mnogi drugi modeli koji bi mogli biti korisni. Bunke *et al*. (1999) navode brojne modele koji nisu ovdje uključeni i upućivanja na druge modele. Modeli navedeni u nastavku su primjereni i često se upotrebljavaju za eksperimente u pogledu ekotoksičnosti.

S pet ispitnih koncentracija plus kontrola

— Bruce-Versteegov model,

— jednostavan eksponencijalni model (OECD 2),

— eksponencijalni model s parametrom oblika (OECD 3),

— jednostavan eksponencijalni model s donjom granicom (OECD 4).

Sa šest ili više ispitnih koncentracija plus kontrola

— eksponencijalni model s parametrom oblika i donjom granicom (OECD 5),

— Michaelis-Menten, — Hillov model.

Ako postoje vizualni dokazi hormeze (što je malo vjerovatno kad se radi o uspješnosti izlijeganja ili preživljavanju larvi, no ponekad se bilježi u zapažanjima o veličini) — Brain-Cousensov model hormeze; Brain i Cousens (1989).

Alternativni modeli za neuspješno izlijeganje i smrtnost larvi

— Modeli povećavanja za te odgovore mogu se prilagoditi probi (ili logističkim) modelima ako nema dokaza o ekstrabinomnoj varijanci i ako se pojavnost kontrole procjenjuje u prilagođavanju modela. To nije najbolja metoda jer se u njoj kao jedinica analize uzima jedinka, a ne ponovljeni uzorak (Morgan 1992, O'Hara Hines i Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

Kvalitet prilagoĐavanja pojedinog modela

— Vizualno uporedite zapaženo i predviĐeno smanjenje u postocima pri svakoj ispitnoj koncentraciji (Motulsky i Christopoulos 2004, Draper i Smith 1999).

— Uporedite kvadratnu srednju vrijednost regresijske greške s kvadratnom srednjom vrijednošću čiste greške primjenom F-testa (Draper i Smith 1999).

— Provjerite razlikuje li se svaki termin u modelu znatno od nule (tj. odredite jesu li svi termini modela važni) (Motulsky i Christopoulos 2004).

— Izradite grafik reziduala regresije u odnosu na ispitnu koncentraciju, po mogućnosti na logaritamskoj skali za koncentraciju. Na tom grafiku ne bi smio biti vidljiv uzorak; tačke bi trebale biti nasumično raspršene oko horizontalne linije na nultoj visini.

— Trebalo bi ocijeniti normalnost podataka i homogenost varijance na isti način kako je opisano u Dodatku 5.

— Dodatno, trebalo bi ocijeniti normalnost reziduala u odnosu na regresioni model primjenom istih metoda navedenih u Dodatku 5. za reziduale iz ANOVA-e.

UporeĐivanje modela

— Primijenite Akaikeove kriterijume (AIC). Manje vrijednosti kriterijuma AIC ukazuju na bolje prilagođavanje i ako je AICc(B) – AICc(A) ≥ 10, model A skoro je sigurno bolji od modela B (Motulsky i Christopoulos 2004).

— Vizualno uporedite dva modela s obzirom na to koliko dobro ispunjavaju gore navedene kriterijume pojedinog modela.

— Preporučuje se princip štedljivosti, prema kojem se primjenjuje najjednostavniji model koji se u razumnoj mjeri prilagođava podacima (Ratkowsky 1993, Lyles *et al*. 2008).

Kvalitet procjene vrijednosti EC_x

Interval pouzdanosti (CI) za vrijednost EC_x ne bi smio biti preširok. Pri odlučivanju o tome koliko može biti širok interval pouzdanosti, a vrijednost ECx još uvijek korisna, potrebna je statistička procjena. Simulacije prilagođavanja regresionih modela podacima o izlijeganju iz jajašaca i o veličini pokazuju da oko 75 % intervala pouzdanosti za vrijednost EC_x (x = 10, 20 ili 30) ne obuhvata više od dvije ispitne koncentracije. To može poslužiti kao uputstvo u pogledu prihvatljivosti i kao praktična smjernica o tome što se može postići. Brojni autori naglašavaju potrebu za izvještavanjem o intervalu pouzdanosti za sve parametre modela i napominju da široki intervali pouzdanosti za parametre modela ukazuju na neprihvatljive modele (Ott i Longnecker 2008, Alvord i Rossio 1993, Motulsky i Christopoulos 2004, Lyles *et al.* 2008, Seber i Wild 2003, Bunke *et al*. 1999, Environment Canada 2005).

Interval pouzdanosti (CI) za vrijednost EC_x (ili bilo koji drugi parametar modela) ne bi smio sadržavati nulu (Motulsky i Christopoulos 2004). To je, u regresionim modelima, ekvivalent minimalnoj značajnoj razlici koja se često citira u pristupima testiranju hipoteze (npr. Wang *et al.*2000). On odgovara i intervalu pouzdanosti za srednje vrijednosti odgovora pri vrijednosti LOEC koja ne sadržava kontrolnu srednju vrijednost. Na primjer, ako interval pouzdanosti za y0 iznosi ± 20 %, nijedna procjena vrijednosti EC_{10} nije tačna. Ako se modelom predviđa efekat od 20 % pri koncentraciji C, a najveći zapaženi efekat pri koncentraciji C i nižim koncentracijama je 10 %, tada vrijednost EC_{20} nije tačna (Motulsky i Christopoulos 2004, Wang *et al.* 2000, Environment Canada 2005).

Vrijednost EC_x ne bi smjela zahtijevati ekstrapolaciju izvan raspona pozitivnih koncentracija (Draper i Smith 1999, OECD 2006). Na primjer, uputsvo za vrijednost EC_x ne smije biti niža od oko 25 % ispod najniže ispitane koncentracije ili iznad najviše ispitane koncentracije.

C.48. KRATKOROČNI REPRODUKCIONI TEST NA RIBAMA

1. Uvod

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 229 (2012.). Potreba za razvojem i validacijom testa na ribama pomoću kojeg je moguće otkriti endokrino aktivne hemikalije pojavila se zbog zabrinutosti da nivoa hemikalija u okolini mogu štetno uticati na ljude i životinje zbog interakcije tih hemikalija i endokrinog sistema. OECD je 1998. pokrenuo aktivnost visokog prioriteta radi revizije postojećih smjernica i razvoja novih smjernica za izbor i ispitivanje potencijalnih endokrinih disruptora. Jedan element te aktivnosti bio je razvoj smjernice za test izbora hemikalija koje djeluju na endokrini sistem riba. Kratkoročni reprodukcioni test na ribama podvrgnut je opsežnom programu validacije koji je uključivao međulaboratorijaske studije s odabranim hemikalijama za dokazivanje relevantnosti i pouzdanosti testa u svrhu otkrivanja hemikalija koje utiču na reprodukciju riba različitim mehanizmima, uključujući endokrine modalitete. Sve su krajnje tačke Smjernice OECD-a za ispitivanje validirane ispitivanjima na debeloglavoj gavčici, dok je podskup krajnjih tačaka validiran ispitivanjima na medaki (vitelogenin i sekundarna polna obilježja) i zebrici (vitelogenin). Test nije namijenjen za identifikaciju određenih mehanizama hormonalnih poremećaja jer ispitne životinje imaju netaknutu os hipotalamus-hipofiza-gonade (os HPG) koja može reagovati na hemikalije koje na nju utiču na različitim nivoma.

Ovom se ispitnom metodom opisuje test izbora *in vivo,* pri čemu su polno zreli mužjak i ženka u mrijestu zajedno izloženi hemikaliji tokom ograničenog dijela životnog ciklusa (21 dan). Po završetku 21-dnevnog perioda izlaganja u mužjaka i ženki mjere se dvije krajnje tačke biomarkera kao indikatori endokrine aktivnosti ispitivane hemikalije, a te su krajnje tačke vitelogenin i sekundarna polna obilježja. Vitelogenin se mjeri u debeloglave gavčice, medake i zebrice, a sekundarna polna obilježja mjere se u debeloglave gavčice i medake.

Dodatno se tokom cijelog ispitivanja svakodnevno prati kvantitativna plodnost. Čuvaju se i gonade, a može se ocijeniti histopatologija kako bi se procijenila reproduktivna sposobnost ispitnih životinja i lupe pouzdanost dokaza za druge krajnje tačke.

Ovaj biotest služi kao reprodukcioni test izbora *in vivo*, a njegova primjena trebala bi se posmatrati u kontekstu „OECD-ova konceptualnog okvira za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih hemikalija". U tom se konceptualnom okviru kratkoročni reprodukcioni test na ribama predlaže na trećoj nivou kao test *in vivo* kojim se dobijaju podaci o odabranim endokrinim mehanizmima odnosno putevima.

1.1 Početna razmatranja i ograničenja

Vitelogenin (VTG) u pravilu nastaje u jetri ženki kičmenjaka koje liježu jaja kao reakcija na cirkulisanje endogenog estrogena. Riječ je o prekursoru proteina u žumancu koji, nakon nastanka u jetri, putuje krvotokom do jajnika, gdje ga preuzimaju i modifikuju jajašca u razvoju. Vitelogenin je gotovo nemoguće otkriti u plazmi nezrelih ženki i mužjaka riba zbog manjka estrogena u optoku; međutim, jetra je sposobna za sintezu i izlučivanje vitelogenina kao reakciju na egzogenu estrogensku stimulaciju.

Mjerenje vitelogenina namijenjeno je za otkrivanje hemikalija s različitim estrogenskim načinima djelovanja. Otkrivanje estrogenskih hemikalija moguće je mjerenjem indukcije vitelogenina u mužjaka riba te je opširno dokumentovano u stručno naučnoj literature. Indukcija vitelogenina dokazana je i nakon izlaganja aromatizirajućim androgenima. Pad nivoa estrogena u optoku ženki, na primjer inhibicijom aromataze kojom se endogeni androgen pretvara u prirodni estrogen 17βestradiol, uzrok je pada nivoa VTG-a koji se upotrebljava za otkrivanje hemikalija sa svojstvima inhibicije aromataze. Biološka važnost reakcije vitelogenina nakon estrogenske inhibicije / inhibicije aromataze utvrđena je i opširno dokumentirana. Međutim, moguće je da na nastajanje VTG-a u ženki utiču i opšta toksičnost te neendokrino toksični načini djelovanja, na primjer hepatotoksičnost.

Za uobičajenu je upotrebu razvijeno i standardizovano nekoliko metoda mjerenja. Riječ je o metodama enzimskog imunotesta (eng. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) specifičnima za pojedinu vrstu, kod kojih se imunohemija upotrebljava za kvantifikaciju VTG-a nastalog u malim uzorcima krvi ili jetre prikupljenima od pojedinačnih riba. U svrhu mjerenja VTG-a uzimaju se uzorci krvi debeloglave gavčice i zebrice ili uzorci homogenata s glave/repa te uzorci jetre medake. U medake postoji dobra korelacija između VTG-a izmjerenog u krvi i u jetri. U Dodatku 6. navedeni su preporučeni postupci za uzimanje uzoraka za analizu VTG-a. Kompleti za mjerenje VTG-a široko su dostupni, a trebali bi se bazirati na validiranoj metodi ELISA specifičnoj za pojedinu vrstu.
Sekundarna polna obilježja mužjaka određenih ribljih vrsta polja su vidljiva, mogu se kvantifikovati i reaguju na nivoe endogenih androgena u optoku; to je tako u slučaju debeloglave gavčice i medake, ali ne i zebrice, koja nema sekundarna polna obilježja koja se mogu kvantifikovati. Ženke zadržavaju sposobnost razvoja muških sekundarnih polnih obilježja u slučaju izlaganja androgenim hemikalijama u vodi. Smanjenje sekundarnih polnih obilježja u mužjaka potrebno je oprezno tumačiti zbog slabe statističke snage i tumačenje je potrebno bazirati na stručnoj procjeni i pouzdanosti dokaza. Postoje ograničenja u upotrebi zebrica u ovom testu zbog izostanka mjerljivih sekundarnih polnih obilježja koja reaguju na hemikalije s androgenim djelovanjem.

U debeloglave gavčice glavni je indikator egzogene androgene izloženosti broj izraslina na ustima polno zrele ženke ribe. U medake je broj papilarnih procesa glavni indikator egzogene izloženosti androgenim hemikalijama ženki riba. U dodacima 5.A i 5.B navedeni su preporučeni postupci za procjenu polnih obilježja u debeloglave gavčice, odnosno medake.

Test na ribama koji traje 21 dan uključuje procjenu kvantitativne proizvodnje jajašaca i očuvanje gonada za neobveznu histopatološku pretragu. Iako neke krajnje tačke mogu biti izuzetno dijagnostičke (npr. indukcija VTG-a u mužjaka i nastanak izraslina u ženki), nisu sve krajnje tačke (npr. plodnost i histopatologija gonada) u testu namijenjene za nedvosmisleno utvrđivanje specifičnih ćelijskih mehanizama djelovanja. Skup krajnjih tačaka u cjelini omogućava izvoĐenje zaključaka u pogledu mogućih endokrinih poremećaja i time pruža smjernice za dalja ispitivanja. Iako nije povezana samo s endokrinim sistemom, zbog svoje je dokazane osjetljivosti u odnosu na mnoge poznate endokrino aktivne hemikalije plodnost važna krajnja tačka koju treba uključiti jer kad nema efekta na nju i na druge krajnje tačke, veća je vjerovatnost jedinjenje nije endokrino aktivno. Međutim, kada postoje efekti na plodnost, to će uveliko uticati na zaključke u pogledu snage dokaza. Uputstva o tumačenju podataka i prihvatljivosti rezultata ispitivanja za ovu ispitnu metodu navedene su u nastavku.

Definicije koje se upotrebljavaju u ovoj ispitnoj metodi navedene su u Dodatku 1.

1.3. Načelo ispitivanja

Tokom testa mužjaci i ženke reproduktivno sposobnih riba zajednički se izlažu u ispitnim posudama. Zahvaljujući njihovu odraslom i reproduktivnom statusu moguće je jasno razlikovanje polova, a time i analiza svake krajnje tačke koja se odnosi na pol, te je osigurana njihova osjetljivost na egzogene hemikalije. Po završetku ispitivanja pol se potvrđuje makroskopskim pregledom gonada nakon otvaranja trbuha makazama. U Dodatku 2. naveden je pregled relevantnih uslova biotesta. Test u pravilu počinje uzimanjem uzorka riba iz populacije u mrijestu, a upotreba starih životinja nije dopuštena. Smjernice o starosti riba i reproduktivnom statusu navedene su u odjeljku o izboru riba. Test se sprovodi pomoću triju koncentracija izloženosti hemikaliji, kontrole s vodom i, prema potrebi, kontrole s rastvaračem. U slučaju zebrica upotrebljavaju se dvije posude ili dva ponovljena uzorka po tretiranoj grupi (u svakoj se posudi nalazi pet mužjaka i pet ženki). U slučaju debeloglave gavčice upotrebljavaju se četiri posude ili četiri ponovljena uzorka po tretiranoj grupi (u svakoj se posudi nalaze dva mužjaka i četiri ženke). Razlog za to je zadovoljavanje teritorijalnog ponašanja mužjaka debeloglave gavčice uz zadržavanje dovoljne snage testa. U slučaju medake upotrebljavaju se četiri posude ili četiri ponovljena uzorka po tretiranoj grupi (u svakoj se posudi nalaze tri mužjaka i tri ženke). Period izlaganja traje 21 dan, a uzorkovanje riba obavlja se dvadeset prvog dana izlaganja. Svakodnevno se prati kvantitativna plodnost.

Pri uzorkovanju 21. dana sve se životinje usmrćuju na humani način. Sekundarna polna obilježja mjere se u debeloglave gavčice i medake (vidjeti dodatke 5.A i 5.B), uzorci krvi uzimaju se radi određivanja VTG-a u zebrice i debeloglave gavčice, a osim toga, za određivanje VTG-a u zebrice može se uzeti glava odnosno rep (Dodatak 6.), dok se za analizu VTG-a u medake uzima jetra (Dodatak 6.); gonade se fiksiraju u cjelini ili secirane za moguću histopatološku procjenu,

1.4. Kriterijumi prihvatljivosti ispitivanja

Za prihvatljivost rezultata ispitivanja primjenjuju se sljedeći uslovi:

— smrtnost u kontrolama s vodom (ili rastvaračem) ne smije premašiti 10 % na kraju perioda izlaganja,

— tokom perioda izlaganja koncentracija rastvorenog kiseonika trebala bi iznositi najmanje 60 % vrijednosti zasićenja vazduhom,

— razlike u temperaturi vode meĐu ispitnim posudama ne bi ni u jednom trenutku tokom perioda izlaganja trebale biti veće od ± 1,5 °C, a temperaturu vode potrebno je održavati unutar raspona od 2 °C unutar temperaturnih raspona za ispitne vrste (Dodatak 2.),

— trebali bi postojati dokazi da su se koncentracije ispitivane hemikalije u rastvoru zadovoljavajuće kretale u rasponu od ± 20 % srednjih izmjerenih vrijednosti,

— dokazi da se ribe aktivno mrijeste u svim ponovljenim uzorcima prije početka izlaganja hemikaliji i u kontrolnim ponovljenim uzorcima tokom ispitivanja.

2. Opis metode Oprema

Uobičajena laboratorijaska oprema, posebno:

1) mjerači kiseonika i pH vrijednosti,
2) oprema za određivanje tvrdoće i baznosti vode,
3) odgovarajući uređaji za regulaciju temperature i po mogućnosti stalno praćenje,
4) akvarijumi izrađeni od hemijski inertnog materijala i odgovarajuće veličine s obzirom na preporučeno punjenje i gustinu nasada (vidjeti Dodatak 2.),
5) supstrat za mriješćenje debeloglave gavčice i zebrice (potrebni podaci navedeni su u Dodatku 4.),
6) vaga prikladne tačnosti (odnosno tačnost u rasponu od ± 0,5 mg). **Voda**

Kao ispitna voda može se koristiti svaka voda koja je prikladna za preživljavanje i rast ispitne vrste u dovoljno dugom periodu. Tokom perioda ispitivanja kvalitet vode treba biti stalna; pH-vrijednost vode trebala bi biti u rasponu od 6,5 do 8,5, ali tokom predmetnog ispitivanja trebala bi biti u rasponu od ±0,5 pH jedinica. Kako bi se osiguralo da voda za razrjeđivanje ne utiče pretjerano na rezultate ispitivanja (na primjer kompleksacijom s ispitivanom hemikalijom), uzorke za analizu potrebno je uzimati u intervalima. Mjerenja teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), glavnih anjona i katjona (npr. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} i SO_4^{2-}), pesticida (npr. ukupni organofosforni i ukupni organohlorni pesticidi), ukupnog organskog ugljenika i suspendovanih čvrstih supstanci treba obavljati npr. svaka tri mjeseca ako se zna da je voda za razrjeđivanje relativno stalnog kvaliteta. Ako se dokaže da je kvalitet vode stalan tokom najmanje jedne godine, određivanja se mogu prorijediti i intervali produžiti (na primjer svakih šest mjeseci). Neka hemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje navedena su u Dodatku 3. **Ispitni rastvori**

Ispitni rastvori odabranih koncentracija pripremaju se razrjeđivanjem matičnog rastvora. Matični rastvor potrebno je po mogućnosti pripremiti jednostavnim miješanjem ili mućkanjem ispitivane hemikalije u vodi za razrjeđivanje mehaničkim sredstvima (na primjer miješanjem ili ultrazvukom). Za postizanje odgovarajuće koncentracije matičnog rastvora mogu se upotrebljavati kolone za zasićavanje (kolone za rastvorljivost). Upotreba rastvarača nosača ne preporučuje se. Međutim, ako je potreban rastvarač, istovremeno je potrebno primijeniti i kontrolu s rastvaračem u jednakoj koncentraciji kao i onoj upotrijebljenoj u grupama tretiranima hemikalijom. Za hemikalije koje se teško ispituju rastvarač može biti najbolje rješenje s tehničkog stajališta; potrebno je pročitati Smjernicu OECD-a za ispitivanje toksičnosti analitički zahtjevnih supstanci i smješa za vodene organizme. Izbor rastvarača će biti određen hemijskim svojstvima supstanci ili smješe. U Smjernici OECD-a preporučuje se najveća vrijednost od 100 µl/l, što je potrebno poštovati. Stoga se preporučuje da se koncentracija rastvarača, ako je rastvarač potrebno, svede na najmanju moguću mjeru kad god je to tehnički izvodivo (zavisi od fizičko-hemijskim svojstvima ispitivane hemikalije).

Za ispitivanje će se upotrijebiti protočni sistem. Tim se sistemom stalno ispušta i razrjeđuje matični rastvor ispitivane hemikalije (na primjer pumpa za doziranje, proporcionalni razrjeđivač, zasićivač) kako bi u ispitne komore priticao niz koncentracija. Protok matičnih rastvora i vode za razrjeđivanje tokom ispitivanja potrebno je provjeravati u intervalima, po mogućnosti jedanput dnevno, i oni za vrijeme ukupnog trajanja ispitivanja ne smiju odstupati više od 10 %. Potrebno je paziti da se izbjegne upotreba nekvalitetnih plastičnih cijevi ili ostalih materijala koji mogu sadržavati biološki aktivne hemikalije. Pri izboru materijala za

protačni sistem potrebno je uzeti u obzir moguću adsorpciju ispitivane hemikalije na tom materijalu.

Držanje riba

Ribe za ispitivanje potrebno je odabrati meĐu laboratorijaskom populacijom, a po mogućnosti i iz istog matičnog jata, koje je najmanje dvije nedelje prije ispitivanja držano u uslovima koji su slični uslovima ispitivanja u smislu kvaliteta vode i osvjetljenja. Važno je da gustina punjenja i gustina nasada (za definicije vidjeti Dodatak 1.) odgovaraju upotrijebljenoj ispitnoj vrsti (vidjeti Dodatak 2.).

Nakon perioda prilagođavanja od 48 sati bilježi se smrtnost uz primjenu sljedećih kriterijuma:

1) smrtnost iznad 10 % populacije u sedam dana: odbacuje se čitava grupa,
2) smrtnost između 5 i 10 % populacije: prilagođavanje još sedam dana; ako je smrtnost tokom drugih sedam dana veća od 5 %, odbacuje se čitava grupa, 3) smrtnost ispod 5 % populacije u sedam dana: grupa se prihvata.

Ribe se ne smiju liječiti tokom perioda prilagođavanja, perioda prije izlaganja ili tokom perioda izlaganja.

Period prije izlaganja i izbor riba

Preporučuje se jednonedeljno do dvonedeljno Period prije izlaganja, pri čemu se životinje smještaju u posude slične ispitnim posudama. Ribe je potrebno hraniti *ad libitum* tokom perioda držanja i faze izlaganja. Faza izlaganja započinje polno dimorfnom odraslom ribom iz laboratorijaske grupe reproduktivno zrelih životinja (na primjer s jasno vidljivim sekundarnim polnim obilježjima kad je riječ o debeloglavoj gavčici i medaki) koja je u aktivnom mrijestu. Prema opštim smjernicama (koje se uzima u obzir uz posmatranje stvarnog reproduktivnog statusa predmetne grupe riba) debeloglave gavčice trebale bi biti stare približno 20 (±2) nedelja pod pretpostavkom da su tokom životnog vijeka uzgajane na temperaturi od 25 ±2 °C. Medake bi trebale biti stare približno 16 (±2) nedelja pod pretpostavkom da su tokom životnog vijeka uzgajane na temperaturi od 25 ±2 °C. Zebrice bi trebale biti stare približno 16 (±2) nedelja pod pretpostavkom da su tokom životnog vijeka uzgajane na temperaturi od 26 ±2 °C. Proizvodnju jajašaca trebalo bi svakodnevno procjenjivati tokom perioda prije izlaganja. Preporučuje se zapažanje mriješćenja u svim akvarijumima s ponovljenim uzorcima prije uključivanja u fazu izlaganja. U ovoj se fazi ne mogu dati kvantitativne smjernice o poželjnoj dnevnoj proizvodnji jajašaca, no prilično se često opaža prosječan mrijest od >10 jajašaca po ženki po danu za svaku vrstu. Za raspoređivanje ponovljenih uzoraka na različite nivoe izlaganja trebalo bi primijeniti nasumični blokni raspored s obzirom na proizvodnju jajašaca kako bi se obezbijedila ravnodnosna raspodjela ponovljenih uzoraka.

2.1 Plan ispitivanja

Upotrebljavaju se tri koncentracije ispitivane hemikalije, jedna kontrola (voda) i, prema potrebi, jedna kontrola s rastvaračem. Podaci se mogu analizirati radi utvrđivanja statistički značajnih razlika među odgovorima u tretiranim i kontrolnim grupama. Zahvaljujući tim analizama utvrdiće se je li potrebno dalje, dugotrajnije ispitivanje štetnih efekata hemikalije (na preživljavanje, razvoj, rast i reprodukciju), umjesto u svrhu procjene rizika.

U zebrica 21. dana eksperimenta uzimaju se uzorci mužjaka i ženki iz svake grupe tretirane određenom koncentracijom (pet mužjaka i pet ženki u svakom od dva ponovljenih uzoraka) i iz kontrole ili više njih u svrhu mjerenja vitelogenina. U medaka 21. dana eksperimenta uzimaju se uzorci mužjaka i ženki iz svake grupe tretirane određenom koncentracijom (tri mužjaka i tri ženke u svakom od četiri ponovljena uzorka) i iz kontrole ili više njih u svrhu mjerenja vitelogenina i sekundarnih polnih obilježja. U debeloglave gavčice 21. dana izlaganja uzimaju se uzorci mužjaka i ženki (dva mužjaka i četiri ženke u svakom od četiri

ponovljena uzorka) i iz kontrole ili više njih u svrhu mjerenja vitelogenina i sekundarnih polnih obilježja. Potrebna je kvantitativna procjena plodnosti, a tkiva gonada potrebno je fiksirati u cjelini ili secirane za eventualnu histopatološku procjenu, prema potrebi.

Izbor ispitnih koncentracija

Za potrebe ovog ispitivanja najvišu ispitnu koncentraciju potrebno je odrediti pomoću maksimalne tolerirane koncentracije (MTK) utvrĐene tablicom ili pomoću ostalih podataka o toksičnosti, ili 10 mg/l, ili maksimalne rastvorljivosti u vodi, što god od toga je najmanje. MTK se definiše kao najviša ispitna koncentracija hemikalije čija je posljedica smrtnost manja od 10 %. Ovaj pristup pretpostavlja da postoje empirijski podaci o akutnoj toksičnosti ili drugi podaci o toksičnosti iz kojih se može procijeniti MTK. Procjena MTK-a može biti neprecizna pa je u pravilu potrebna stručna procjena.

Potrebne su tri ispitne koncentracije, rasporeĐene pomoću stalnog faktora koji ne prekoračuje 10, te kontrola s vodom za razrjeđivanje (i po potrebi kontrola s rastvaračem). Preporučuje se raspon faktora rasporeĐivanja od 3,2 do 10.

2.2 Postupak

Izbor i vaganje ispitnih riba

Važno je da se razlike u težini riba na početku testa svedu na najmanju moguću mjeru. Odgovarajući rasponi veličina za različite vrste preporučene za ovo ispitivanje navedeni su u Dodatku 2. Za cijelu grupu riba koja se upotrebljava u ovom ispitivanju pojedinačne težine mužjaka i ženki na početku ispitivanja trebale bi se po mogućnosti kretati u rasponu od ±20 % aritmetičke srednje težine za ribe istog pola. Prije početka ispitivanja preporučuje se vaganje pod-uzorka riblje populacije radi procjene srednje težine. **Uslovi izlaganja**

Trajanje

Nakon perioda prije izlaganja ispitivanje traje 21 dan. Preporučuje se jednonedeljno do dvonedeljno Period prije izlaganja. *Hranjenje*

Ribe je potrebno hraniti *ad libitum* odgovarajućom hranom (Dodatak 2.) u količinama dovoljnima za zadržavanje tjelesne forme. Treba paziti da ne doĐe do povećanja broja mikroba i zamućenja vode. Opšta je smjernica da se dnevna količina hrane može podijeliti u dvije ili tri jednake porcije za višekratno hranjenje tokom dana, pri čemu razmak između hranjenja mora biti najmanje tri sata. Prihvatljiva je i jedna velika porcija, posebno tokom vikenda. Ribe ne bi trebalo hraniti 12 sati prije uzorkovanja/seciranja.

Hranu za ribe potrebno je procijeniti u smislu postojanja kontaminanata poput organohlornih pesticida, policikličkih aromatičniih ugljenikovodonika (PAH) i polihlorovanih bifenila (PCB). Potrebno je izbjegavati hranu s povišenom nivoom fitoestrogena koji bi uticali na reakciju na test na poznati agonist estrogena (na primjer 17b- estradiol).

Nepojedenu hranu i izmet potrebno je uklanjati iz ispitnih posuda najmanje dvaput nedeljno,

na primjer pažljivim čišćenjem dna svakog akvarijuma pomoću sifona. *Svjetlo i temperatura*

Fotoperiod i temperaturu vode potrebno je prilagoditi ispitnoj vrsti (vidjeti Dodatak 2.).

Učestalost analitičkih određivanja i mjerenja

Prije početka perioda izlaganja potrebno je osigurati pravilno funkcionisanja sistema dovoda hemikalije. Potrebno je utvrditi sve potrebne analitičke metode, uključujući dodatna saznanja o hemijskoj stabilnosti u ispitnom sistemu. Tokom ispitivanja, koncentracije ispitivane hemikalije utvrĐuju se u redovnim intervalima kako slijedi: protoke razrjeĐivača i toksične matične rastvora potrebno je provjeravati po mogućnosti svakodnevno, a najmanje dvaput nedeljno; one ne bi trebale varirati više od 10 % tokom cijelog ispitivanja. Preporučuje se

mjerenje stvarnih koncentracija ispitivane hemikalije u svim posudama na početku ispitivanja, a zatim svakog nedelje.

Preporučuje se da se rezultati baziraju na izmjerenim koncentracijama. Međutim, ako je tokom cijelog ispitivanja koncentracija ispitivane hemikalije u rastvoru uspješno zadržana unutar ±20 % nazivne koncentracije, tada se rezultati mogu bazirati na nazivnim ili izmjerenim vrijednostima.

U pojedinim je slučajevima uzorke potrebno filtrirati (na primjer pomoću veličine pora 0,45 μm) ili centrifugirati. U slučaju potrebe preporučuje se centrifugiranje. Ipak, ako se ispitivani materijal ne adsorbuje na filtre, prihvatljivo je i filtriranje.

Tokom ispitivanja potrebno je mjeriti rastvoreni kiseonik, temperaturu i pH-vrijednost u svim ispitnim posudama najmanje jednom nedeljno. Ukupnu tvrdoću i baznost potrebno je mjeriti najmanje jednom nedeljno u kontrolama i jednoj posudi s najvišom koncentracijom. Temperaturu po mogućnosti treba neprekidno pratiti u najmanje jednoj ispitnoj posudi.

Zapažanja

Brojne opšte (na primjer preživljavanje) i temeljne biološke reakcije (na primjer nivoa VTG-a) procjenjuju se tokom testa ili po njegovom završetku. Potrebno je dnevno kvantitativno praćenje plodnosti. Mjerenje i procjena tih krajnjih tačaka i njihova korist opisuju se u nastavku.

Preživljavanje

Ribe je tokom perioda ispitivanja potrebno svakodnevno pregledavati i evidentirati smrtnost te u najkraćem mogućem roku uklanjati uginule ribe. Uginule ribe ne nadomještaju se novima ni u kontrolnim ni u ispitnim posudama. Pol riba koje su uginule tokom ispitivanja potrebno je utvrditi makroskopskom procjenom gonada.

Ponašanje i izgled

Potrebno je evidentirati svako neuobičajeno ponašanje (u odnosu na kontrole), što može uključivati znake opšte toksičnosti, uključujući hiperventilaciju, nekoordinirano plivanje, gubitak ravnoteže te atipično mirovanje ili hranjenje. Potrebno je evidentirati i poljašnje abnormalnosti (poput krvarenja, gubitka boje). Pri tumačenju podataka potrebno je pažljivo razmotriti te znake toksičnosti jer mogu ukazivati na koncentracije pri kojima biomarkeri endokrine aktivnosti nisu pouzdani. Ta zapažanja ponašanja mogu biti i korisne informacije za određivanje potencijalnih budućih zahtjeva za ispitivanje na ribama. Na primjer, teritorijalna agresivnost kod normalnih mužjaka ili maskuliniziranih ženki uočena je u debeloglave gavčice u slučajevima izloženosti androgenima, a karakteristično parenje i mriješćenje zebrica u zoru s pojavom svjetla smanjeno je ili narušeno nakon izloženosti estrogenima ili antiandrogenima.

S obzirom na to da se neki aspekti izgleda (ponajprije boja) mogu pri rukovanju brzo promijeniti, važno je obaviti zapažanja prije uklanjanja životinja iz ispitnog sistema. Iz dosadašnjeg iskustva s debeloglavim gavčicama poznato je da neke endokrino aktivne hemikalije mogu u početku prouzrokovati promjene u sljedećim poljašnjim obilježjima: boji tijela (svijetla ili tamna), uzorcima boje (postojanje okomitih pruga) i obliku tijela (glava i grudno područje). Stoga je zapažanja o fizičkom izgledu riba potrebno obavljati tokom ispitivanja i po završetku studije. *Plodnost*

Potrebno je svakodnevno bilježiti kvantitativna zapažanja o mriješćenju u ponovljenim uzorcima. Proizvodnju jajašaca treba zabilježiti kao broj jajašaca po preživjeloj ženki po danu u ponovljenom uzorku. Jajašca se svakodnevno uklanjaju iz ispitnih komora. U ispitne komore za debeloglavu gavčicu i zebricu treba staviti supstrate za mriješćenje kako bi se ribama omogućili normalni uslovi mriješćenja. U Dodatku 4. nalaze se dodatne informacije o

preporučenim supstratima za mriješćenje za zebricu (Dodatak 4.A) i debeloglavu gavčicu (4.B). Ne smatra se potrebnim osigurati supstrat za mriješćenje za medaku. *Humano usmrćivanje riba*

Po završetku izlaganja, odnosno 21. dana, ribe je potrebno usmrtiti odgovarajućom količinom anestetika trikaina (*Tricaine metan sulfonat, Metacain*, MS-222 (CAS 886-86-2), 100-500 mg/l puferiran s 300 mg/l $NaHCO_3$ (natrijum bikarbonat, CAS 144-55-8) kako bi se smanjila iritacija sluzokože; nakon toga uzimaju se uzorci krvi ili tkiva radi određivanja VTG-a, kako se opisuje u odjeljku o vitelogeninu.

Zapažanja u pogledu sekundarnih polnih obilježja

Neke endokrino aktivne hemikalije mogu prouzrokovati promjene posebnih sekundarnih polnih obilježja (broj izraslina u polno zrelih mužjaka debeloglave gavčice, papilarni procesi u mužjaka medake). Naime, hemikalije s određenim načinom djelovanja mogu prouzrokovati neuobičajenu pojavu sekundarnih polnih obilježja u životinja suprotnog pola: na primjer, agonisti receptora za androgene, poput trenbolona, metiltestosterona i dihidrotestosterona, u polno zrelih ženki debeloglave gavčice mogu prouzrokovati pojavu izraženih izraslina odnosno papilarnih procesa u ženki medake. Poznato je i da agonisti receptora estrogena mogu prouzrokovati smanjenje broja izraslina i veličine zadebljanja na potiljku odraslih mužjaka debeloglave gavčice. Ta mahromorfološka zapažanja mogu biti korisni kvalitativni i kvantitativni podaci za određivanje potencijalnih budućih zahtjeva za ispitivanje na ribama. Broj i veličina izraslina u polno zrele debeloglave gavčice i papilarnih procesa u medake mogu se kvantifikovati direktno ili praktičnije iz očuvanih uzoraka. Preporučeni postupci za procjenu sekundarnih polnih obilježja u debeloglave gavčice i medake nalaze se u Dodatku 5.A odnosno Dodatku 5.B. *Vitelogenin (VTG)*

Krv se uzima iz repne arterije/vene pomoću heparinizovane mikrohematokritske kapilarne cjevčice ili punkcijom srca uz pomoć špric. Zavisi od veličine ribe, količina krvi koja se uzima u pravilu se kreće od pet do 60 µl po jednoj debeloglavoj gavčici, odnosno od pet do 15 µl po jednoj zebrici. Plazma se odvaja od krvi centrifugiranjem i čuva s inhibitorima proteaze na – 80 °C do analize VTG-a. Druga je mogućnost upotreba jetre medake, odnosno homogenata s glave/repa zebrice kao izvora tkiva za određivanje VTG-a (Dodatak 6.). Mjerenje VTG-a trebalo bi se bazira ti na validiranoj odgovarajućoj metodi ELISA pomoću odgovarajućeg standarda VTG-a i odgovarajućih antitijela. Preporučuje se primjena metode pomoću koje se mogu otkriti niske nivoa VTG-a od nekoliko ng/ml plazme (ili ng/mg tkiva), što je osnovni nivo u neizloženim mužjacma riba.

Kontrola kvaliteta analize VTG-a obavlja će se pomoću standarda, slijepih proba i najmanje dviju identičnih analiza. Za svaku metodu ELISA potrebno je ssprovesti ispitivanje za efekat matrice
(efekat razrjeđivanja uzorka) radi utvrđivanja minimalnog faktora razrjeđivanja uzorka. Na svakoj pločici ELISA za testove VTG-a trebali bi se nalaziti sljedeći uzorci za kontrolu kvaliteta: najmanje šest kalibracionih standarda kojima je obuhvaćen raspon očekivanih koncentracija VTG-a i najmanje jedna nespecifična, obvezujuća slijepa proba (analiziraju se dva ponavljanja). Apsorbancija u tim slijepim probama trebala bi biti manja od 5 % maksimalne apsorbancije pri standardnoj kalibraciji. Analiziraju se najmanje dva alikvota (dvostruka bunarića) svakog razrjeđivanja uzorka. Dvostruke bunariće koji se razlikuju više od 20 % potrebno je ponovno analizirati.

Koeficijent korelacije (R^2) za kalibracione krive trebao bi biti veći od 0,99. Međutim, visoka korelacija nije dodatna za garantovanje odgovarajućeg predviĐanja koncentracije u svim rasponima. Osim što ima dovoljno visoku korelaciju za kalibracionu krivu, koncentracija svakog standarda prema izračunu iz kalibracione krive treba da se kreće od 70 do 120 % nazivne koncentracije. U slučaju udaljavanja nazivnih koncentracija od linije regresije kalibracije (na primjer pri nižim koncentracijama) može se pojaviti potreba za razdvajanjem

kalibracione krive u niske i visoke raspone ili potreba za primjenom nelinearnog modela za odgovarajuće prilagođavanje podataka o apsorbanciji. U slučaju razdvajanja krive, oba segmenta linije trebala bi imati $R^2 > 0,99$.
Granica otkrivanja (eng. *limit of detection*, LOD) definiše se kao koncentracija najnižeg analitičkog standarda, dok se granica kvantitacije (eng. *limit of quantitation*, LOQ) definiše kao koncentracija najnižeg analitičkog standarda pomnožena s najnižim faktorom razrjeđivanja.

Svakog dana sprovoĐenja testova VTG-a analiziraće se uzorak za utvrđivanje izraĐen pomoću referentnog standarda dobijenog ponavljanjem testa (*inter-assay*) (Dodatak 7.). Odnos očekivane i izmjerene koncentracije bilježiće se uz rezultate svakog od niza testova sprovedenih tog dana. *Procjena histopatološke pretrage gonada*

Regulatorna tijela mogu zahtijevati histopatološku pretragu gonada radi proučavanja ciljnog organa na osi HPG nakon izlaganja hemikaliji. U tu se svrhu gonade fiksiraju u cjelini ili secirane. Ako je potrebna histopatološka pretraga, pri procjeni endokrinog djelovanja ispitivane hemikalije na gonadama se posmatraju specifične reakcije povezane s endokrinim sistemom. Te dijagnostičke reakcije uglavnom uključuju prisutnost oocita u testisima, hiperplaziju Leydigovih ćelija, smanjeno stvaranje žumanca, povećane spermatogonije i perifolikularnu hiperplaziju. Druge lezije gonada kao što su atrezija oocita, degenerativne promjene testisa i promjene stadijuma mogu imati različite uzroke. U smjernicama o histopatološkim pretragama gonada riba navode se postupci koji se primjenjuju za seciranje, fiksiranje, rezanje i histopatološku procjenu polnih žlijezda.

3. Podaci i izvještavanje

Procjena reakcija biomarkera uz pomoć analize varijance (ANOVA)

Reakcije tretiranih i kontrolnih grupa uoređuju se pomoću analize varijance (ANOVA) radi identifikacije mogućeg djelovanja hemikalije. U slučaju upotrebe kontrole s rastvaračem potrebno je za svaku krajnju tačku ssprovesti odgovarajući statistički test između kontrola s vodom za razrjeđivanje i kontrola s rastvaračem. Smjernice o načinu obrade podataka za kontrole s vodom za razrjeđivanje i rastvaračem u naknadnoj statističkoj analizi nalaze se u dokumentu OECD, 2006c. Sve podatke o biološkim reakcijama potrebno je analizirati i o njima izvijestiti posebno prema polu. Ako nisu zadovoljene tražene pretpostavke za parametarske metode – nenormalna distribucija (npr. Shapiro-Wilkov test) ili heterogena varijanca (Bartlettov ili Leveneov test), potrebno je razmotriti mogućnost da se prije sprovoĐenja ANOVA-e podaci preoblikuju radi homogenizacije varijanci ili da se sprovede ponderirana ANOVA. Za nemonotoničnu reakciju na dozu mogu se upotrijebiti Dunnettov test (parametarski) na višestrukim uporeĐivanjema parova ili Mann-Whitneyjev test s Bonferronijevim prilagođavanjem (neparametarski). Ako je reakcija na dozu približno monotonična, mogu se upotrijebiti ostali statistički testovi (na primjer, JonckheereTerpstraov ili Williamsov test). Statistički dijagram nalazi se u Dodatku 8. i pomoć je pri izboru najprikladnijeg statističkog testa. Dodatne informacije nalaze se i u OECD-ovu Dokumentu o postojećim pristupima statističkoj analizi podataka o ekotoksičnosti.

Izvještavanje o rezultatima ispitivanja Podaci o ispitivanju sadrže:

Ustanova u kojoj se obavlja ispitivanje:

— odgovorne osobe i njihove odgovornosti tokom ispitivanja, — svaka laboratorijaa treba imati dokaz o akreditaciji.

Ispitivana hemikalija:

— karakterizaciju ispitivane hemikalije,

— fizičko stanje i relevantna fizičko-hemijska svojstva,

— metodu i učestalost pripreme ispitnih koncentracija, — informacije o stabilnosti i biorazgradivosti.

Rastvarač:

— karakterizaciju rastvarača (svojstva, upotrijebljena koncentracija),
— obrazloženje izbora rastvarača (ako nije riječ o vodi).

Ispitne životinje:

— vrstu i soj,

— dobavljača i njegov objekat,

— starost riba na početku ispitivanja i reproduktivni status / status mrijesta,

— podatke o postupku aklimatizacije životinja,

— tjelesnu masu riba na početku izlaganja (iz poduzorka upotrijebljenog ribljeg jata).

Uslovi ispitivanja:

— primijenjeni postupak ispitivanja (vrsta ispitivanja, gustina punjenja, gustina nasada itd.),

— metodu pripreme matičnih rastvora i protok,

— nazivne ispitne koncentracije, nedeljne izmjerene vrijednosti koncentracija ispitnih rastvora i primijenjene analitičke metode, srednje izmjerene vrijednosti i standardne devijacije u ispitnim posudama te dokaze da se izmjerene vrijednosti odnose na koncentracije ispitivane hemikalije u stvarnoj rastvoru,

— karakteristike vode za razrjeđivanje (uključujući pH-vrijednost, tvrdoću, baznost, temperaturu, koncentraciju rastvorenog kiseonika, nivo rezidualnog hlora, ukupni organski ugljenik, suspendovane čvrste supstance i sve ostale izmjerene vrijednosti),

— kvalitet vode u ispitnim posudama: pH-vrijednost, tvrdoću, temperaturu i koncentraciju rastvorenog kiseonika,

— precizne informacije o hranjenju (na primjer vrsti/vrstama hrane, porijeklu, količini i učestalosti hranjenja i analizu relevantnih kontaminanata ako postoji (na primjer polihlorovani bifenili, policiklički aromatičnii ugljenikovodici i organohlorni pesticidi).
Rezultati

— dokaze da su kontrole u skladu s kriterijumima prihvatljivosti ispitivanja,

— podatke o smrtnosti u svim ispitnim koncentracijama i kontrolama,

— primijenjene statističke analitičke metode, obradu podataka i obrazloženje primijenjenih metoda,

— podatke o biološkim zapažanjima mahromorfologije, uključujući sekundarna polna obilježja, proizvodnju jajašaca i VTG,

— rezultate analiza podataka, po mogućnosti u tabličnom i grafičkom obliku, — pojavu neobičnih reakcija riba i sve vidljive efekte ispitivane hemikalije.

3.1 Smjernice za tumačenje i prihvatanje rezultata ispitivanja

U ovom se odlomku navode određena razmatranja koja treba uzeti u obzir pri tumačenju rezultata ispitivanja različitih izmjerenih krajnjih tačaka. Rezultate je potrebno oprezno

tumačiti kada se čini da ispitivana hemikalija toksično djeluje ili utiče na opšte stanje ispitne životinje.

Pri određivanju raspona ispitnih koncentracija potrebno je paziti da se ne premaši maksimalna tolerisana koncentracija kako bi se mogli tumačiti podaci, Važno je da postoji najmanje jedna tretirana grupa u kojoj se ne pojavljuju znaci toksičnih efekata. Znake bolesti i toksičnih efekata potrebno je detaljno ocijeniti i o njima izvijestiti. Na primjer, moguće je da na nastajanje VTG-a u ženki utiču i opšta toksičnost te neendokrino toksični načini djelovanja, na primjer hepatotoksičnost. Međutim, u tumačenju efekata postiže se veća sigurnost ako postoje druge grupe, tretirane različitim koncentracijama, koje nisu narušene sistemskom toksičnošću.
Za prihvatanje rezultata ispitivanja potrebno je razmotriti nekoliko aspekata. Na primjer, nivoa VTG-a u kontrolnim grupama mužjaka i ženki trebale bi biti jasne i razlikovati se za približno tri reda veličine u debeloglave gavčice i zebrice, odnosno za jedan red veličine u medake. Primjeri raspona vrijednosti u kontrolnim i tretiranim grupama nalaze se u izvještajima o validaciji. Visoke vrijednosti VTG-a u mužjaka iz kontrolnih grupa mogu uticati na osjetljivost testa i njegovu sposobnost otkrivanja slabih agonista estrogena. Niske vrijednosti VTG-a u ženki iz kontrolnih grupa mogu uticati na osjetljivost testa i njegovu sposobnost otkrivanja inhibitora aromataze i antagonista estrogena. Validacione studije upotrebljavale su se za izradu te smjernice.

Što se tiče kvantifikacije proizvodnje jajašaca, ona je podložna bitnim varijacijama [koeficijent varijacije (CV) može iznositi od 20 do 60 %] koje mogu uticati na sposobnost testa da otkrije značajno opadanje proizvodnje jajašaca manje od 70 % dok se CV približava vrijednosti od 50 % ili više. Ako se CV zadržava na nižim vrijednostima (oko 20 – 30 %), test će biti prihvatljive snage (80 %) za otkrivanje smanjenja proizvodnje jajašaca od 40 – 50 %. Plan ispitivanja koje se primjenjuje na debeloglavu gavčicu, uključujući četiri ponovljena uzorka za svaku grupu tretiranu određenom koncentracijom, trebao bi omogućiti veću snagu krajnje tačke plodnosti u poređenju s planom ispitivanja sa samo dva ponovljena uzorka.

Ako laboratorijaa nije ranije sprovela test ili ako je došlo do znatnih promjena (na primjer promjene ribljeg soja ili dobavljača), savjetuje se sprovoĐenje studije tehničke osposobljenosti. Preporučuje se upotreba hemikalija koje uključuju niz načina djelovanja ili efekata na više krajnjih tačaka ispitivanja. U praksi se svaka laboratorijaa podstiče na izradu poljašnjih kontrolnih podataka za mužjake i ženke te na primjenu pozitivne kontrolne hemikalije za estrogensko djelovanje (na primjer 17β-estradiola pri 100 ng/l ili poznatog slabog agonista), čija je posljedica povećanje VTGa u mužjaka riba, pozitivne kontrolne hemikalije za inhibiciju aromataze (na primjer fadrozol ili prohloraz pri 300 µg/l), čija je posljedica smanjenje VTG-a u ženki riba, te pozitivne kontrolne hemikalije za androgensko djelovanje (na primjer 17β-trenbolon pri 5 µg/l), čija je posljedica indukcija sekundarnih polnih obilježja u ženki debeloglave gavčice i medake. Svi ti podaci mogu se uporediti s dostupnim podacima iz validacionih studija kako bi se obezbijedila osposobljenost laboratorijaa.

Uopšteno, vrijednosti VTG-a smatraju se pozitivnima ako je došlo do statistički značajnog povećanja VTG-a u mužjaka ($p < 0,05$) ili statistički značajnog smanjenja u ženki ($p < 0,05$) najmanje pri najvećoj ispitivanoj dozi u poređenju s kontrolnom grupom i u izostanku znakova opšte toksičnosti. Pozitivan rezultat dodatno je potkrijepljen demonstracijom biološki vjerovatnog odnosa između doze i krive reakcije. Kako je prethodno navedeno, smanjenje VTG-a ne mora u potpunosti biti endokrinog porijekla, ali pozitivan rezultat u pravilu bi trebalo tumačiti kao dokaz endokrinog djelovanja *in vivo* te je potrebno pokrenuti aktivnosti u svrhu dodatnih pojašnjenja. Regulatorna tijela mogu zahtijevati histopatološku pretragu gonada radi utvrđivanja reproduktivne sposobnosti ispitnih životinja i omogućavanja procjene snage dokaza ispitnih rezultata. Histopatološka pretraga gonada možda neće biti

potrebna u slučajevima kad su VTG ili sekundarna polna obilježja pozitivni (tj. povećanje ili smanjenje VTG-a ili indukcija sekundarnih polnih obilježja).

Dodatak 1.

SKRAĆENICE I DEFINICIJE

CV: koeficijent varijacije

ELISA: imunoenzimski test (eng. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Os HPG: os hipotalamus-hipofiza-gonade.

Gustina punjenja: mokra masa ribe po volumenu vode.

MTK: maksimalna tolerisana koncentracija, iznosi oko 10 % vrijednosti LC_{50}.

Gustina nasada: broj riba po volumenu vode.
Ispitivana hemikalija: bilo koja supstanca ili smješa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

VTG: vitelogenin je fosfolipoglikoproteinski prekursor proteina žumanca koji je u pravilu prisutan u polno aktivnih ženki svih vrsta koje liježu jaja.

Dodatak 2.

EKSPERIMENTALNI USLOVI ZA TEST IZBORA ENDOKRINOG SISTEMA RIBA

1. Preporučene vrste	Debeloglava gavčica (*Pimephales promelas*)	Medaka (*Oryzias latipes*)	Zebrica (*Danio rerio*)
2. Vrsta ispitivanja	Protačno	Protačno	Protačno
3. Temperatura vode	25 ± 2 °C	25± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Kvaliteta osvjetljenja	Fluorescentne sijalice (širokog spektra)	Fluorescentne sijalice (širokog spektra)	Fluorescentne sijalice (širokog spektra)
5. Jačina svjetla	10 – 20 µE/m^2/s, 540 – 1 000 lux, ili 50 – 100 ft-c (nivoa u laboratorijaskim uslovima)	10 – 20 µE/m^2/s, 540 – 1 000 lux, ili 50 – 100 ft-c (nivoa u laboratorijaskim uslovima)	10 – 20 µE/m^2/s, 540 – 1 000 lux, ili 50 – 100 ft-c (nivoa u laboratorijaskim uslovima)
6. Fotoperiod (postupno pojačavanje svjetla u zoru odnosno smanjivanje u sumrak moguće je, no ne smatra se nužnim)	16 sati svjetla, 8 sati tame	12 – 16 sati svjetla, 12 – 8 sati tame	12 – 16 sati svjetla, 12 – 8 sati tame
7. Gustina punjenja:	< 5 g po l	< 5 g po l	< 5 g po l
8. Veličina ispitne komore	Najmanje 10 l	Najmanje 2 l	Najmanje 5 l

9. Volumen ispitnog rastvora	Najmanje 8 l	Najmanje 1,5 l	Najmanje 4 l
10. Izmjene volumena ispitnih rastvora	Najmanje šest puta dnevno	Najmanje pet puta dnevno	Najmanje pet puta dnevno
11. Starost ispitnih organizama			
12. Približna mokra masa odraslih riba (g)	Ženke: 1,5 ± 20 % Mužjaci: 2,5 ± 20 %	Ženke: 0,35 ± 20 % Mužjaci: 0,35 ± 20 %	Ženke: 0,65 ± 20 % Mužjaci: 0,4 ± 20 %
13. Broj riba po ispitnoj posudi	Šest (dva mužjaka i četiri ženke)	Šest (tri mužjaka i tri ženke)	Deset (pet mužjaka i pet ženki)
14. Broj tretiranja	= tri (uvećano za odgovarajući broj kontrola)	= tri (uvećano za odgovarajući broj kontrola)	= tri (uvećano za odgovarajući broj kontrola)
15. Broj posuda po tretiranju	Najmanje četiri	Najmanje četiri	Najmanje dvije
16. Broj riba po ispitnoj koncentraciji	16 odraslih ženki i osam mužjaka (četiri ženke i dva mužjaka u svakoj posudi s ponovljenim uzorkom)	12 odraslih ženki i 12 mužjaka (tri ženke i tri mužjaka u svakoj posudi s ponovljenim uzorkom)	Deset odraslih ženki i deset mužjaka (pet ženki i pet mužjaka u svakoj posudi s ponovljenim uzorkom)
17. Hranjenje	Živi ili zamrznuti račići Artemia ili njihove larve dva ili tri puta dnevno (*ad libitum*), komercijalno dostupna hrana ili kombinacija prethodno navedenoga	Larve račića Artemia dva ili tri puta dnevno (*ad libitum*), komercijalno dostupna hrana ili kombinacija prethodno navedenoga	Larve račića Artemia dva ili tri puta dnevno (*ad libitum*), komercijalno dostupna hrana ili kombinacija prethodno navedenoga
18. Dozračivanje (aeracija)	Nikakvo, osim ako koncentracija rastvorenog kiseonika padne ispod 60 % zasićenja vazduhom	Nikakvo, osim ako koncentracija rastvorenog kiseonika padne ispod 60 % zasićenja vazduhom	Nikakvo, osim ako koncentracija rastvorenog kiseonika padne ispod 60 % zasićenja vazduhom

19. Voda za razrjeđivanje	Čista površinska, izvorska ili rekonstituirana voda ili voda iz slavine iz koje je uklonjen hlor	Čista površinska, izvorska ili rekonstituirana voda ili voda iz slavine iz koje je uklonjen hlor	Čista površinska, izvorska ili rekonstituirana voda ili voda iz slavine iz koje je uklonjen hlor
20. Period prije izlaganja	Preporučuje se 7 – 14 dana	Preporučuje se 7 – 14 dana	Preporučuje se 7 – 14 dana
21. Trajanje izlaganja hemikaliji	21 dan	21 dan	21 dan
22. Biološke krajnje tačke	— preživljavanje, — ponašanje,	— preživljavanje, — ponašanje,	— preživljavanje, — ponašanje,
	— plodnost, — 2y polna obilježja, — VTG, — histopatološka pretraga gonada (nije obavezno)	— plodnost, — 2y polna obilježja, — VTG, — histopatološka pretraga gonada (nije obavezno)	— plodnost, — VTG, — histopatološka pretraga gonada (nije obavezno)
23. Prihvatljivost ispitivanja	Rastvoreni kiseonik ≥ 60 % zasićenosti; srednja temperatura od 25 ± 2 °C; 90 % preživljavanja riba u kontrolnim grupama; izmjerene ispitne koncentracije unutar 20 % srednjih izmjerenih vrijednosti za grupu tretiranu određenom koncentracijom.	Rastvoreni kiseonik ≥ 60 % zasićenosti; srednja temperatura od 25 ± 2 °C; 90 % preživljavanja riba u kontrolnim grupama; izmjerene ispitne koncentracije unutar 20 % srednjih izmjerenih vrijednosti za grupu tretiranu određenom koncentracijom.	Rastvoreni kiseonik ≥ 60 % zasićenosti; srednja temperatura od 26 ± 2 °C; 90 % preživljavanja riba u kontrolnim grupama; izmjerene ispitne koncentracije unutar 20 % srednjih izmjerenih vrijednosti za grupu tretiranu određenom koncentracijom.

Dodatak 3.

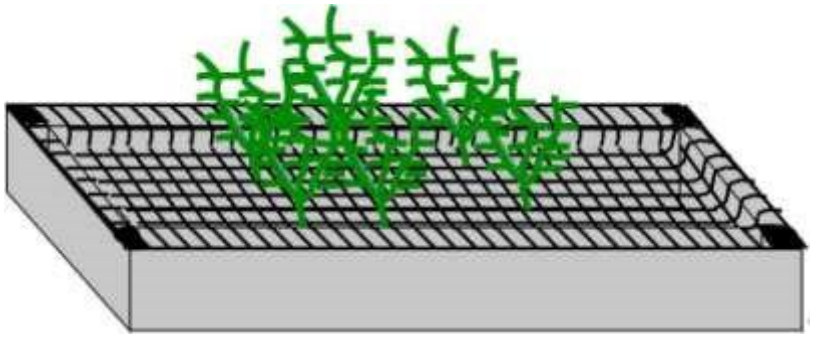
HEMIJSKA SVOJSTVA PRIHVATLJIVE VODE ZA RAZRJEĐIVANJE

KOMPONENTA	KONCENTRACIJE
lebdeće čestice	< 20mg/l
ukupni organski ugljenik	< 2 mg/l
nejonizovani amonijak	< 1 µg/l
rezidualni hlor	< 10 µg/l
ukupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
ukupni organohlorni pesticidi plus polihlorovani bifenili	< 50 ng/l
ukupni organski hlor	< 25 ng/l

Dodatak 4.A

SUPSTRAT ZA MRIJEŠĆENJE ZEBRICE

Ladica za mrijest: staklena, dimenzija na primjer 22 × 15 × 5,5 cm (d × š × v), prekrivena žičanom rešetkom od nerĐajućeg čelika (širina otvora 2 mm). Rešetka bi trebala prekrivati otvor posude ispod ruba.



Supstrat za mriješćenje treba pričvrstiti na rešetku. To bi trebao biti prostor u koji ribe mogu ulaziti. Na primjer, prikladno je dodatno akvarijumsko bilje izraĐeno od zelene plastike (napomena: potrebno je uzeti u obzir moguću adsorpciju ispitivane hemikalije na plastiku). Plastiku je potrebno dovoljno dugo ispirati dovoljnom količinom tople vode kako bi se osiguralo da ne doĐe do otpuštanja hemikalija u ispitnu vodu. Pri upotrebi stakla potrebno je osigurati da ne doĐe do povrijeĐivanja ili priklještenja riba tokom kretanja.

Udaljenost između ladice i stakla trebala bi biti najmanje 3 cm kako bi se osiguralo da do mriješćenja ne doĐe izvan ladice. Jajašca izmriještena u ladicu padaju kroz rešetku i uzorci se mogu uzeti od 45 do 60 minuta nakon početka osvjetljavanja. Prozirna se jajašca ne lijepe i mogu se jednostavno prebrojiti pomoću transverzalnog svjetla. Pri upotrebi pet ženki po posudi, do 20 jajašaca dnevno može se smatrati malim brojem, do 100 srednjim, a više od 100 velikim. Ladicu za mrijest potrebno je maknuti, jajašca ukloniti i vratiti ladicu u ispitnu posudu što kasnije naveče ili vrlo rano ujutro. Period do vraćanja ladice ne smije trajati duže od jednog sata jer u suprotnom supstrat za mriješćenje može potaknuti pojedinačno parenje

i mriješćenje u neuobičajeno doba. U slučaju potrebe za kasnijim vraćanjem ladice za mrijest to treba učiniti najmanje devet sati nakon početka osvjetljavanja. U to kasno doba dana više nema mriješćenja.

Dodatak 4.B

SUPSTRAT ZA MRIJEŠĆENJE DEBELOGLAVE GAVČICE

Dvije ili tri kombinovane pločice i ladice za mrijest od plastike/keramike/stakla ili nerĐajućeg čelika smještaju se u svaku ispitnu komoru (na primjer sivi polukružni oluk dužine 80 mm koji se nalazi na ladici U-profila dugačkoj 130 mm) (vidjeti sliku). Pravilno pripremljene plastične ili keramičke pločice pokazale su se prikladnim za supstrat za mriješćenje (Thorpe *et al*. 2007).

Preporučuje se abrazija pločica kako bi se poboljšalo prianjanje. Ladicu treba pregledati kako bi se ribama spriječio pristup palim jajašcima, osim ako je prianjanje jajašaca dokazano za primijenjeni supstrat za mriješćenje.

Podloga služi zadržavanju svih jajašaca koja se nisu prilijepila za površinu pločice i koja bi pala na dno akvarijuma (ili jajašaca koja su položena direktno na ravnu plastičnu podlogu). Sve supstrate za mriješćenje prije upotrebe potrebno je ispirati u vodi za razrjeđivanje najmanje 12 sati.

Dodatak 5.A

PROCJENA SEKUNDARNIH POLNIH OBILJEŽJA U DEBELOGLAVE GAVČICE RADI OTKRIVANJA ODREĐENIH ENDOKRINO AKTIVNIH HEMIKALIJA

Pregled Potencijalno važna obilježja fizičkog izgleda u odraslih debeloglavih gavčica pri ispitivanju endokrinih disruptora uključuju boju tijela (svijetlu/tamnu boju), uzorke boje (postojanje ili izostanak pruga), oblik tijela (oblik glave i grudnog područja, zaobljenost abdomena) te posebna sekundarna polna obilježja (broj i veličinu izraslina polno zrelih riba, veličinu zadebljanja ispred leĐnog peraja.

Izrasline se nalaze na glavi (zadebljanju ispred leĐne peraje) reproduktivno aktivnih mužjaka debeloglave gavčice te su u pravilu rasporeĐene u bočno simetričnom uzorku (Jensen *et al.* 2001). U ženki iz kontrolnih grupa i mladih mužjaka i ženki nije uočen razvoj izraslina (Jensen *et al*. 2001). Moguća je pojava do osam pojedinačnih izraslina oko očiju i između nosnica mužjaka. Najviše izraslina i najveće izrasline nalaze se u dvijema uporednim linijama neposredno ispod nosnica i iznad usta. U brojnih riba grupe izraslina nalaze se ispod donje čeljusti; jedan par izraslina u pravilu se nalazi najbliže ustima, dok se dalje prema trbuhu mogu nalaziti do četiri izrasline. Stvarni broj izraslina rijetko prekoračuje 30

(raspon od 18 do 28; Jensen *et al*. 2001). Dominantne izrasline (u brojčanom smislu) prisutne su kao jedinstvena, relativno okrugla struktura čija je visina približno jednaka polumjeru. Većina reproduktivno aktivnih mužjaka ima i barem nekoliko izraslina koje su uvećane i izražene tako da ih je nemoguće razlikovati kao pojedinačne strukture.

Neke vrste endokrino disruptivnih hemikalija mogu prouzrokovati neuobičajenu pojavu određenih sekundarnih polnih obilježja u suprotnog pola; na primjer, agonisti receptora za androgene, poput 17α-metiltestosterona ili 17β-trenbolona, mogu prouzrokovati razvoj izraslina u ženki debeloglave gavčice (Smith 1974; Ankley *et al.* 2001; 2003.), dok agonisti receptora za estrogene mogu prouzrokovati smanjenje broja ili veličine izraslina u mužjaka (Miles-Richardson *et al*. 1999; Harries *et al*. 2000).

Posebne proizvode i/ili opremu moguće je zamijeniti sličnim dostupnim materijalima.

Najbolji je pregled pomoću osvijetljene lupe ili stereoskopskog mikroskopa s osvjetljenjem i sočivom objektiva od 3x. Posmatraju se leđa i glave riba (glava prema gledaocu).

— Smještite ribe u malu Petrijevu šolja (na primjer prečnika 100 mm) glavom prema naprijed i trbuhom prema dolje. Prepoznajte izrasline. Nježno i polako okrećite ribe s jedne na drugu stranu kako biste pronašli izrasline. Izbirite i ocijenite izrasline.

— Pregledajte površinu trbušne strane glave tako da ribu u Petrijevoj šolju smještite leđima prema naprijed.

— Posmatranje svake ribe trebalo bi trajati najviše dvije minute.

Brojanje i ocjenjivanje izraslina

Utvrđeno je šest posebnih područja za ocjenu pojave i razvoja izraslina u odraslih debeloglavih gavčica. Izrađen je obrazac za evidentiranje mjesta i broja izraslina (vidjeti završetak ovog Dodatka). Broj se izraslina evidentira, a njihova se veličina ocjenjuje kao: 0 – izostanak, 1 – prisutne, 2 – uvećane i 3 – izražene za svaki organizam (slika 1.).

Ocjena 0 – izostanak izraslina. Ocjena „1 – prisutne” odnosi se na sve izrasline s jednostrukim vrhom. Ocjena „2 – uvećane” odnosi se na tkivo koje nalikuje zvjezdici i koje u pravilu ima veliku radijalnu osnovu s udubljenjima i brazdama koje se izdižu iz središta. Vrh izrasline često je više nazubljen, ali u nekim slučajevima može biti i zaobljen. Ocjena „3 – izražene” odnosi se na prilično velike i zaobljene izrasline slabije definisane strukture. Te će izrasline u nekim slučajevima napraviti jedinstvenu duž jednog ili kombinacije područja (B, C i D, prema opisu u nastavku). Boja i uzorak nalikuju ocjeni 2, ali su u nekim slučajevima prilično neodređeni. Posljedica primjene ovog sistema ocjenjivanja će biti ukupna ocjene izraslina < 50 u normalnog kontrolnog mužjaka koji ima od 18 do 20 izraslina (Jensen *et al*. 2001).

Slika 1.

Stvarni broj izraslina kod nekih riba može prelaziti broj polja u obrascu za određeno područje ocjenjivanja. U tom slučaju moguće je dodatne ocjene navesti desno ili lijevo od polja. Stoga obrazac ne treba da je simetričan. Dodatna metoda mapiranja izraslina koje su u paru ili se nalaze u grupama duž horizontalne prave usta jeste dvostruko označavanje dviju tačaka za ocjenjivanje izraslina u jednom polju.

Područja mapiranja:

A – izrasline oko očiju. Nalaze se s leĐne i trbušne strane oko prednjeg ruba oka. Često višestruke kod zrelih mužjaka iz kontrolnih grupa, nisu prisutne u ženki iz kontrolnih grupa, u pravilu u paru (po jedna blizu svakog oka) ili pojedinačne u ženki izloženih androgenima.

B-izrasline između nosnica (pora osjetilnih kanala). U pravilu u parovima u mužjaka iz kontrolnih grupa na višim stadijumima (2 – uvećane ili 3 – izražene) razvoja. Izraslina nema u ženki iz kontrolnih grupa, dok je u ženki izloženih androgenima uočena njihova pojava i razvoj.

C – izrasline neposredno ispred nosnica, paralelno s ustima. U pravilu uvećane ili izražene kod zrelih mužjaka iz kontrolnih grupa. Prisutne ili uvećane kod slabije razvijenih mužjaka ili ženki tretiranih androgenima.

D – izrasline smještene paralelno duž linije ustiju. U pravilu se ocjenjuju kao razvijene kod mužjaka iz kontrolnih grupa. Nema ih kod ženki iz kontrolnih grupa, ali su prisutne kod ženki izloženih androgenima.

E – izrasline na donjoj čeljusti, blizu usta, u pravilu malene i obično u parovima. Njihova pojava varira kod mužjaka iz kontrolnih grupa, tretiranih mužjaka i tretiranih ženki.

F – izrasline s trbušne strane u odnosu na E. Obično malene i u parovima. Prisutne kod mužjaka iz kontrolnih grupa i ženki izloženih androgenima.

Obrazac za ocjenu izraslina:

Oznaka _____ **Brojčana ocjena**

Datum _____ 1 – prisutne

Ukupan broj bodova ___ 2 – uvećane

3 – izražene

	A	X1	X1	X1	X1

	B	X1	X1	X1	X1

	C	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
	D	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1

	E	X1	X1	
F	X1	X1	X1	X1

Dodatak 5.B

PROCJENA SEKUNDARNIH POLNIH OBILJEŽJA U MEDAKE RADI OTKRIVANJA ODREĐENIH ENDOKRINO AKTIVNIH HEMIKALIJA

U nastavku se opisuje mjerenje papilarnih procesa koji su sekundarno polno obilježje u medake (*Oryzias latipes*).

Nakon vađenja jetre (Dodatak 6.) trup se stavlja u epruvetu s približno 10 ml 10-postotnog neutralnog puferisanog formalina (glavom prema gore i repom prema dolje). Ako je gonada fiksirana u rastvoru koja nije 10-postotni neutralni puferisani formalin, pomoću skalpela napravite poprečni rez preko trupla između prednjeg dijela podrepne peraje i anusa, pazeći pritom da ne oštetite gonoporu i samu gonadu (slika 3.). Stavite glavu s prednjim dijelom ribe u rastvor za fiksiranje radi očuvanja gonade, a repni dio u 10-postotni neutralni puferisani formalin prema prethodnom opisu.

Nakon što ste ribu stavili u 10-postotni neutralni puferisani formalin, pincetom uhvatite prednji dio podrepne peraje i držite ga presavijenog oko 30 sekundi kako biste raširili podrepnu peraju. Pri hvatanju podrepne peraje pincetom uhvatite i nekoliko šipčica peraje u prednjem dijelu, pazeći pritom da ne ogrebete papilarne procese.

Nakon što je podrepna peraja bila raširena 30 sekundi, staviti tijelo ribe u 10-postotni neutralni puferirani formalin na sobnoj temperaturi do mjerenja papilarnih procesa (mjerenje je potrebno ssprovesti nakon najmanje 24-satnog fiksiranja). Mjerenje

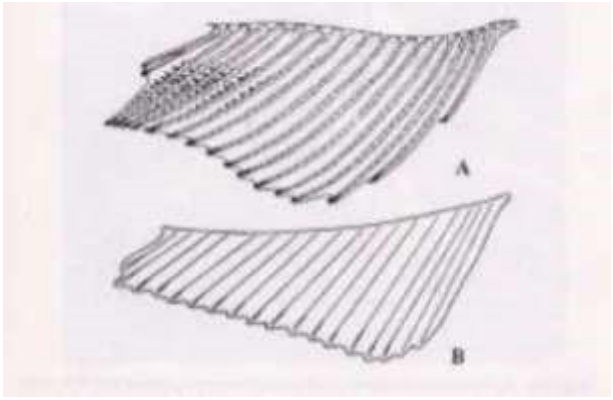
Nakon fiksiranja tijela ribe u 10-postotnom neutralnom puferisanom formalinu u trajanju od najmanje 24 sata, izvadite trup ribe iz epruvete i obrišite formalin filtarskim papirom (ili papirnatim peškirom).

Položite ribu trbuhom prema gore. Makazama pažljivo zarežite podrepnu peraju (poželjno je, osim podrepne peraje, odrezati i mali dio perajne potpore).

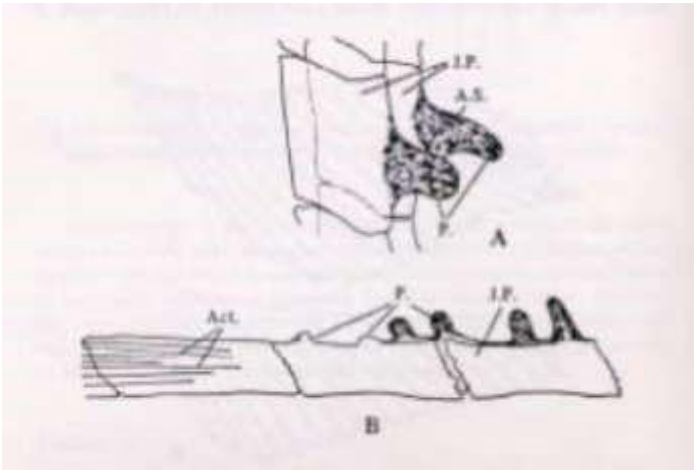
Pincetom uhvatiti prednji dio odrezane podrepne peraje i staviti ga na stakalce s nekoliko kapi vode. Zatim podrepnu peraju pokriti pokrivnim stakalcem. Pri hvatanju podrepne peraje pincetom se ne smiju ogresti papilarni procesi.

Prebrojiti kosti bodlje s papilarnim procesima pomoću brojača pod biološkim mikroskopom (uspravni ili invertni mikroskop). Papilarni procesi uočavaju se kad je mala grupaa procesa vidljiva na poslednjem dijelu kosti bodlje. U obrazac zabilježite broj kosti bodlje s papilarnim procesima na svakoj šipčici peraje (na primjer, prva šipčica peraje: 0, druga šipčica peraje: 10, treća šipčica peraje: 12 itd.) te u tabelu u Excelu unesite zbir tih brojeva prema pojedinačnim ribama. Po potrebi fotografisati podrepnu peraju i na fotografiji prebrojiti kosti bodlje s papilarnim procesima. Nakon mjerenja stavite podrepnu peraju u epruvetu kako je opisano u tački 1. i sačuvajte je.

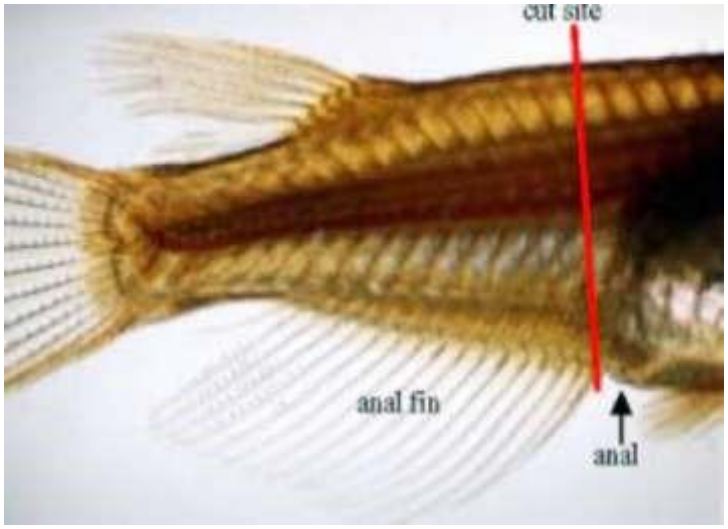
Slika 1. Dijagram s prikazom polnih razlika u obliku i veličini podrepne peraje. A – mužjak; B – ženka.



Slika 2.A procesi na kostima bodlje šipčice podrepne peraje. J.P. – kost bodlje; A.S. – aksijalni prostor; P. – proces. B – krajnji dio šipčice peraje. Na vrhu se nalaze Actinotrichia (Act.).



Slika 3. Fotografija tijela ribe i prikaz mjesta reza kad je gonada fiksirana u rastvoru za fiksiranje koja nije 10-postotni neutralni puferisani formalin. U tom slučaju ostatak tijela odrezat će se između prednjeg dijela podrepne peraje i anusa pomoću skalpela (crvena linija); glava s prednjim dijelom ribe stavit će se u rastvor za fiksiranje gonade, a repni dio u 10-postotni neutralni puferisani formalin.



Dodatak 6.

PREPORUČENI POSTUPCI ZA UZIMANJE UZORAKA ZA ANALIZU VITELOGENINA

Potrebno je paziti da ne dođe do unakrsne kontaminacije uzoraka VTG-a mužjaka i ženki.

Postupak 1.A: Debeloglava gavčica, uzimanje krvi iz repne vene/arterije

Nakon anestezije, korijen repa djelimično se odvaja skalpelom i uzima se krv iz repne vene/arterije pomoću heparinizovane mikrohematokritske kapilarne cjevčice. Nakon uzimanja krvi plazma se brzo izoluje centrifugiranjem pri 15 000 *g* u trajanju od tri minute (ili centrifugiranjem u trajanju od deset minuta pri 15 000 *g* na 4 °C). Postotak hematokrita može se, po želji, utvrditi nakon centrifugiranja. Plazma se zatim uklanja iz mikrohematokritske cjevčice i čuva u epruvetu za centrifugu uz 0,13 jedinica aprotinina
(inhibitora proteaze) na – 80 °C do mogućnosti određivanja VTG-a. Zavisi od veličini debeloglave gavčice (koja zavisi od pola), prikupljena količina plazme obično se kreće od pet do 60 mikrolitara po ribi (Jensen *et al*. 2001).

Postupak 1.B: Debeloglava gavčica, uzimanje krvi iz srca

Druga je mogućnost uzimanje krvi punkcijom srca pomoću heparinizovanog špric (1 000 jedinica heparina po ml). Krv se stavlja u Eppendorfove epruvete (koje se čuvaju na ledu) i zatim centrifugira (pet minuta, 7 000 *g*, na sobnoj temperaturi). Plazmu treba premjestiti u čiste Eppendorfove epruvete (u alikvotima ako to dopušta volumen plazme) i odmah smrznuti na – 80 °C do analize (Panter *et al*. 1998).

Postupak 2.A: Japanska medaka, vađenje jetre u medake

Uklanjanje ispitne ribe iz ispitne komore

Ispitnu ribu potrebno je izvaditi iz ispitne komore malom mrežom u obliku žlice. Pazite da ne ispustite ispitnu ribu u ostale ispitne komore.

Ispitne ribe je potrebno vaditi sljedećim redoslijedom: kontrola, kontrola s rastvaračem (ako postoji), najniža koncentracija, srednja koncentracija, najviša koncentracija i pozitivna kontrola. Osim toga, iz ispitne komore treba izvaditi sve mužjake prije vađenja preostalih ženki.

Pol ispitnih riba utvrđuje se na osnovu poljašnjih sekundarnih polnih obilježja (na primjer oblika podrepne peraje).

Stavite ribu u rezervoar za transport i odnesite je do radne ćelije radi vaĐenja jetre. Provjerite tačnost oznaka na ispitnoj komori i rezervoaru za transport i provjerite je li broj riba koje su izvaĐene iz ispitne komore i broj riba preostalih u ispitnoj komori u skladu s očekivanjima.

Ako se pol ne može utvrditi iz poljašnjeg izgleda riba, izvadite sve ribe iz ispitne komore. Pol je u tom slučaju potrebno utvrditi posmatranjem gonade ili sekundarnih polnih obilježja pod stereoskopskim mikroskopom.

Vađenje jetre

Premjestite ispitnu ribu iz rezervoara za transport u rastvor anestetika malom mrežom u obliku žice.

Nakon anestezije pincetom (običnom) premjestite ispitnu ribu na filtarski papir (ili papirni peških). Pri hvatanju ispitne ribe pincetom obuhvatite glavu kako ne bi došlo do kidanja repa.

Obrišite vodu s površine ispitne ribe filtarskim papirom (ili papirnim peškirom).

Položite ribu trbuhom prema gore. Zatim makazama napravite mali poprečni rez od leĐnog dijela vrata do područja srednjeg trbuha.

Ubaciti makazice u mali rez i zarežite trbuh od tačke sa zadnje strane škržnog plašta do prednje strane anusa duž središnje linije abdomena. Paziti da makazice ne ubacite preduboko kako ne bi došlo do oštećenja jetre i gonade.

Obavite sljedeće postupke pod stereoskopskim mikroskopom.

Položite ispitnu ribu trbuhom prema gore na papirnati peških (pri ruci moraju biti i staklena Petrijeva zdjelica ili stakalce).

Proširite trbušne šupljine preciznom pincetom i izvadite unutrašnje organe. Prihvatljivo je, po potrebi, i vaĐenje unutrašnjih organa uklanjanjem jedne strane zida trbušne šupljine.

Otkrijte jedinjenjeeni dio jetre i žučnog mjehura drugom preciznom pincetom. Zatim uhvatite žučni kanal i odrežite žučni mjehur. Pazite da ne doĐe do cijepanja žučnog mjehura.

Uhvatite jednjak i na isti način razdvojite probavni trakt od jetre. Pazite da ne doĐe do izlijevanja sadržaja probavnog trakta. Odvojite zadnji dio probavnog trakta od anusa i izvadite ga iz trbušne šupljine. Uklonite masno tkivo i ostala tkiva s poljašnjeg dijela jetre. Pazite da ne ogrebete jetru.

Preciznom pincetom uhvatite krvne žile uz jetru i uklonite jetru iz trbušne šupljine.

Položite jetru na stakalce. Po potrebi, s površine jetre preciznom pincetom uklonite višak masnog tkiva i okolnog tkiva (na primjer trbušnu ovojnicu).

Izvažite jetru pomoću elektroničke analitičke vage i mikroepruvete od 1,5 ml kao tare. Zabilježite vrijednost u obrazac (očitanje: 0,1 mg). Potvrdite podatke o identifikaciji na naljepnici mikroepruvete.

Zatvorite poklopac mikroepruvete u kojoj se nalazi jetra. Sačuvajte je u stalak za hlaĐenje (ili stalak s ledom).

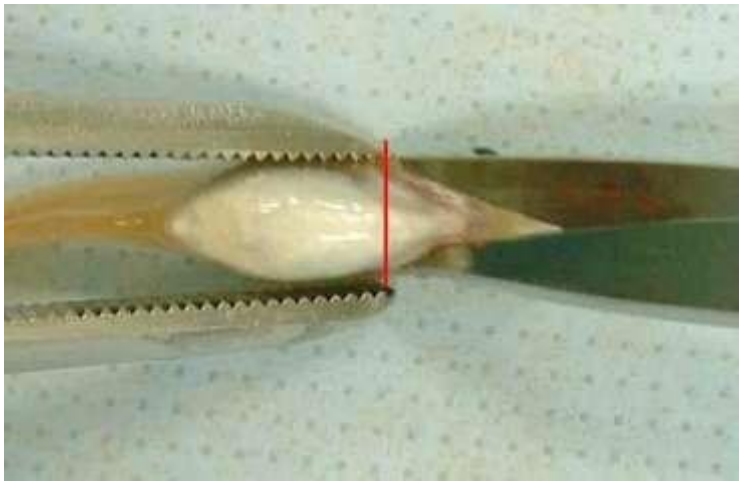
Nakon vaĐenja jedne jetre instrumente očistite ili ih zamijenite čistima.

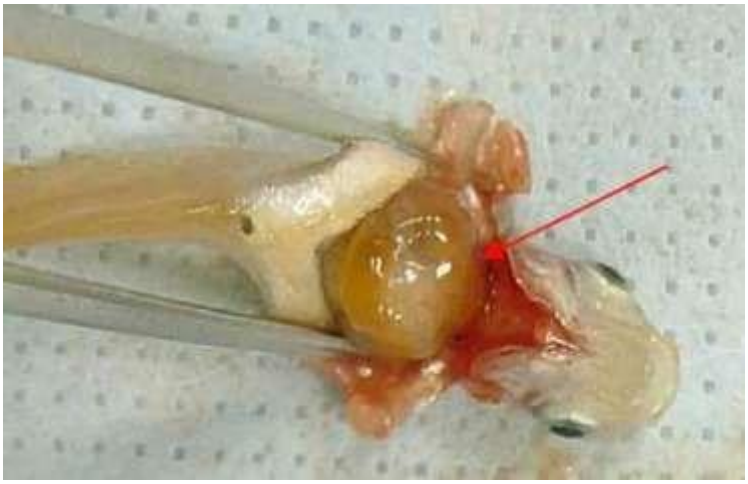
Izvadite jetre svim ribama u rezervoaru za transport kako je prethodno opisano. Nakon vađenja jetara svim ribama u rezervoaru za transport (odnosno svim mužjacima ili ženkama u ispitnoj komori) stavite sve uzorke jetara u stalak za epruvete s identifikacijskom oznakom i sačuvajte ih u zamrzivač. U slučaju uzimanja jetara za preliminarno tretiranje ubrzo nakon vađenja primjerci se do sljedeće radne ćelije nose u stalku za hlađenje (ili stalku s ledom).

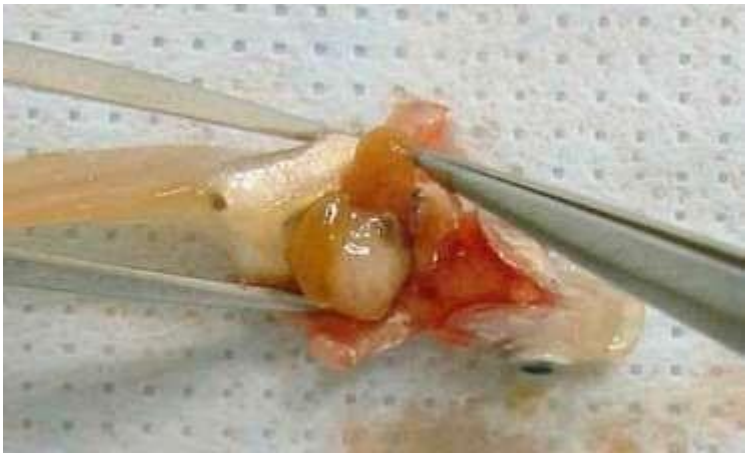
Nakon vađenja jetre trup ribe podvrgava se histološkoj pretrazi gonade i mjerenju sekundarnih polnih obilježja.

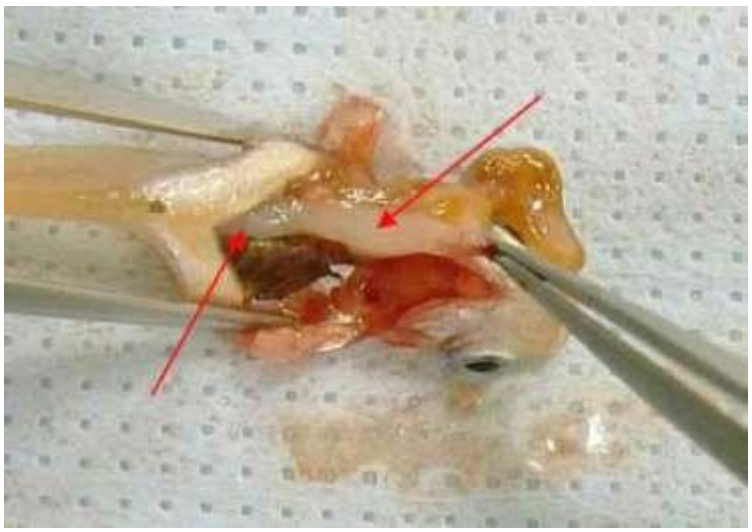
Uzorak

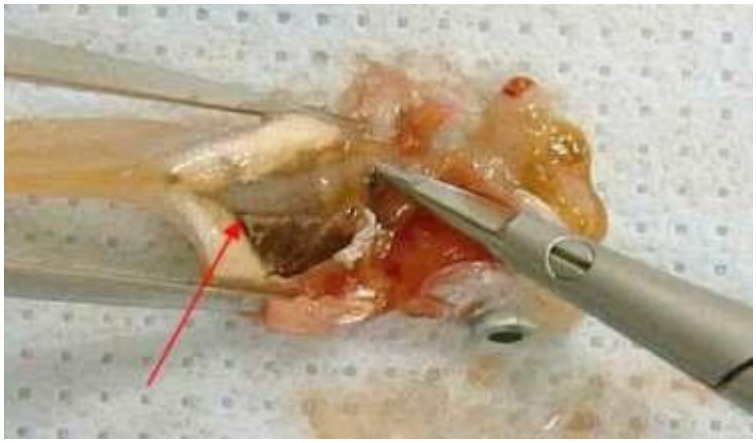
Sačuvajte uzorke jetara ispitnih riba na ≤ – 70 °C ako se ne podvrgavaju preliminarnom tretiranju ubrzo nakon vađenja.











<u>Postupak 2.B</u>: Japanska medaka (*Oryzias latipes*), preliminarno tretiranje jetre za analizu vitelogenina

Uzeti bocu homogenizacionog pufera iz kompleta za analizu ELISA i ohladiti je smrvljenim ledom (temperatura rastvora: ≤ 4 °C). U slučaju upotrebe homogenizacionog pufera iz sistema EnBio ELISA rastvor rastvoriti na sobnoj temperaturi, a zatim bocu ohladiti smrvljenim ledom.

Izračunati volumen homogenizacionog pufera za jetru na osnovu njene mase (dodati 50 µl homogenizacionog pufera po mg mase jetre). Na primjer, ako masa jetre iznosi 4,5 mg, volumen homogenizacionog pufera za jetru iznosi 225 µl. Sastavite lista volumena homogenizacionog pufera za sve jetre.

Priprema jetre za preliminarno tretiranje

Neposredno prije tretiranja iz zamrzivača izvaditi mikroepruvetu od 1,5 ml u kojoj se nalazi jetra.

Preliminarno tretiranje jetre mužjaka potrebno je obaviti prije ženki kako bi se izbjegla kontaminacija vitelogeninom. Osim toga, preliminarno tretiranje ispitnih grupa potrebno je obaviti sljedećim redoslijedom: kontrola, kontrola s rastvaračem (ako postoji), najniža koncentracija, srednja koncentracija, najviša koncentracija i pozitivna kontrola.

Broj mikroepruveta od 1,5 ml s uzorcima jetara izvađenih iz zamrzivača u određenom trenutku ne smije premašiti broj mikroepruveta koje je moguće istovremeno centrifugirati.

Poređati mikroepruvete od 1,5 ml s uzorcima jetara prema redoslijedu broja primjerka na stalku s ledom (jetre ne treba rassupstanciti).

Postupak preliminarnog tretiranja

1) Dodavanje pufera za homogenizaciju

Provjeriti lista kako biste utvrdili koji je volumen homogenizacionog pufera potrebno upotrijebiti za određeni uzorak jetre i podesiti mikropipetu (raspon volumena: 100 – 1 000 µl) na odgovarajući volumen. Na mikropipetu staviti čisti vrh.

Uzet homogenizacioni pufer iz boce s reagensom i dodati pufer u mikroepruvetu od 1,5 ml u kojoj se nalazi jetra.

Dodati homogenizacioni pufer u sve mikroepruvete od 1,5 ml u kojima se nalazi jetra prema prethodno opisanom postupku. Vrh mikropipete nije potrebno zamijeniti novim. Međutim, vrh je potrebno zamijeniti ako je kontaminiran ili se sumnja na kontaminaciju. **2) Homogenizacija jetre**

— Na homogenizator mikroepruveta staviti novi tučak za homogenizaciju.

— Staviti tučak u mikroepruvetu od 1,5 ml. Držati homogenizator mikroepruveta tako da jetru pritiskamo između površine tučka i unutrašnjeg zida mikroepruvete od 1,5 ml.

— Uključiti homogenizator mikroepruveta na 10 do 20 sekundi. Tokom postupka hladiti mikroepruvetu od 1,5 ml smrvljenim ledom.

— Izvaditi tučak iz mikroepruvete i odložiti je na približno deset sekundi. Zatim vizualnim pregledom utvrditi stanje suspenzije.

— Ako su u suspenziji vidljivi djelići jetre, ponoviti postupke 3. i 4. kako bi pripremili zadovoljavajući homogenat jetre.

— Ohladiti suspendovani homogenat jetre na stalku s ledom do centrifugiranja.

— Zamijeniti tučak novim za svaki homogenat.

— Homogenizirati sve jetre homogenizacionim puferom prema prethodno opisanom postupku.

3) Centrifugiranje suspendovanog homogenata jetre

— Provjeriti je li temperatura rashlađene komore za centrifugiranje ≤ 5 °C.

— Staviti mikroepruvete od 1,5 ml u kojima se nalazi suspendovani homogenat jetre u rashlađenu centrifugu (po potrebi prilagoditi ravnotežu).

— Centrifugirati suspendovani homogenat jetre deset minuta pri 13 000 *g* na ≤ 5 °C. Međutim, u slučaju pravilne separacije supernatanta centrifugalnu silu i vrijeme moguće je prilagoditi po potrebi.

— Nakon centrifugiranja provjeriti jesu li supernatanti pravilno separisani (površina: lipidi, sredina: supernatant, donji sloj: tkivo jetre). U slučaju nepravilne separacije suspenziju ponovno centrifugirati u istim uslovima.

— Iz rashlađene centrifuge izvaditi sve uzorke i poređati ih prema broju uzorka na stalku s ledom. Paziti da nakon centrifugiranja ne dođe do ponovne suspenzije separisanih slojeva.

4) Vađenje supernatanta

— U stalak za epruvete staviti četiri mikroepruvete od 0,5 ml za čuvanje supernatanta.

— Mikropipetom izvadii 30 µl svakog supernatanta (separiranog kao srednji sloj) i staviti u jednu mikroepruvetu od 0,5 ml. Paziti da ne zahvatimo lipid na površini ili tkivo jetre iz donjeg sloja.

— Izvaditi supernatant i staviti ga u druge dvije mikroepruvete od 0,5 ml na prethodno opisani način.

— Mikropipetom izvaditi ostatak supernatanta (po mogućnosti: ≥ 100 µl). Zatim ga staviti u preostalu mikroepruvetu od 0,5 ml. Paziti da ne zahvatimo lipid na površini ili tkivo jetre iz donjeg sloja.

— Zatvoriti poklopac mikroepruvete od 0,5 ml i na naljepnicu zapišite volumen supernatanta. Mikroepruvete zatim odmah ohladiti na stalku s ledom.

— Zamijeniti vrh mikropipete novim za svaki supernatant. Ako se na vrhu nakupi velika količina lipida, odmah ga promijeniti kako ne bi došlo do kontaminacije ekstrakta jetre mašću.

— Staviti sav centrifugirani supernatant u četiri mikroepruvete od 0,5 ml prema prethodno opisanom postupku.

— Sve mikroepruvete od 0,5 ml u kojima se nalazi supernatant staviti u stalak za epruvete s identifikacijskim oznakama i zatim ih odmah zamrznuti u zamrzivaču. U slučaju mjerenja koncentracija VTG-a neposredno nakon preliminarnog tretiranja ostaviti jednu mikroepruvetu od 0,5 ml (u kojoj se nalazi 30 µl supernatanta) da se hladi u stalku za epruvete i odneti je do radne ćelije gdje se sprovodi test ELISA. U tom slučaju stavite preostale mikroepruvete u stalke za epruvete i zamrznite ih u zamrzivaču.

— Nakon vađenja supernatanta ostatke zbrinuti u skladu sa propisima kojima se uređuje otpad.

Čuvanje uzorka

Mikroepruvete od 0,5 ml u kojima se nalazi supernatant homogenata jetre čuvati na ≤ –70 °C do upotrebe za test ELISA.

<u>Postupak 3.A:</u> Zebrica, uzimanje krvi iz repne vene/arterije

Neposredno nakon anestezije korijen repa poprečno se zarezuje i uzima se krv iz repne arterije/vene pomoću heparinizovane mikrohematokritske kapilarne cjevčice. Volumen krvi kreće se od pet do 15 mikrolitara i zavisi od veličini ribe. Jednaki volumen pufera aprotinina (6 mikrograma/ml u fiziološkoj rastvoru s fosfatnim

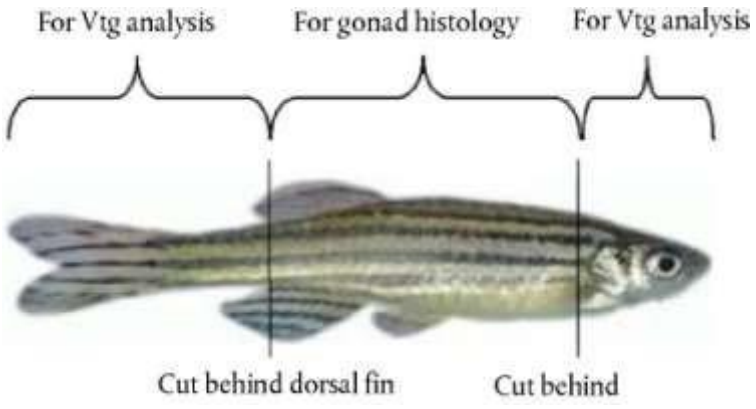
puferom) dodaje se u mikrokapilarnu cjevčicu, a plazma se centrifugiranjem odvaja od krvi (pet minuta pri 600 *g*). Plazma se stavlja u ispitne epruvete i čuva na – 20 °C do analize VTG-a ili ostalih proteina koji mogu biti od interesa.

Postupak 3.B: Zebrica, uzimanje krvi punkcijom srca

Kako bi se izbjeglo zgrušavanje krvi i propadanje proteina, uzorci se uzimaju u fiziološkom rastvoru s fosfatnim puferom koja sadrži heparin (1 000 jedinica/ml) i aprotinin (inhibitor proteaze) (2 TIU/ml). Kao sastojci za pufer preporučuju se heparin, amonijumova so i liofilizirani aprotinin. Za uzimanje uzorka krvi preporučuje se špric (1 ml) s fiksnom tankom iglom (na primjer Braun Omnican-F). Špric je potrebno prethodno napuniti puferom (približno 100 mikrolitara) kako bi se iz svake ribe u potpunosti eluirale male količine krvi. Uzorci krvi uzimaju se punkcijom srca. Ribi je prvo potrebno dati anestetik MS-222 (100 mg/l). Pri odgovarajućem stupnju anestezije korisnik može vidjeti otkucaje srca zebrice. Pri punkciji srca klip šprica treba biti blago napet. Izvađene količine krvi kreću se od 20 do 40 mikrolitara. Nakon punkcije srca smješu krvi i pufera potrebno je staviti u ispitnu epruvetu. Plazma se odvaja od krvi centrifugiranjem (20 minuta; 5 000 *g*) i do analize čuva na – 80 °C.

Postupak 3.C: SOP: Zebrica, homogenizacija glave i repa

1. Ribe se anesteziraju i usmrćuju u skladu s opisom ispitivanja.
2. Glava i rep režu se u skladu sa slikom 1. Sve instrumente za seciranje i podlogu za rezanje potrebno je pravilno isprati i očistiti (na primjer 96-postotnim etanolom) između rukovanja svakom ribom kako bi se spriječilo da ženke ili indukujeni mužjaci kontaminiraju neindukovane mužjake vitelogeninom.



Slika 1.

3. Težina odrezane glave i repa svake ribe mjeri se do najbližeg miligrama.
4. Dijelovi se nakon vaganja stavljaju u odgovarajuće epruvete (na primjer Eppendorfove epruvete od 1,5 ml) i zamrzavaju na – 80 °C do homogenizacije ili direktno homogenizuju na ledu pomoću dva plastična tučka. (Ostale se metode mogu primjenjivati ako se sprovode na ledu, a rezultat je homogena smješa). Epruvete je potrebno pravilno označiti brojevima kako bi se glava i rep mogli povezati s pripadajućim tijelom koje se upotrebljava za histološku pretragu gonade.
5. Kad se dobije homogena smješa, dodaje se (težinski) četiri puta toliko ledeno hladnog pufera za homogenizaciju. Nastaviti raditi s tučcima dok smješa ne postane homogena. Za svaku se ribu upotrebljavaju novi tučci.
6. Uzorci se stavljaju na led do centrifugiranja na 4 °C pri 50 000 *g* 30 minuta.

7. Pipetom staviti 20 µl supernatanta u najmanje dvije epruvete tako da je vrh pipete umočenn ispod površinskog sloja masti i pažljivo usišen supernatant bez masti ili dijelova taloga.

8. Epruvete se do upotrebe čuvaju na – 80 °C.

Dodatak 7.

UZORCI S POJAČANOM NIVOOM VITELOGENINA I REFERENTNI STANDARD MEĐU TESTOVIMA

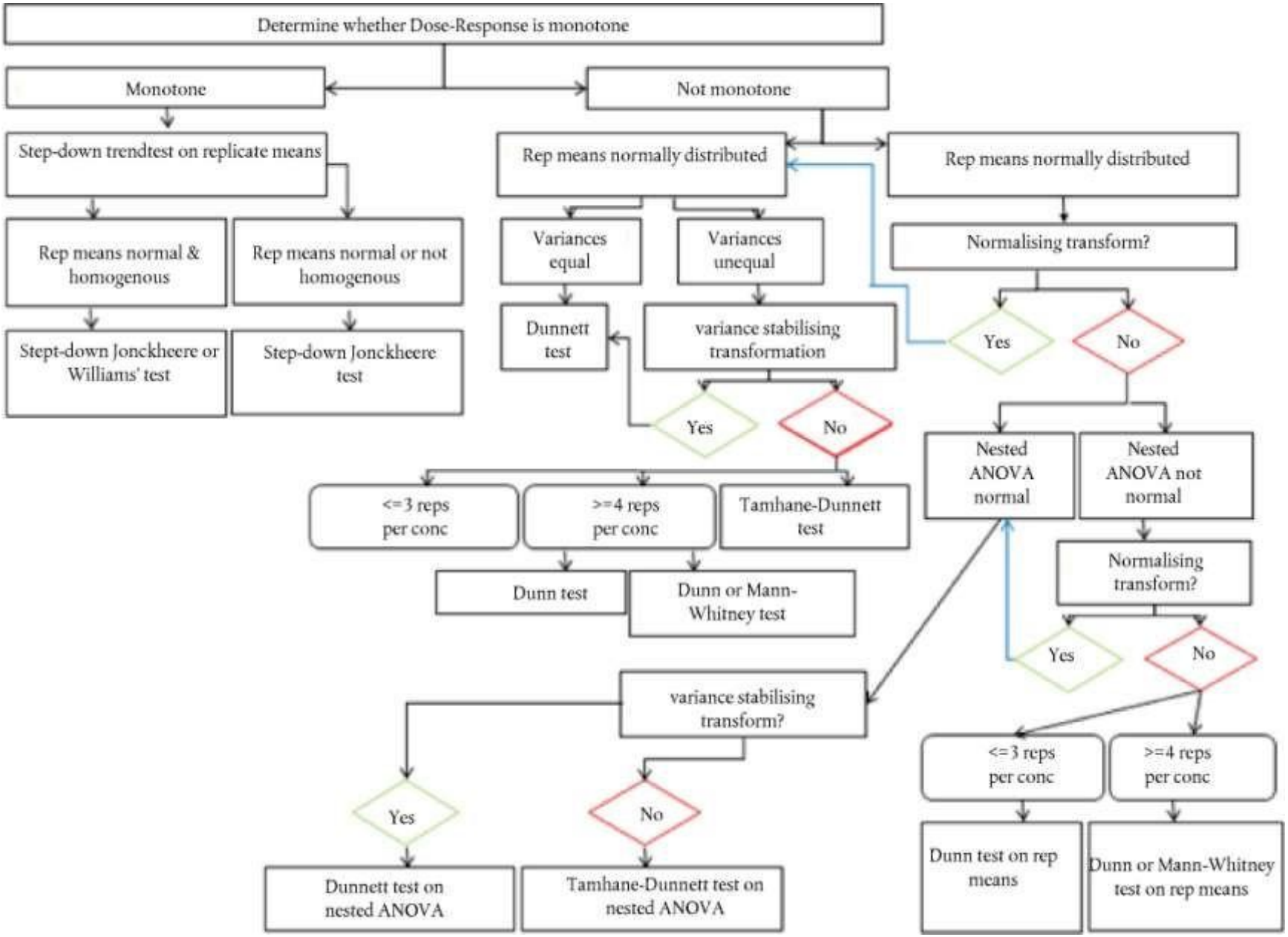
Svakog dana sprovoĐenja testova VTG-a analiziraju se uzorci sa pojačanim nivoom izraĐeni pomoću referentnog standarda meĐu testovima. VTG za izradu referentnog standarda meĐu testovima iz različite šarže od one za izradu standarda kalibracije za sprovoĐenje testa.

Uzorak s pojačanom nivoom izraĐuje se dodavanjem poznate količine standarda meĐu testovima uzorku plazme kontrolnih mužjaka. Uzorak se pojačava radi postizanja koncentracije VTG-a koja je od 10 do 100 puta veća od očekivane koncentracije vitelogenina u kontrolnih mužjaka riba. Uzorak plazme kontrolnih mužjaka koji se pojačava može poticati od jedne ribe ili nekoliko riba.

Poduzorak nepojačane plazme kontrolnih mužjaka analiziraju se u najmanje dva dvostruka bunarića. I pojačani uzorak analizira se u najmanje dva dvostruka bunarića. Srednja količina vitelogenina iz dva nepojačana uzorka plazme kontrolnih mužjaka dodaje se izračunanoj količini VTG-a koja je dodata uzorcima s pojačanom nivoom; na taj se način određuje očekivana koncentracija. Odnos te očekivane i izmjerene koncentracije bilježi se uz rezultate svakog kompleta testova ssprovedenog tog dana.

Dodatak 8.

GRAFIKON ODLUKE ZA STATISTIČKU ANALIZU


Determine whether Dose-Response is monotone
Monotone
Not monotone
Step-down trendtest on replicate means
Rep means normal & homogenous
Rep means normal or not homogenous
Stept-down Jonckheere or Williams' test
Step-down Jonckheere test
Rep means normally distributed
Variances equal
Variances unequal
Dunnett test
variance stabilising transformation
Yes
No
<=3 reps per conc
>=4 reps per conc
Tamhane-Dunnett test
Dunn test
Dunn or Mann-Whitney test
Rep means normally distributed
Normalising transform?
Yes
No
Nested ANOVA normal
Nested ANOVA not normal
Normalising transform?
Yes
No
variance stabilising transform?
Yes
No
Dunnett test on nested ANOVA
Tamhane-Dunnett test on nested ANOVA
<=3 reps per conc
>=4 reps per conc
Dunn test on rep means
Dunn or Mann-Whitney test on rep means

1. Uvod

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 236 (2013.). Njome se opisuje ispitivanje akutne toksičnosti na embrionima zebrica (*Danio rerio*). Ispitivanje je namijenjeno za određivanje akutne toksičnosti hemikalija na ribama u embrionalnom stadijumu. Ono se bazira na studijama i provjerama sprovedenima na zebricama. Uspješno se primjenjuje na niz hemikalija različitih načina djelovanja te različite rastvorljivosti, isparivosti i hidrofobnosti.

Definicije koje se upotrebljavaju u ovoj ispitnoj metodi navedene su u Dodatku 1.

1.1 Načelo ispitivanja

Netom oploĐena jajašca zebrica izlažu se ispitivanoj hemikaliji 96 sati. Svaka 24 sata bilježe se do četiri apikalna zapažanja kao indikatori smrtonosnog djelovanja: i. koagulacija oploĐenih jajašaca, ii. izostanak formiranja somita, iii. neodvajanje korijena repa od zumančane kesice i iv. izostanak otkucaja srca. Na kraju perioda izlaganja utvrĐuje se akutna toksičnost na osnovu pozitivnog ishoda bilo kojega od četiri apikalna zapažanja i izračunava se LC_{50} (srednja smrtonosna koncentracija).

1.2 Početna razmatranja

Korisne informacije o specifičnim svojstvima supstanci uključuju strukturnu formulu, molekularnu masu, čistoću, stabilnost u vodi i na svjetlosti, pK_a i K_{ow}, rastvorljivost u vodi, napon pare i rezultate ispitivanja lake biorazgradivosti (ispitna metoda C.4. (17.) ili ispitna metoda C.29. Rastvorljivost i napon pare mogu se upotrijebiti za izračunavanje konstante Henryjeva zakona, na osnovu koje se može zaključiti mogu li se očekivati gubitci zbog isparavanja ispitivane hemikalije. Potrebna je pouzdana analitička metoda za kvantifikaciju supstanci u ispitnim rastvorom s utvrĐenom i dokumentovanom tačnošću i granicom otkrivanja.

Ako se ispitna metoda primjenjuje za ispitivanje smješe, potrebno je što više informacija o

sastavu smješe, npr. o hemijskom identitetu njenih sastojaka, njihovoj količinskoj zastupljenosti i specifičnim svojstvima. Prije primjene ispitne metode za regulatorno ispitivanje smješe trebalo bi razmotriti hoće li se njome dobiti prihvatljivi rezultati za predviĐenu regulatornu svrhu.

Kad je riječ o supstancima koje se mogu aktivirati u metabolizmu, postoje dokazi da embrioni zebrica imaju sposobnost biotransformacije. Međutim, metaboličke sposobnosti riba u embrionalnom stadijumu ne odgovaraju uvijek onima mladih ili odraslih riba. Na primjer, u ispitivanju akutne toksičnosti na ribljim embrionima za protoksičnu supstancu alil-alkohol nije utvrĐeno da je toksična. Stoga se, ako postoje ikakve naznake da bi metaboliti ili drugi značajni produkti transformacije mogli biti toksičniji od matičnog sastojka, preporučuje ssprovesti ispitivanje i s tim metabolitima / produktima transformacije te uključiti i te rezultate pri zaključivanju o toksičnosti ispitivane hemikalije, ili ssprovesti još jedno ispitivanje u kojem se pomnije razmatra metabolizam.

Za supstance molekularne mase ≥ 3 kDa, supstance vrlo krupne molekularne strukture i supstance koje uzrokuju odgoĐeno izlijeganje, čime bi se moglo onemogućiti ili smanjiti izlaganje nakon izlijeganja, zbog ograničene biorapoloživosti tih supstanci očekuje se neosjetljivost embrijona, pa bi druga ispitivanja toksičnosti mogla biti prikladnija.

1.3 Valjanost ispitivanja

Za valjanost rezultata ispitivanja primjenjuju se sljedeći kriterijumi:

1) od prikupljenih jajašaca u ispitnoj šarži trebalo bi biti oploĐeno ≥ 70 %;

2) temperatura vode u ispitnim komorama trebala bi se održavati na 26 ± 1 °C tokom cijelog ispitivanja;
3) u negativnoj kontroli (s vodom za razrjeđivanje) te, prema potrebi, u kontroli s rastvaračem trebalo bi preživjeti ukupno ≥ 90 % embrija u 96 sati izlaganja;
4) izlaganje pozitivnoj kontroli (npr. 4,0 mg/l 3,4-dihloroanilina za zebrice) trebalo bi rezultirati smrtnošću od najmanje 30 % nakon 96 sati izlaganja;
5) stopa izlijeganja u negativnoj kontroli (i, prema potrebi, kontroli s rastvaračem) trebala bi biti ≥ 80 % nakon 96 sati izlaganja;
6) nakon 96 sati izlaganja koncentracija rastvorenog kiseonika u negativnoj kontroli i najviša ispitna koncentracija trebale bi biti zasićenosti ≥ 80 %.

2. Ois metode

U Dodatku 2. je pregled preporučenih uslova držanja i ispitivanja.

Oprema

Potrebna je sljedeća oprema:

1) akvarijum od hemijski inertnog materijala (npr. stakla) i odgovarajuće veličine s obzirom na preporučenu količinu punjenja (vidjeti „Držanje uzgojnih riba”);
2) invertni mikroskop i/ili binokularni mikroskop s povećanjem od barem 80 puta. Ako se temperatura prostorije u kojoj se bilježe zapažanja ne može prilagoditi na 26 ± 1 °C, treba upotrijebiti pokretni stolić mikroskopa s kontrolom temperature ili druge metode za održavanje potrebne temperature;
3) ispitne komore; npr. standardne ploče s 24 bunarića dubine oko 20 mm (vidjeti „Ispitne komore”);
4) sredstvo kao što je samoljepljiva folija za pokrivanje ploča s 24 bunarića;
5) inkubator ili prostorija s kontrolisanom temperaturom kako bi se u bunarićima (ili u ispitnim komorama) mogla održati temperatura od 26 ± 1 °C;
6) mjerač pH-vrijednosti;
7) mjerač kiseonika;
8) oprema za određivanje tvrdoće vode i rastvorljivost;
9) ladica za mrijest: tanjirići od stakla, nerĐajućeg čelika ili nekog drugog inertnog materijala; žičana mrežica (veličine oka 2 ± 0,5 mm) od nerĐajućeg čelika ili drugog inertnog materijala za zaštitu položenih jajašaca; supstrat za mriješćenje (npr. dodate biljke od inertnog materijala) (ispitna metoda C.48., Dodatak 4.a);
10) pipete s proširenim otvorima za sakupljanje jajašaca;
11) staklene posude za pripremu različitih ispitnih koncentracija i vode za razrjeđivanje (čaše, graduirane balončići, graduisani cilindri i graduisane pipete) ili za prikupljanje jajašaca zebrica (npr. laboratorijaske čaše, zdjelice za kristalizaciju);
12) ako se u ispitivanju primjenjuju alternativni sistemi izlaganja, kao što su protačno ispitivanje ili pasivno doziranje potrebni su odgovarajući prostori i oprema. **Ispitne komore** Trebalo bi upotrebljavati staklene ili polistirenske ispitne komore (npr. ploče s 24 bunarića, od kojih svaki ima kapacitet punjenja 2,5 – 5 ml). Ako se sumnja na adsorpciju na polistiren (npr. za nepolarne, planarne supstanci s visokim K_{OW}), trebalo bi upotrijebiti inertne materijale (staklo) kako bi se smanjili gubici zbog adsorpcije. Ispitne komore trebale bi biti nasumično rasporeĐene u inkubatoru.

Voda i ispitni uslovi

Preporučuje se da se voda za držanje razrijedi tako da se postignu nivoa tvrdoće koje su tipične za niz različitih površinskih voda. Vodu za razrjeđivanje treba pripremiti od rekonstituirane vode. Dobijeni stepen tvrdoće trebao bi biti jednak 100 – 300 mg/l $CaCO_3$ kako bi se spriječilo prekodnosno taloženje kalcijum karbonata. Mogu se upotrebljavati i

druge površinske vode i izvorske vode dobro poznatih svojstava. Rekonstituisana voda može se prilagoditi vodi za držanje male tvrdoće razrjeđivanjem dejonizovanom vodom u odnosu 1: 5 do minimalne tvrdoće od 30 – 35 mg/l $CaCO_3$. Voda se prozračuje do zasićenja kiseonikom prije dodavanja ispitivane hemikalije. Temperaturu u bunarićima održavati na 26 ± 1 °C tokom cijelog ispitivanja. pHvrijednost između 6,5 i 8,5 te tokom ispitivanja ne bi smjela varirati unutar tog raspona za više od 1,5 jedinica. Ako se očekuje da pH-vrijednost neće ostati unutar tog raspona, trebalo bi je podesiti prije početka ispitivanja. Podešavanje pH trebalo bi izvesti tako da ne doĐe do znatne promjene koncentracije matične rastvora i da se ne izazove hemijska reakcija ili taloženje ispitivane hemikalije. Za podešavanje pH u rastvor koje sadrže ispitivanu hemikaliju preporučuje se upotrijebiti hlorovodonik (HCl) i natrijum hidroksid (NaOH). **Ispitni rastvora**

Ispitni rastvori u određenim koncentracijama mogu se pripremiti npr. razrjeđivanjem matičnog rastvora. Matični rastvor pripremiti jednostavnim miješanjem ili mućkanjem ispitivane hemikalije u vodi za razrjeđivanje mehaničkim sredstvima (npr. miješanjem i/ili tretiranjem ultrazvukom). Ako se ispitivana hemikalija teško rastvara u vodi, trebalo bi primijeniti postupke opisane u OECD-ovim Smjernicama br. 23 za postepene s analitički zahtjevnim supstancima i smješama. Izbjegavati upotrebu rastvarača, iako će ona u nekim slučajevima možda biti potrebna kako bi se dobio matični rastvor odgovarajuće koncentracije. Ako se u pripremi matičnog rastvora upotrebljava rastvarač, njegova konačna koncentracija ne bi smjela biti viša od 100 µl/l i trebala bi biti jednaka u svim ispitnim posudama. Ako se upotrebljava rastvarač, potrebna je dodatna kontrola s rastvaračem.

Držanje uzgojnih riba

Za proizvodnju jajašaca uzimaju se uzgojne neizlagane zebrice divljeg tipa s dobro dokumentovanom stopom oplodnje jajašaca. Ribe ne bi smjele imati makroskopski vidljive simptome infekcije ili bolesti niti biti podvrgnute ikakvom farmaceutskom tretmanu (akutnom ili profilaktičkom) tokom dva mjeseca prije mriješćenja. Uzgojne ribe drže se u akvarijumu s preporučenim kapacitetom punjenja od 1 l vode po ribi i fiksnim fotoperiodom od 12 – 16 sati. Optimalnu jačinu filtriranja trebalo bi podesiti; prejako filtriranje koje uzrokuje veliko strujanje vode trebalo bi izbjegavati. Za hranjenje vidjeti Dodatak 2. Suvišno hranjenje treba izbjegavati, a kvalitet vode i čistoću akvarijuma potrebno je redovno nadzirati i prema potrebi vraćati na početno stanje. **Ispitivanje osposobljenosti**

Kao referentnu hemikaliju trebalo bi ispitati, po mogućnosti dva puta godišnje, 3,4-dihloroanilin u punom rasponu koncentracija-odgovora kako bi se provjerila osjetljivost soja ribe koji se upotrebljava. Svaka laboratorijaa koja tek počinje primjenjivati ovo ispitivanje trebao bi upotrijebiti referentnu hemikaliju. Laboratorijae mogu upotrijebiti tu hemikaliju da dokažu svoju tehničku osposobljenost za sprovoĐenje ispitivanja prije dostavljanja podataka u regulatorne svrhe. **Dobijanje jajašaca**

Jajašca zebrica mogu se dobiti iz grupa za mriješćenje (u posebnim akvarijumima za mriješćenje) ili masovnim mriješćenjem (u akvarijumima za držanje). U slučaju grupa za mriješćenje mužjaci i ženke (npr. u odnosu 2: 1) uzgojne grupe stavljaju se u akvarijume za mriješćenje nekoliko sati prije mraka na dan prije ispitivanja. Budući da u grupama za mriješćenje zebrica mriješćenje povremeno može izostati, preporučuje se paralelno upotrebljavati najmanje tri akvarijuma za mriješćenje. Kako bi se izbjegla genetička pristranost, jajašca se sakupljaju iz najmanje tri uzgojne grupe, miješaju i nasumično izboraju.

Za sakupljanje jajašaca, ladice za mrijest stavljaju se u akvarijume za mriješćenje ili akvarijume za držanje prije mraka na dan prije ispitivanja ili prije svitanja na dan ispitivanja. Kako bi se spriječilo da odrasle zebrice pojedu jajašca, ladice za mrijest pokrivaju se inertnom žičanom mrežicom odgovarajuće veličine oka (otprilike 2 ± 0,5 mm). Ako se to

smatra potrebnim, na mrežicu se mogu pričvrstiti dodatne biljke od inertnog materijala (npr. plastika ili staklo) kao podražaj za mriješćenje. Trebalo bi upotrebljavati iskprobane plastične materijale koji ne otpuštaju svoje sastojke u vodu (npr. ftalati). Parenje, mriješćenje i oplodnja odvijaju se u 30 minuta nakon svitanja i ladice za mrijest s prikupljenim jajašcima mogu se pažljivo izvaditi. Nakon sakupljanja jajašaca iz ladica za mrijest preporučuje se ispranje rekonstituiranom vodom.

Razlikovanje jajašaca

Na 26 °C nakon otprilike 15 minuta dolazi do prvog brazdanja oploĐenih jajašaca, a daljnem istovremenim brazdanjima nastaju 4, 8, 16 i 32 ćelije – blastomere (vidjeti Dodatak 3.). U tim fazama oploĐena jajašca mogu se lako prepoznati po razvoju blastule.

2.1 Postupak

Uslovi izlaganja

Dvadeset embrijoa po koncentraciji (jedan embrijon po bunariću) izlaže se ispitivanoj hemikaliji. Izlaganje bi trebalo biti takvo da se ± 20 % nazivne koncentracije hemikalije zadrži tokom cijelog ispitivanja. Ako to nije moguće u statičkom sistemu, trebalo bi primijeniti periode obnavljanja za polustatičko ispitivanje (npr. obnavljanje svaka 24 sata). U tom se slučaju koncentracije izlaganja treba provjeriti barem u najvišoj i najnižoj ispitnoj koncentraciji na početku i na kraju svakog perioda izlaganja. Ako se koncentracija izlaganja od ± 20 % nazivne koncentracije ne može održati, sve koncentracije treba mjeriti na početku i na kraju svakog perioda izlaganja. Pri obnavljanju ispitnog rastvora treba paziti da embrioni ostanu prekriveni malom količinom starog ispitnog rastvora kako bi se izbjeglo njihovo sušenje. Plan ispitivanja može se prilagoditi kako bi se ispunili zahtjevi za ispitivanje određenih supstanci (npr. protačno ili pasivno doziranje za lako razgradive ili jako adsorptivne supstance, ili drugo za isparive supstance). U svakom slučaju treba paziti da stres za embrione bude što manji. Ispitne komore trebalo bi kondicionirati s ispitnim rastvorom najmanje 24 sata prije početka ispitivanja. Ispitni uslovi sažeto su opisani u Dodatku 2. **Ispitne koncentracije**

Obično je potrebno pet koncentracija ispitivane hemikalije koje se razlikuju za stalni faktor od najviše 2,2 da se zadovolje statistički zahtjevi. Ako se upotrebljava manje od pet koncentracija, treba dati obrazloženje. Najviša ispitna koncentracija izazva smrtnost od 100 %, a najniža ispitna koncentracija ne bi trebala imati vidljive efekte. Ispitivanjem za utvrđivanje raspona prije glavnog ispitivanja omogućava se izbor odgovarajućeg raspona koncentracija. Ispitivanje za utvrđivanje raspona obično se sprovodi s deset embrijona po koncentraciji. Sljedeće uputstva odnose se na ispitivanje s pločama s 24 bunarića. Ako se upotrebljavaju drugačije ispitne komore (npr. male Petrijeve zdjelice) ili se ispituje više koncentracija, uputstva se moraju na odgovarajući način prilagoditi.

Pojedinosti i vizualne uputstva za raspodjelu koncentracija u pločama s 24 bunarića dostupne su niže i u Dodatku 4. slici 1. **Kontrole**

Kontrole s vodom za razrjeđivanje potrebne su i kao negativna kontrola i kao kontrola unutar ploče. Ako se primijenjuje više od jednog mrtvog embrijona u kontroli unutar ploče, ploča se odbacuje, čime se smanjuje broj koncentracija za izračunavanje LC_{50}. Ako se cijela ploča odbaci, može biti teže procijeniti i razlikovati vidljivi efekti, posebno ako je odbačena ploča kontrola s rastvaračem ili ploča s tretiranim embrionima. U prvom slučaju ispitivanje se mora ponoviti. U drugom slučaju gubitak cijele tretirane grupe / tretiranih grupa zbog smrtnosti u unutrašnjoj kontroli može za posljedicu imati smanjivanje mogućnosti procjene efekata i određivanja vrijednosti LC_{50}.

Za svaku šaržu jajašaca koja se upotrebljava za ispitivanje sprovodi se pozitivna kontrola s fiksnom koncentracijom od 4 mg/l 3,4-dihloroanilina.

Ako se upotrebljava rastvarač, dodatna grupa od 20 embrijona izlaže se rastvaraču u posebnoj ploči s 24 bunarića te tako služi kao kontrola s rastvaračem. Kako bi se ispitivanje smatralo prihvatljivim, trebalo bi dokazati da rastvarač nema značajne efekte na vrijeme potrebno za izlijeganje ni na preživljavanje niti ima bilo kakve druge štetne efekte na embrione.

Početak izlaganja i trajanje ispitivanja

Ispitivanje treba započeti što je prije moguće nakon oplodnje jajašaca i završiti nakon 96 sati izlaganja. Embrioni bi trebali biti uronjeni u ispitni rastvor prije nego što započne brazdanje blastodiska ili, najkasnije, do faze sa 16 ćelija. Kako bi se započelo s izlaganjem što je prije moguće, najmanje dvostruki broj jajašaca potreban po grupi predviĐenoj za tretiranje nasumično se izbore i prenosi u odgovarajuće koncentracije i kontrole (npr. u zdjelice za kristalizaciju od 100 ml; jajašca bi trebala biti potpuno prekrivena) najkasnije 90 minuta nakon oplodnje.

Iskoristiva oploĐena jajašca treba u roku od 180 minuta nakon oplodnje odvojiti od neoploĐenih i prenijeti u ploče s 24 bunarića koje su prethodno kondicionirane 24 sata i zatim ponovno napunjene s 2 ml svježe pripremljenog ispitnog rastvora po bunariću. Pomoću stereomikroskopa
(po mogućnosti povećanja ≥ 30 puta) odaberu se oploĐena jajašca koja se brazdaju i pritom ne pokazuju nepravilnosti (npr. asimetrija, nastanak vezikula) ili povrede koriona. Za sakupljanje i odvajanje jajašaca vidjeti Dodatak 3. slike 1. i 3. te Dodatak 4. sliku 2.

Raspodjela jajašaca u ploče s 24 bunarića

Jajašca se raspodjeljuju u ploče s bunarićima kako slijedi (vidjeti takođe Dodatak 4. sliku 1.):

1) 20 jajašaca u jednu ploču za svaku ispitnu koncentraciju,
2) 20 jajašaca u jednu ploču kao kontrola s rastvaračem (ako je potrebno),
3) 20 jajašaca u jednu ploču kao pozitivna kontrola,
4) 4 jajašca u svaku od navedenih ploča u vodu za razrjeđivanje kao kontrola unutar ploče,
5) 24 jajašca u jednu pločicu u vodu za razrjeđivanje kao negativna kontrola.

Zapažanja

Apikalna zapažanja koja se sprovode za svaki ispitni embrijon su sljedeća: koagulacija embrijona, izostanak formiranja somita, neodvajanje repa i izostanak otkucaja srca (tabela 1.). Na osnovu tih zapažanja utvrĐuje se smrtnost: svaki pozitivan ishod u jednom od tih zapažanja znači da je embrijon zebrice mrtav. Svakodnevno se bilježi izlijeganje u tretiranim i kontrolnim grupama, s početkom nakon 48 sati. Zapažanja se bilježe svaka 24 sata do kraja ispitivanja.

	Vrijeme izlaganja			
	24 sata	**48 sati**	**72 sata**	**96 sati**
Koagulacija embrija	+	+	+	+
Izostanak formiranja somita	+	+	+	+
Neodvajanje repa	+	+	+	+

Izostanak otkucaja srca		+	+	+	

Tabela 1.

Apikalna zapažanja akutne toksičnosti u embrija zebrica 24 sata – 96 sati nakon oplodnje.

Koagulacija embriona: Koagulirani su embrioni mliječno bijele boje, a pod mikroskopom izgledaju tamni (vidjeti Dodatak 5. sliku 1.). Broj koaguliranih embriona određuje se nakon 24, 48, 72 i 96 sati.

Izostanak formiranja somita: Pri temperaturi od 26 ± 1 °C nakon 24 sata u embrionu zebrice koji se normalno razvija formirano je 20-ak somita (vidjeti Dodatak 5. sliku 2.). U embrionu koji se normalno razvija uočljivi su spontani pokreti (s jedne na drugu stranu). Spontani pokreti ukazuju na formiranje somita. Nepostojanje somita bilježi se nakon 24, 48, 72 i 96 sati. Ako se somiti ne formiraju nakon 24 sata, to može biti znak opšteg zastoja u razvoju. Najkasnije nakon 48 sati somiti bi trebali biti razvijeni. U protivnom se zameci smatraju mrtvima.

Neodvajanje repa: kod embriona zebrice koji se normalno razvija odvajanje repa (vidjeti Dodatak 5. sliku 3.) od žumančane kesice primjećuje se nakon produženja zadnjeg dijela embrionalnog tijela. Neodvajanje repa bilježi se nakon 24, 48, 72 i 96 sati.

Izostanak otkucaja srca: Kod embriona zebrice koji se normalno razvija pri temperaturi od 26 ± 1 °C otkucaji srca primječuju se nakon 48 sati (vidjeti Dodatak 5. sliku 4.). Bilježenje ove krajnje tačke trebalo bi sprovoditi posebno pažljivo jer nepravilne otkucaje srca *ne* bi trebalo bilježiti kao smrtonosne. Vidljivi otkucaji srca bez cirkulacije u trbušnoj aorti (*aorta abdominalis*) ne smatraju se smrtonosnima. Pri bilježenju ove krajnje tačke embrione u kojih nisu vidljivi otkucaji srca trebalo bi posmatrati pod povećanjem od najmanje 80 puta najmanje jednu minutu. Izostanak otkucaja srca bilježi se nakon 48, 72 i 96 sati.

Stope izlijeganja svih tretiranih i kontrolnih grupa trebalo bi bilježiti od 48 sati nadalje i uvrstiti u izvještaje. Iako se izlijeganje ne primjenjuje kao krajnja tačka za izračunavanje LC_{50}, njime se osigurava izloženost embriona bez potencijalne zaštitne funkcije koriona, što može pomoći u tumačenju podataka.

Dodaci 3. i 5. sadrže detaljan opis normalnogi primjere abnormalnog razvoja embrija zebrica.

Analitička mjerenja

Na početku i na kraju ispitivanja mjere se pH, ukupna tvrdoća i rastvorljivost u kontroli/kontrolama i u najvišoj koncentraciji ispitivane hemikalije. U polustatičkim sistemima s obnavljanjem trebalo bi izmjeriti pH prije i nakon obnavljanja vode. Koncentracija rastvorenog kiseonika mjeri se na kraju ispitivanja u negativnim kontrolama i u najvišoj ispitnoj koncentraciji s iskoristivim embrionima, gdje bi trebala biti u skladu s kriterijumima valjanosti ispitivanja. Ako postoji mogućnost da temperatura nije jednaka u svim pločama s 24 bunarića, ona se mjeri u tri nasumično odabrane posude. Temperaturu bi trebalo bilježiti po mogućnosti stalno za vrijeme ispitivanja, a barem jednom dnevno.

U statičkom sistemu koncentraciju ispitivane hemikalije trebalo bi mjeriti u najvišoj i najnižoj ispitnoj koncentraciji, u svim tretiranim grupama, na početku i na kraju ispitivanja. U polustatičkom ispitivanju (s obnavljanjem), ako se očekuje da će koncentracija ispitivane hemikalije ostati u granicama od ± 20 % nazivnih vrijednosti, barem se najviša i najniža ispitna koncentracija analiziraju odmah nakon pripreme i neposredno prije obnavljanja. U ispitivanju u kojem se predviĐa da koncentracija ispitivane hemikalije neće ostati u granicama od ± 20 % nazivne vrijednosti moraju se analizirati sve ispitne koncentracije odmah nakon pripreme i neposredno prije obnavljanja. U slučaju nedovoljne količine za analizu može biti korisno jedinjenjeiti ispitni rastvori ili upotrijebiti zamjenske komore koje su izraĐene od istog materijala te imaju isti odnos volumena i površine kao ploče s 24 bunarića. Preporučuje se da se rezultati baziraju na izmjerenim koncentracijama. Ako

koncentracije ne ostanu unutar 80 – 120 % nazivne koncentracije, koncentracije koje imaju određeni efekat trebalo bi izraziti u odnosu na geometrijsku sredinu izmjerenih koncentracija; za više pojedinosti vidjeti 5. poglavlje Smjernica OECD-a za ispitivanje toksičnosti analitički zahtjevnih supstanci i smješa za vodene organizme.

2.3 Ispitivanje granične koncentracije

Uz primjenu postupaka opisanih u ovoj ispitnoj metodi može se ssprovesti ispitivanje granične koncentracije pri koncentraciji od 100 mg/l ispitivane hemikalije ili pri granici rastvorljivosti te hemikalije u ispitnom medijumumu (tj. pri nižoj od te dvije koncentracije) kako bi se dokazalo da je srednja smrtonosna koncentracija (LC_{50}) viša od te koncentracije. Ispitivanje granične koncentracije trebalo bi ssprovesti s po 20 embriona u tretiranoj grupi, pozitivnoj kontroli i, prema potrebi, kontroli s rastvaračem, i 24 embriona u negativnoj kontroli. Ako je smrtnost pri ispitivanoj koncentraciji za 10 % veća od smrtnosti u negativnoj kontroli (ili kontroli s rastvaračem), trebalo bi ssprovesti cjelovikupnu studiju. Treba zabilježiti sve zamijećene efekte. Ako je smrtnost u negativnoj kontroli (ili kontroli s rastvaračem) veća od 10 %, ispitivanje nije valjano i treba ga ponoviti.

3. Podaci i izvještavanje Obrada rezultata

U ovom ispitivanju pojedinačni bunarići smatraju se nezavisnim ponovljenim uzorcima za statističku analizu. IzraĐuje se grafički prikaz postotka embriona za koje je nakon 48 i/ili 96 sati utvrĐen pozitivan ishod najmanje jednog apikalnog zapažanja u odnosu na ispitne koncentracije. Za izračunavanje nagiba krive, vrijednosti srednje smrtonosne koncentracije (LC_{50}) i granica pouzdanosti (95 %) trebalo bi primijeniti odgovarajuće statističke metode i proučiti Smjernice OECD-a o aktualnim pristupima u statističkoj analizi podataka o ekotoksičnosti.

Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju sadrži sljedeće podatke:

Ispitivana hemikalija:

supstanca s jednim sastojkom:

— fizički izgled, rastvorljivost u vodi i druga relevantna fizičko-hemijska svojstva,

— podaci za hemijsku identifikaciju supstanci, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, oznaka SMILES ili InChI, strukturna formula, čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je praktički izvodivo itd. (uključujući udio organskog ugljenika, prema potrebi), supstanca s više sastojaka, supstanca nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcioni proizvod ili biološki materijal (UVCB supstanca) ili smješa:

— opis (koliko je to moguće) hemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativni udio i relevantna fizičko-hemijska svojstva sastojaka.

Ispitni organizmi:

— naučni naziv, soj, porijeklo, metoda sakupljanja oploĐenih jajašaca i kasnije postepene. *Ispitni uslovi:*

— ispitni postupak (npr. polustatičko ispitivanje s obnavljanjem),

— fotoperiod,

— plan ispitivanja (npr. broj ispitnih komora, vrste kontrole),

— obilježja kvaliteta vode za držanje riba (npr. pH, tvrdoća, temperatura, rastvorljivost, rastvoreni kiseonik),

— koncentracija rastvorenog kiseonika, pH, ukupna tvrdoća, temperatura i rastvorljivost ispitnih rastvora na početku i nakon 96 sati,

— način pripreme matičnih rastvora i ispitnih rastvora i učestalost obnavljanja,

— obrazloženje za upotrebu rastvarača i obrazloženje za izbor rastvarača (ako nije voda), — nazivne ispitne koncentracije i rezultati svih analiza za određivanje koncentracije ispitivane hemikalije u ispitnim posudama; trebalo bi navesti i efikasnost izdvajanja ispitivane supstanci pri primjeni metode te granicu kvantifikacije (LoQ),

— dokaz da kontrole ispunjavaju opšte kriterijume valjanosti za preživljavanje,

— stopa oplodnje jajašaca,

— stopa izlijeganja u tretiranim i kontrolnim grupama.

Rezultati:

— najviša koncentracija koja ne izaziva smrtnost u periodu ispitivanja,

— najniža koncentracija koja izaziva 100 %-tnu smrtnost u periodu ispitivanja,

— ukupna smrtnost u svakoj koncentraciji u svakom preporučenom vremenu posmatranja,

— vrijednosti LC_{50} nakon 96 sati (i eventualno nakon 48 sati) za smrtnost s granicama pouzdanosti od 95 %, ako je to moguće,

— grafik krive za odnos koncentracija i smrtnosti na kraju ispitivanja,

— smrtnost u kontrolama (negativne kontrole, kontrole unutar ploče, pozitivne kontrole i sve upotrijebljene kontrole s rastvaračem),

— podaci o ishodima svakog od četiri apikalna zapažanja,

— pojava i opis morfoloških i fizioloških anomalija, ako ih ima (vidjeti primjere navedene u Dodatku 5. slici 2.),

— svi događaji tokom ispitivanja koji su možda uticali na rezultate,

— statistička analiza i obrada podataka (probit analiza, logistički regresioni model i geometrijska sredina za LC_{50}),

— nagib i granice pouzdanosti regresije (transformirane) krive koncentracija-odgovor.

Sva odstepena od ispitne metode i odgovarajuća objašnjenja.

Diskusija i tumačenje rezultata.

Dodatak 2.

DRŽANJE, UZGOJ I TIPIČNI USLOVI ZA ISPITIVANJA AKUTNE TOKSIČNOSTI NA EMBRIONIMA ZEBRICA

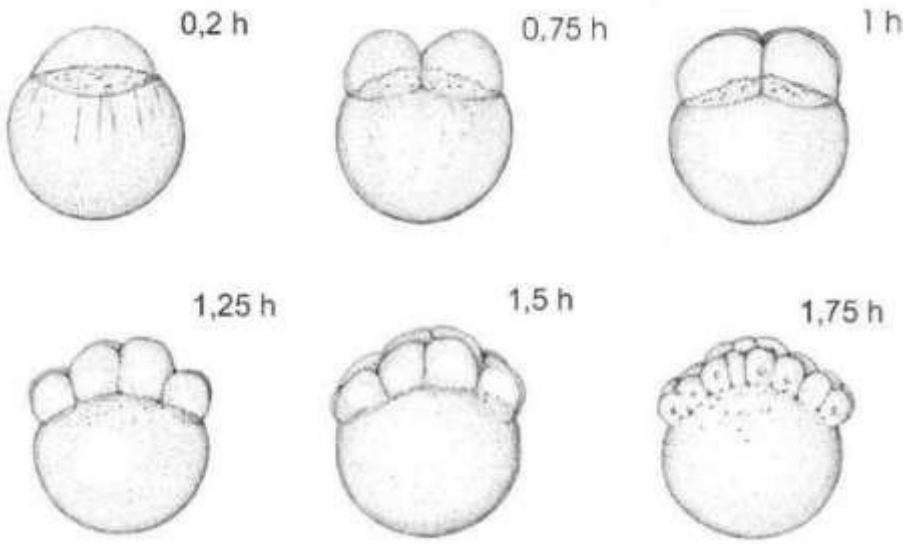
Zebrica (*Danio rerio*)	
Porijeklo vrste	Indija, Burma, Melaka, Sumatra
Polni dimorfizam	Ženke: izbočen trbuh kada nose jajašca

		Mužjaci: tanji, narančasta nijansa između plavih vodoravnih pruga (posebno očita na analnoj peraji)
Hranjenje		Suva hrana u listićima (najviše 3 % težine ribe po danu) 3 – 5 puta dnevno; usto larve (*nauplii*) račića *Artemia* i/ili male vodenbuhe odgovarajuće veličine dobijene iz nekontaminiranih izvora. Živom se hranom bogati sredina i stoga bi kad god je to moguće trebalo davati živu hranu. Kako bi se osigurao optimalni kvalitet vode, trebalo bi ukloniti višak hrane i izmet otprilike jedan sat nakon hranjenja.
Približna težina odraslih riba		Ženke: 0,65 ± 0,13 g Mužjaci: 0,5 ± 0,1 g
Držanje uzgojnih riba	Osvjetljenje	Fluorescentne sijalice (širokog spektra); 10 – 20 µE/m^2/s, 540 – 1 080 lux, ili 50 – 100 ft-c (nivoa u laboratorijaskim uslovima); fotoperiod 12 – 16 sati
	Temperatura vode	26 ± 1 °C
	Kvalitet vode	Zasićenost O_2 ≥ 80 %, tvrdoća: npr. ~30 – 300 mg/l $CaCO_3$, NO_3^-: ≤ 48 mg/l, NH_4^+ i NO_2^-: < 0,001 mg/l, rezidualni hlor < 10 µg/l, ukupni organski hlor < 25 ng/l, pH = 6,5 – 8,5
	Dodatni kriterijumi za kvalitet vode	Čestice < 20 mg/l, ukupni organski ugljenik < 2 mg/l, ukupni organofosforni pesticidi < 50 ng/l, ukupni organohlorni pesticidi plus polihlorovani bifenili < 50 ng/l
	Veličina akvarijuma za držanje	Npr. 180 l, 1 riba/l
	Prečišćavanje vode	Stalno (filtriranje ugljenikom); druge mogućnosti uključuju kombinacije s polustatičkim sistemom s obnavljanjem ili protačnim sistemom s neprekidnim obnavljanjem vode
	Preporučeni odnos mužjaka i ženki za razmnožavanje	2: 1 (ili masovno mriješćenje)
Akvarijumi za mriješćenje		Npr. akvarijumi od 4 l s dnom od čelične mreže i dodatnom biljkom kao podražajem za mriješćenje; poljašnji grijači, ili masovno mriješćenje u akvarijumima za držanje

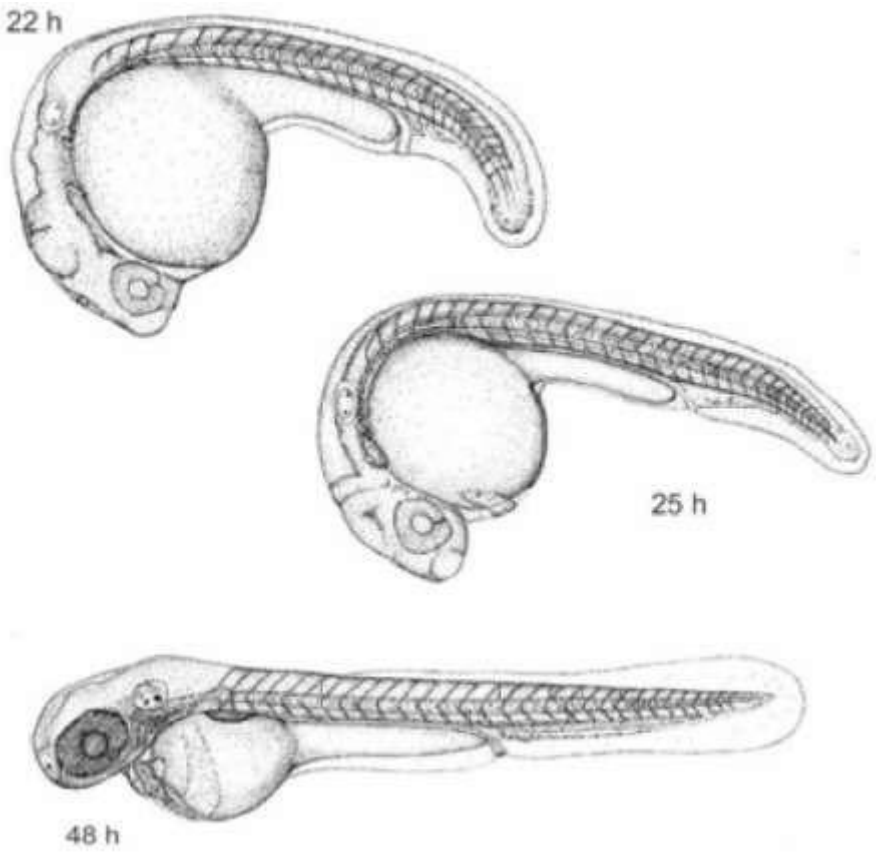
Struktura i izgled jajašaca	Stabilan korion (tj. vrlo proziran, neljepljiv, prečnika ~ 0,8 – 1,5 mm)
Stopa mriješćenja	Jedna zrela ženka mrijesti najmanje 50 – 80 jajašaca dnevno. Zavisi od soja, stopa mriješćenja može biti znatno viša. Stopa oplodnje trebala bi biti ≥ 70 %. Za
	ribe koje se prvi put mrijeste stopa oplodnje jajašaca može biti niža u prvih nekoliko mriješćenja.
Vrsta ispitivanja	Statičko, polustatičko s obnavljanjem, protačno, 26 ± 1 °C, ispitne komore kondicionirane 24 sata (npr. ploče s 24 bunarića po 2,5 – 5 ml)

Dodatak 3.

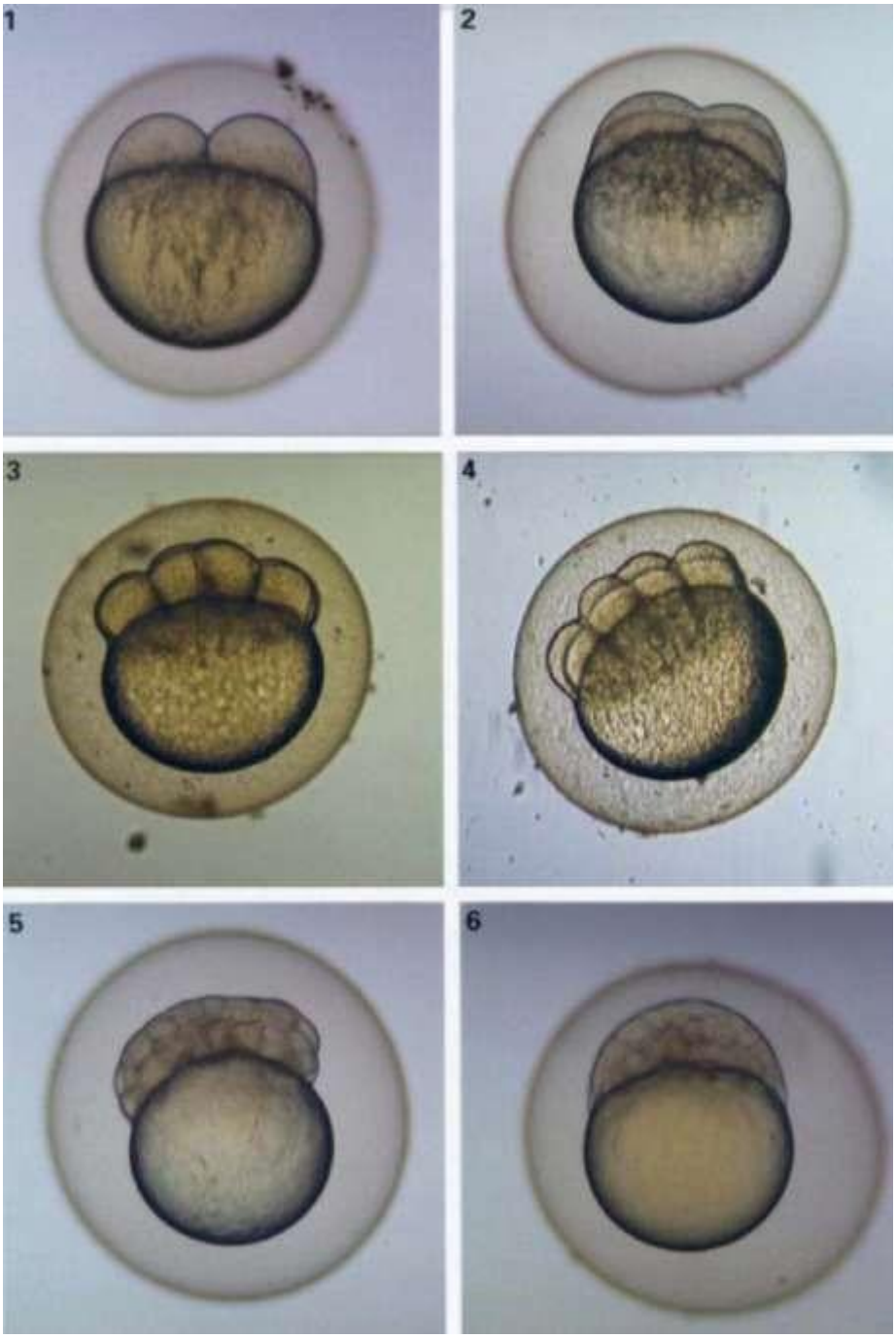
NORMALAN RAZVOJ ZEBRICE PRI TEMPERATURI OD 26 °C



Slika 1. Odabrane faze ranog razvoja zebrice (*Danio rerio*): 0,2 – 1,75 sati nakon oplodnje (iz: Kimmel *et al*. 1995 (35.)). Pomoću vremenskog slijeda normalnog razvoja mogu se dijagnostifikovati oplodnja i iskoristivost jajašaca.

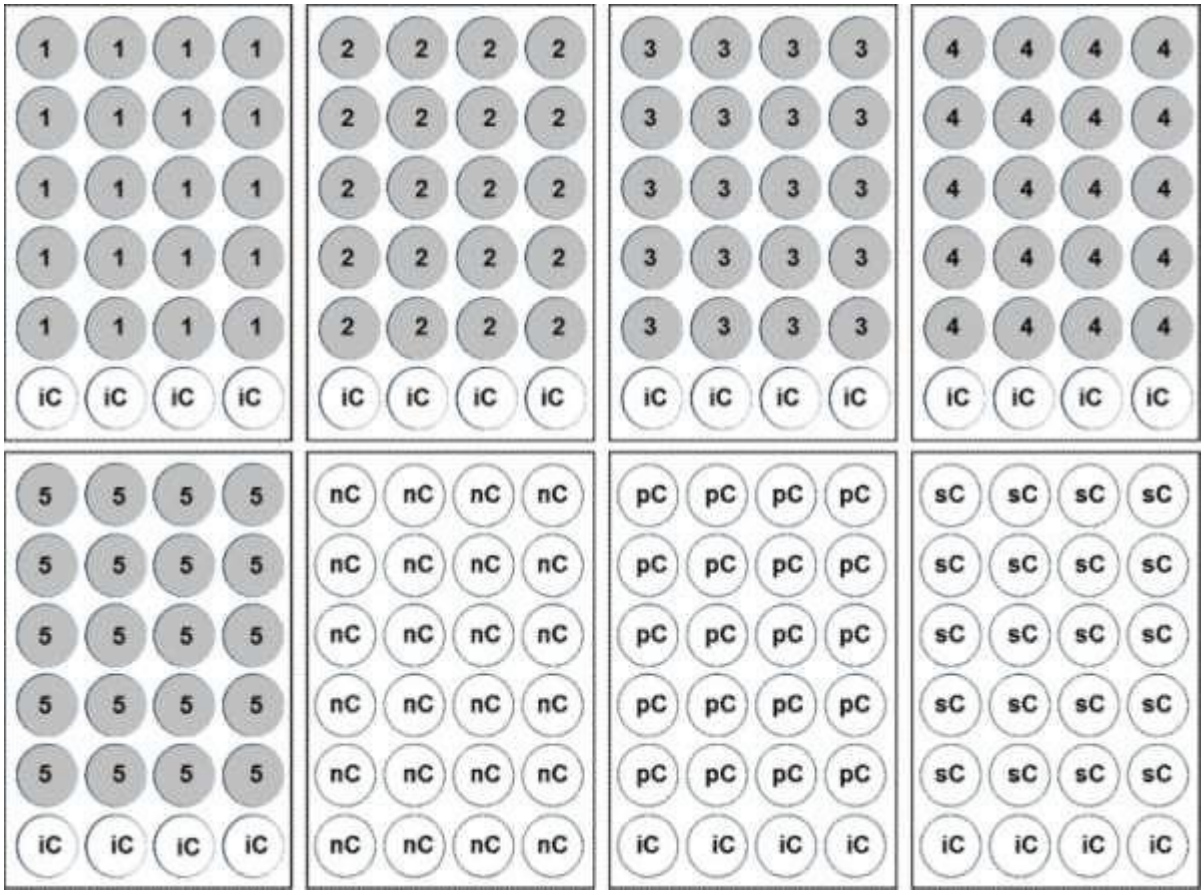


Slika 2. Odabrane faze kasnog razvoja zebrice (*Danio rerio*) (embrion bez koriona radi bolje vidljivosti): 22 sata – 48 sati nakon oplodnje



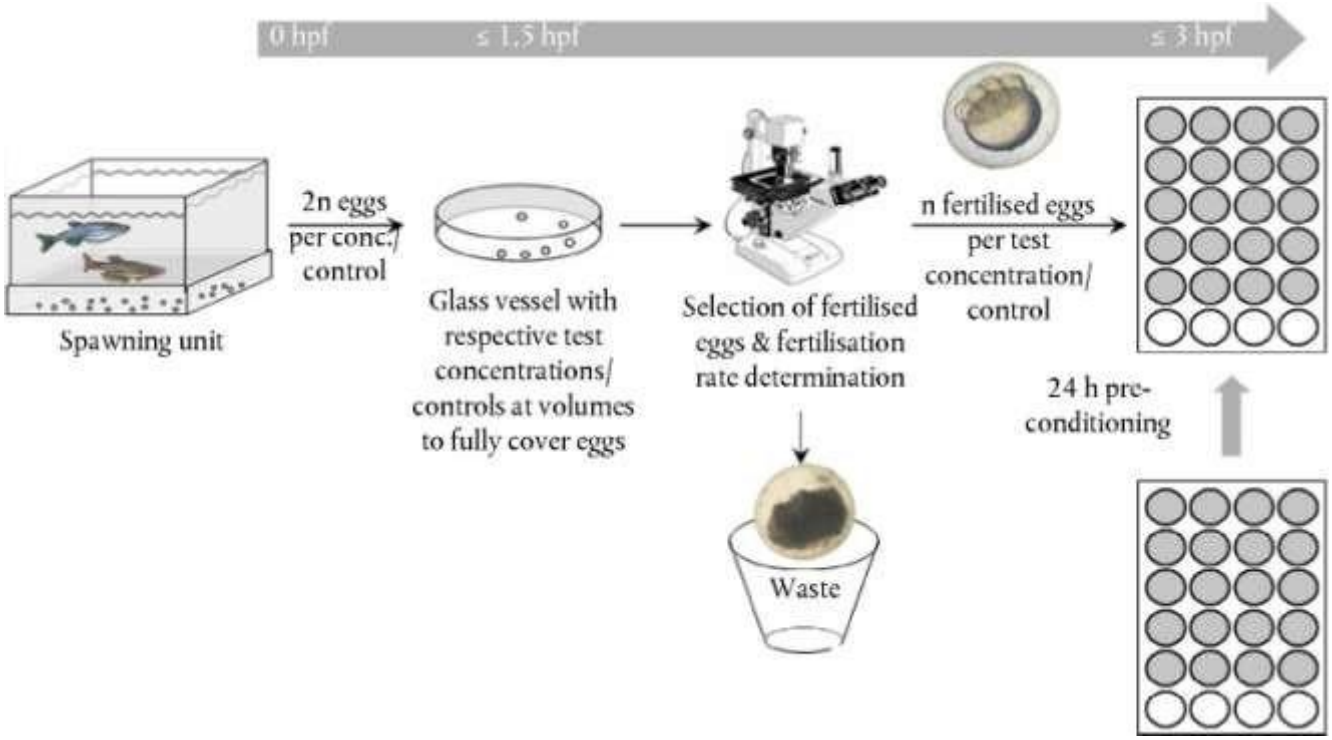
Slika 3. Normalan razvoj embriona zebrice (*Danio rerio*): (1) 0,75 sati, faza s 2 ćelije; (2) 1 sat, faza s 4 ćelije; (3) 1,2 sata, faza s 8 ćelija; (4) 1,5 sati, faza s 16 ćelija; (5) 4,7 sati, početak epibolije; (6) 5,3 sata, otprilike 50 % epibolije (iz: Braunbeck & Lammer 2006 (40.)). **Dodatak 4.**

Slika 1.Nacrt ploča s 24 bunarića



1 – 5 = pet ispitnih koncentracija po hemikaliji; nC = negativna kontrola (voda za razrjeđivanje); iC = kontrola unutar ploče (voda za razrjeđivanje); pC = pozitivna kontrola (3,4-dihloroanilin 4 mg/l); sC = kontrola s rastvaračem

Slika 2. Nacrt postupka ispitivanja akutne toksičnosti na embrionima zebrica (slijeva nadesno): proizvodnja jajašaca, sakupljanje jajašaca, prethodno izlaganje u staklenim posudama odmah nakon oplodnje, izbor oplođenih jajašaca pomoću invertnog mikroskopa i/ili binokularnog mikroskopa i raspodjela oplođenih jajašaca u pripremljene ploče s 24 bunarića s odgovarajućim ispitnim koncentracijama / kontrolama; n = broj jajašaca potrebnih po ispitnoj koncentraciji / kontroli (ovdje 20), hpf = sati nakon oplodnje.

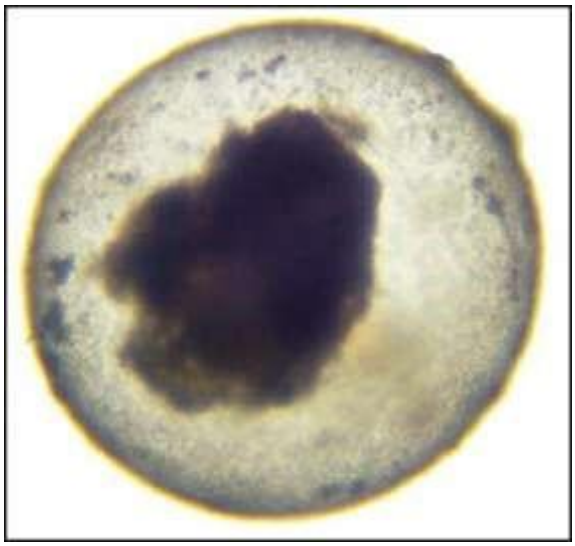


Dodatak 5.

PRIKAZ SMRTNIH KRAJNJIH TAČAKA ZA ISPITIVANJE AKUTNE TOKSIČNOSTI NA EMBRIONIMA ZEBRICA

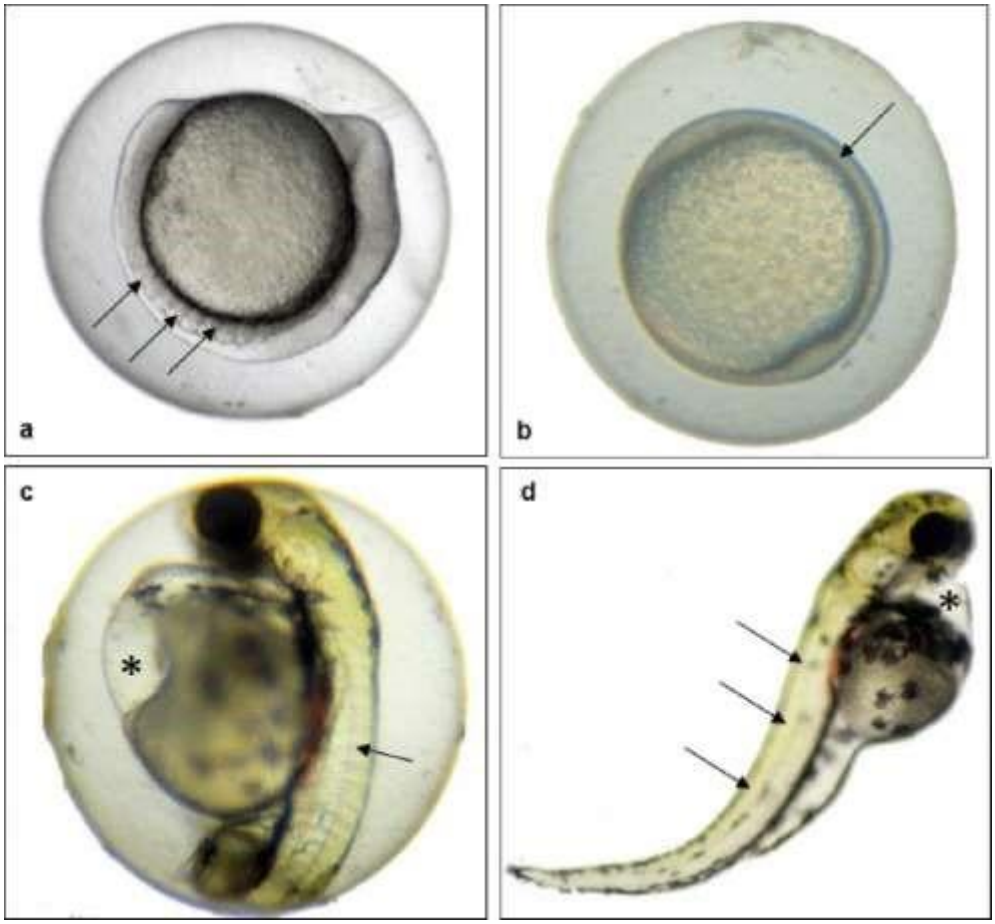
Sljedeće apikalne krajnje tačke znak su akutne toksičnosti i smrti embriona: *koagulacija embriona, neodvajanje repa, izostanak formiranja somita i izostanak otkucaja srca*. Sljedeće mikrofotografije odabrane su za ilustraciju tih krajnjih tačaka.

Slika 1. Koagulacija embrija



Pri posmatranju uz jako osvjetljenje polja na koagulsanim embrionima zebrica vidljiv je niz neprozirnih grupa.

Slika 2. Izostanak formiranja somita

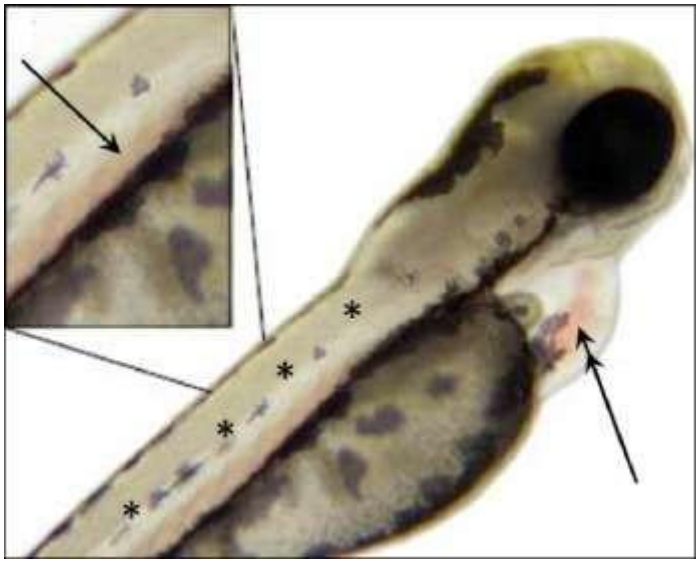


Uprkos kašnjenju u razvoju za otprilike 10 sati, kod embriona zebrice starog 24 sata na slici a) vide se dobro razvijeni somiti (→), dok kod embriona na slici b) nema nikakvog znaka formiranja somita (→). Zbog velikog edema zumančane kesice, kod embriona zebrice starog 48 sati na slici c) dobro se vide formirani somiti (→), dok kod embriona zebrice starog 96 sati na slici d) nema nikakvog znaka formiranja somita (→). Kod embriona na slici d) vide se i zakrivljenost skolioza i perikardijalni edem.

Slika 3. Neodvajanje korijena repa u bočnom prikazu

(a: →; embrion zebrice star 96 sati). Vidi se da nema osnove oka.

Slika 4. Izostanak otkucaja srca



Izostanak otkucaja srca po definiciji je teško pokazati na mikrofotografiji. Na izostanak otkucaja srca upućuje nekontrahovano srce (dvostruka strelica). Nepokretljivost krvnih ćelija u npr. trbušnoj aorti (→ u isječku) nije indikator izostanka otkucaja srca. Primjetan je i izostanak formiranja somita u ovog embriona, homogen umjesto segmentiranog izgleda mišićnog tkiva). Da bi se zabilježio izostanak otkucaja srca, embrione je potrebno posmatrati najmanje jednu minutu pod povećanjem od najmanje 80 puta.

C.50. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI NA KLASASTOM KROCNJU (*MYRIOPHYLLUM SPICATUM*) U SISTEMU BEZ SEDIMENTA

1. Uvod

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 238 (2014.). Namijenjena je za procjenu toksičnosti hemikalija za klasasti krocanj (*Myriophyllum spicatum*), podvodnu vodenu dvosupnicu, vrstu iz porodice krocanja. Bazira se na postojećoj ASTM-ovoj ispitnoj metodi modifikovanoj za ispitni sistem bez sedimenta radi procjene intrinzične ekotoksičnosti ispitivanih hemikalija (ne zavisi od raspodje ispitivane hemikalije u vodi i sedimentu). Ispitni sistem bez sedimenta analitički je manje složen (samo vodena faza) i rezultati se mogu analizirati paralelno i/ili u poređenju s rezultatima dobijenima ispitivanjem na *Lemna sp.*; usto, zbog potrebnih sterilnih uslova minimalizirani su efekti mikroorganizama i alga (apsorpcija / razgradnja hemikalije itd.). Ovo ispitivanje ne zamjenjuje druga ispitivanja toksičnosti za vodene organizme, već bi trebalo biti dopuna tim ispitivanjima radi cjelokupne procjene opasnosti i rizika za vodene biljke. Ispitna je metoda validovana međulaboratorijskim testom.

Opisani su detalji ispitivanja s obnavljanjem (polustatičko) i bez obnavljanja (statičko) ispitnog rastvora. Zavisi od ciljeva ispitivanja i regulatornih zahtjeva, preporučuje se primjena polustatičke metode, npr. za supstanci koje se brzo gube iz rastvora zbog isparenja, adsorpcije, fotorazgradnje, hidrolize, taloženja ili biorazgradnje. Ova ispitna metoda primjenjuje se za supstance za koje je ispitna metoda validovana (vidjeti pojedinosti u izvještaju o međulaboratorijskom testu, formulacije ili poznate smješe; ako se ispituje smješa, trebalo bi što detaljnije opisati hemijski identitet i količinu njenih sastojaka. Ispitivanjem toksičnosti na klasastom krocnju (*Myriophyllum spicatum*) u sistemu bez sedimenta nadopunjuje se ispitivanje toksičnosti na klasastom krocnju u sistemu voda-sediment. Prije primjene ove ispitne metode za ispitivanje smješe koje je namijenjeno u regulatornu svrhu trebalo bi razmotriti mogu li se tom metodom osigurati odgovarajući rezultati za tu svrhu, i zašto. Takva razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smješe.

1.2 Načelo Ispitivanja

Kulturama klasastog krocnja (*Myriophyllum spicatum*) koje stalno rastu (samo u modifikovanom Andrewsovom medijumumu, vidjeti Dodatak 2.) omogućava se da rastu kao monokulture u različitim koncentracijama ispitivane hemikalije u sistemu bez sedimenta 14 dana. Cilj je ispitivanja kvantifikovati efekte hemikalije na vegetativni rast tokom tog perioda ocjenjivanjem odabranih mjernih varijabila. Mjerne varijabile su rast tj. povećanje dužine izdanka, bočnih grana i korijenja, povećanje svježe i suve mase i povećanje broja pršljena. Usto, posmatraju se i prepoznatljive kvalitativne promjene ispitnih organizama, kao što su izobličenje, hloroza, koja je prepoznatljiva po žutoj boji, i nekroza, prepoznatljiva po bijeloj ili smeđoj boji. Da bi se kvantifikovali efekti hemikalije, rast u ispitnom rastvoru upoređuje se s rastom u kontrolama te se utvrđuje koncentracija koja uzrokuje određeni postotak (x %) inhibicije rasta i izražava se kao EC_x; „x" može biti bilo koja vrijednost, zavisi od regulatornih zahtjeva npr. EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}. Treba napomenuti da su procjene EC_{10} i EC_{20} pouzdane i primjerene samo u ispitivanjima u kojima su koeficijenti varijacije za kontrolne biljke niži od nivoa efekta koji se procjenjuje, tj. za pouzdanu procjenu EC_{20} koeficijent varijacije trebao bi biti < 20 %.

Trebalo bi odrediti prosječnu specifičnu brzinu rasta (na osnovu procjena dužine glavnog izdanka i tri drugih mjernih varijabila) i prirast (na osnovu povećanja dužine glavnog izdanka i tri drugih mjernih varijabila) netretiranih i tretiranih biljaka. Na osnovu specifične brzine rasta (r) i prirasta (y) zatim se određuju E_rC_x (npr. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) odnosno E_yC_x (npr. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}). Usto se mogu statistički odrediti i najniža koncentracija s vidljivim efektom (LOEC) i najviša koncentracija bez vidljivog efekta (NOEC).

1.3 Podaci o ispitivanoj hemikaliji

Mora biti raspoloživa analitička metoda odgovarajuće osjetljivosti za kvantifikaciju ispitivane hemikalije u ispitnom medijumumu. Za određivanje ispitnih uslova korisno je imati podatke o ispitivanoj hemikaliji kao što su strukturna formula, čistoća i nečistoće, rastvorljivost u vodi, stabilnost u vodi i na svjetlosti, konstanta disocijacije kiseline (pK_a), koeficijent raspodjele oktanol/voda (K_{ow}), napon pare i biorazgradivost. Rastvorljivost u vodi i napon pare mogu se upotrijebiti za izračunavanje konstante Henryjeva zakona, iz koje se može zaključiti mogu li se u periodu ispitivanja očekivati značajni gubitci ispitivane hemikalije. Tako se može zaključiti treba li preduzeti određene mjere za kontrolu tih gubitaka. Ako podaci o rastvorljivosti i stabilnosti ispitivane hemikalije nisu pouzdani, preporučuje se da se rastvorljivost i stabilnost procijene u uslovima ispitivanja, tj. u uzgojnom medijumumu i pri temperaturi i osvjetljenju koji će se upotrebljavati tokom ispitivanja.

Kontrola pH-vrijednosti ispitnog medijumuma posebno je važna, npr. pri ispitivanju metala ili supstanci koje su hidrolitički nestabilne. Dodatne smjernice za ispitivanje hemikalija čija fizičkohemijska svojstva otežavaju ispitivanje nalaze se u Smjernicama OECD-a.

1.4 Valjanost ispitivanja

Da bi ispitivanje bilo valjano, vrijeme udvostručenja dužine glavnog izdanka u kontroli mora biti kraće od 14 dana. Taj se kriterijum može ispuniti primjenom statičkog ili polustatičkog ispitivanja uz medijumume i ispitne uslove opisane u ovoj metodi.

Srednji koeficijent varijacije za prirast na osnovu mjerenja svježe mase izdanka (od početka do kraja ispitivanja) i dodatnih mjernih varijabila u kontrolnim kulturama ne prelazi 35 % između ponovljenih uzoraka.

Više od 50 % ponovljenih uzoraka kontrolne grupe održavaju se sterilnima, tj. bez vidljivih zagađenja drugim organizmima kao što su alge, gljivice i bakterije (bistra rastvora), tokom perioda izlaganja od 14 dana. *Napomena:* smjernice o tome kako procijeniti sterilnost dostupne su u izvještaju o međulaboratorijskom testu.

1.5 Referentna hemikalija

Referentna hemikalija (ili više njih), kao što je 3,5-dihlorofenol, koji je upotrijebljen u međulaboratorijskom testu, može se ispitati radi provjere ispitnog postupka; prema podacima iz meĐulaboratorijaskog testa srednje su vrijednosti EC_{50} 3,5-dihlorofenola za različite varijable odgovora između 3,2 mg/l i 6,9 mg/l (za pojedinosti o intervalu pouzdanosti za te vrijednosti vidjeti izvještaj o međulaboratorijskom testu). Preporučljivo je da se referentna hemikalija ispita barem dvaput godišnje ili, ako se ispitivanje sprovodi rjeđe, istovremeno s određivanjem toksičnosti ispitivane hemikalije.

1.6 Opis metode Oprema

Sva oprema koja dolazi u dodir s ispitnim medijumumima trebala bi biti izraĐena od stakla ili drugog hemijski inertnog materijala. Staklenu opremu koja se upotrebljava za uzgoj i ispitivanje trebalo bi očistiti od hemijskih zagaĐivača koji bi mogli dospjeti u ispitni medijumum i trebala bi biti sterilna. Ispitne posude trebale bi biti dovoljno duge da izdanci u kontrolnim posudama mogu rasti u vodenoj fazi, a da ne dosegnu površinu ispitnog medijumuma na kraju ispitivanja. Preporučuju se staklene epruvete s debelim zidovima od borosilikatnog stakla, bez izlivanja na vrhu, unutrašnjeg prečnika približno 20 mm, dužine približno 250 mm, s aluminijskim čepovima.

Budući da modifikovani Andrewsov medijumum sadrži saharozu (koja podstiče rast gljivica i bakterija), ispitne rastvora moraju se pripremati u sterilnim uslovima. Sve tečnosti i oprema sterilišu se prije upotrebe. Sterilizacija se sprovodi tretiranjem zagrijanim vazduhom (210 °C) 4 sata ili tretiranjem u autoklavu 20 minuta na 121 °C. Usto, sve bočice, zdjelice, zdjele i ostala oprema tretiraju se plamenom na sterilnoj radnoj površini neposredno prije upotrebe.

Kulture i ispitne posude ne smiju se držati zajedno. To je najlakše postići ako se upotrebljavaju odvojene uzgojne komore, inkubatori ili prostorije. Trebalo bi se moći kontrolisati osvjetljenje i temperaturu te ih održavati na stalnoj nivou.

Ispitni organizam

Klasasti krocanj (*Myriophyllum spicatum*), podvodna vodena dvosupnica, vrsta je iz porodice krocanja. Između juna i avgusta njeni sitni ružičasto-bijeli cvjetići izlaze iznad površine vode. Biljke su ukorijenjene u zemljište sistemom čvrstih rizoma. Mogu se pronaći u cijeloj sjevernoj hemisferi u eutrofičnim, ali zagađenim vodama stajaćicama bogatijima kalcijumom i s muljevitim supstratom. Klasasti krocanj bolje uspijeva u slatkim vodama, no može se pronaći i u bočatim vodama.

Za ispitivanje toksičnosti u sistemu bez sedimenta potrebne su sterilne biljke. Ako laboratorije koje sprovode ispitivanje nema potrebne kulture klasastog krocnja, može preuzeti sterilni biljni materijal iz drugog laboratorijaa ili prikupiti (nesterilni) biljni materijal u prirodi odnosno nabaviti ga od komercijalnog dobavljača; za biljke prikupljene u prirodi potrebna je taksonomska provjera vrste. Ako se biljke prikupljaju u prirodi ili nabavljaju od komercijalnog dobavljača, potrebno ih je sterilisati i držati u kulturi u istom medijumumu kakav će se upotrebljavati u ispitivanju najmanje osam nedelja prije upotrebe. Na mjestima na kojima se prikupljaju polazne kulture ne smije biti očitih izvora zagađenja. Pri prikupljanju klasastog krocnja u prirodi treba posebno pripaziti da se prikuplja odgovarajuća vrsta, posebno u regijama u kojima može hibridizovati s drugim vrstama krocnja. Ako se kulture nabavljaju iz druge laboratorijae, treba ih držati u sličnim uslovima najmanje tri nedelje. Uvijek treba navesti porijeklo biljnog materijala i vrstu koja se upotrebljava za ispitivanje.

Biljke koje će se upotrijebiti za ispitivanje trebalo bi pažljivo odabrati jer će njihov kvalitet i jednolikost znatno uticati na rezultate ispitivanja. Trebalo bi upotrebljavati mlade biljke koje brzo rastu i nemaju vidljivih oštećenja ni promjena boje (hloroza). Pojedinosti o pripremi ispitnih organizama navedene su u Dodatku 4.

Uzgoj kulture

Kako bi rjeđe bilo potrebno održavati kulture (npr. kad određeno vrijeme nisu planirana ispitivanja s krocnjem), kulture se mogu držati pod smanjenim osvjetljenjem i na nižoj temperaturi (50 µE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C). Pojedinosti o uzgoju navedene su u Dodatku 3.
Najmanje 14 dana – 21 dan prije ispitivanja dovoljan broj ispitnih organizama aseptički se prenosi u svježi sterilni medijumum i uzgaja 14 dana – 21 dan u ispitnim uslovima kao pretkultura. Pojedinosti za pripremu pretkulture navedene su u Dodatku 4.

Ispitni medijumum

Za klasati krocanj u ispitnom sistemu bez sedimenta preporučuje se samo jedan hranjivi medijumum, kako je opisano u Dodatku 2. Za uzgoj kulture klasastog krocnja i ispitivanje na njemu preporučuje se modifikacija Andrewsova medija. Modifikovani Andrewsov medijumum pravia se od pet odvojeno pripremljenih hranjivih matičnih rastvora s dodatkom 3 % saharoze. Pojedinosti o pripremi medijumuma navedene su u Dodatku 2.

Za dobijanje ispitnih rastvora potreban je deseterostruko koncentrirani modifikovani Andrewsov medijumum (uz razrjeđivanje prema potrebi). Sastav medijumuma naveden je u Dodatku 2.

Ispitne rastvora

Ispitni rastvori obično pripremaju se razrjeđivanjem matičnog rastvora. Matični rastvor ispitivane hemikalije obično se pripremaju rastvaranjem hemikalije u demineralizovanoj (tj. Destilovanoj ili dejonizovanoj) vodi. Hranjive supstance dodaju se iz deseterostruko koncentriranoga modifikovanog Andrewsova medija.

Matični rastvori ispitivane hemikalije mogu biti sterilizovati u autoklavu na 121 °C 20 minuta ili sterilnom filtracijom, ako tehnika sterilizacije ne denaturira ispitivanu hemikaliju. Ispitni rastvori mogu biti pripremljeni i u sterilnoj demineralizovanoj vodi ili medijumumu, u sterilnim uslovima. Pri izboru postupka sterilizacije matičnih rastvora ispitivane hemikalije trebalo bi uzeti u obzir termostabilnost i adsorpciju na različitim površinama. Zbog toga se preporučuje da se matični rastvori pripremaju u sterilnim uslovima, tj. koristeći se sterilnim materijalom za rastvaranje ispitivane hemikalije u sterilnim uslovima (npr. sterilizacija plamenom, sterilizacija u komorama sa laminarnim protokom itd.) u sterilnoj vodi. Ova tehnika pripreme sterilnih matičnih rastvora valjana je i za supstanci i za smješe.

Najviša ispitna koncentracija ispitivane hemikalije u pravilu ne bi smjela biti viša od rastvorljivosti te hemikalije u vodi u ispitnim uslovima. Za ispitivane hemikalije slabe rastvorljivosti u vodi možda će biti potrebno pripremiti koncentriranu matičnu rastvor ili disperziju hemikalije pomoću organskog rastvarača ili dispergenta kako bi se olakšalo dodavanje tačnih količina ispitivane hemikalije u ispitni medijumum i ubrzalo njenu disperziju i rastvaranje. Treba svakako izbjeći upotrebu takvih materijala. Pomoćni rastvarač ili dispergenti koji se upotrijebe ne bi smjeli djelovati fitotoksično. Neka od rastvarača u širokoj upotrebi koja nemaju fitotoksično djelovanje u koncentracijama do 100 µl/l su aceton i dimetilformamid. Ako se upotrebljava rastvarač ili dispergent, treba navesti njegovu konačnu koncentraciju, koju treba svesti na najmanju moguću mjeru (≤ 100 µl/l), te voditi računa da sve tretirane i kontrolne grupe sadrže istu koncentraciju rastvarača odnosno dispergenta.

Ispitne i kontrolne grupe

Prethodna saznanja o toksičnosti ispitivane hemikalije za klasasti krocanj na osnovu ispitivanja za utvrđivanje raspona mogu pomoći u izboru prikladnih ispitnih koncentracija. U glavnom ispitivanju toksičnosti u pravilu je potrebno pet (kao u testu inhibicije rasta *Lemna sp.*, poglavlje C.26. ovog Priloga) do sedam ispitnih koncentracija raspoređenih u geometrijskom nizu; treba ih odabrati tako da vrijednosti NOEC i EC_{50} budu unutar raspona koncentracija. Ispitne se koncentracije po mogućnosti ne bi smjele razlikovati za faktor veći

od 3,2; no vrijednost može biti i veća ako je kriva koncentracija-odgovor ravna. Ako se upotrebljava manje od pet koncentracija, treba dati obrazloženje. Potrebno je najmanje pet ponovljenih uzoraka za svaku ispitnu koncentraciju. Pri određivanju raspona ispitnih koncentracija (za ispitivanje za utvrđivanje raspona i/ili glavno ispitivanje toksičnosti) trebalo bi uzeti u obzir sljedeće: da bi se pri određivanju EC_x obezbijedila primjerena nivo pouzdanosti, vrijednost EC_x mora biti između najviše i najniže ispitne koncentracije. Na primjer, ako se procjenjuje EC_{50}, najviša ispitna koncentracija trebala bi biti viša od EC_{50}. Ako je vrijednost EC_{50} izvan raspona ispitnih koncentracija, pripadajući intervali pouzdanosti bit će veliki i možda neće biti moguće ispravno procijeniti statističku prikladnost modela.

Ako je cilj procijeniti LOEC/NOEC, najniža ispitna koncentracija trebala bi biti dovoljno niska da rast ne bude znatno manji od rasta u kontroli. Isto tako, najviša ispitna koncentracija trebala bi biti dovoljno visoka da rast bude znatno manji nego u kontroli. U protivnom je ispitivanje potrebno ponoviti s drugim rasponom koncentracija (osim ako je najviša koncentracija na granici rastvorljivosti ili jednaka maksimalnoj predviđenoj graničnoj koncentraciji, npr. 100 mg/l).

Svako ispitivanje trebalo bi uključivati kontrole u kojima su hranjivi medijumumi, ispitni organizam (izbor što je više moguće homogenog biljnog materijala, svježe bočne grane iz pretkultura skraćene na 2,5 cm od baze), uslovi i postupci isti kao u ispitnim posudama, ali bez ispitivane hemikalije. Ako se upotrebljava pomoćno rastvarač ili dispergent, potrebna je dodatna kontrola koja sadržava istu koncentraciju rastvarača/dispergenta kao i posude s ispitivanom hemikalijom. Potrebno je barem 10 kontrolnih posuda kao ponovljenih uzoraka (i posuda s rastvaračem, ako se ono upotrebljava).

Ako nije potrebno odrediti NOEC, plan ispitivanja može se izmijeniti tako da se poveća broj koncentracija i smanji broj ponovljenih uzoraka po koncentraciji. No svakako je potrebno barem 10 kontrolnih ponovljenih uzoraka.

Izlaganje

Svježe bočne grane iz pretkulture skraćene na 2,5 cm od baze nasumično se raspoređujju po ispitnim posudama u aseptičkim uslovima; svaka ispitna posuda trebala bi sadržavati po jednu bočnu granu dugu 2,5 cm s apikalnim meristemom na jednom kraju. Odabrani biljni materijal u svim posudama trebao bi biti jednakog kvaliteta.

Ispitne posude treba nasumično rasporediti po inkubatoru kako bi se minimizirao uticaj prostornih razlika u intenzitetu svjetlosti i temperaturi. Usto ih je potrebno pri posmatranju rasporediti zajedno u blokove ili nasumično premještati posude (ili ih češće premještati).

Ako preliminarno ispitivanje stabilnosti pokaže da se koncentracija ispitivane hemikalije ne može održati (tj. izmjerena koncentracija pada ispod 80 % od izmjerene početne koncentracije) tokom perioda ispitivanja (14 dana), preporučuje se polustatičko ispitivanje. U tom slučaju biljke bi trebalo izložiti svježe pripremljenim ispitnim i kontrolnim rastvorom najmanje jednom tokom ispitivanja (npr. 7. dan). Učestalost izlaganja svježem medijumumu zavisi će od stabilnosti ispitivane hemikalije; za vrlo nestabilne ili isparljive hemikalije možda će biti potrebno češće izlaganje da bi se održale približno stalne koncentracije.

Ova ispitna metoda ne obuhvata izlaganje folijarnom primjenom (raspršivanje po lišću).

Ispitni uslovi

Za rasvjetu bi se trebalo koristiti toplim i/ili hladnim bijelim fluorescentnim svjetlom od 100 – 150 $\mu E\ m.^{2}\ s^{1}$ izmjereno kao fotosintetski aktivno zračenje (400 – 700 nm) na tačkama koje su jednako udaljene od izvora svjetlosti kao i dno ispitnih posuda (jednako osvjetljenju od 6 000 – 9 000 lux) te u ciklusu svjetlost-tama od 16: 8 h. Metoda detekcije i mjerenja svjetlosti, posebno vrsta senzora, utjeicaće će na izmjerenu vrijednost. Sferičnim senzorima

(koji reaguju na svjetlost iz svih uglova iznad i ispod mjerne ravnine) i „kosinusnim" senzorima (koji reaguju na svjetlost iz svih uglova iznad mjerne prave) daje se prednost u odnosu na usmjerene senzore jer bolje mjere vrijednosti za višetačkasti izvor svjetlosti kakav je ovdje opisan.

Temperatura u ispitnim posudama trebala bi biti 23 ± 2 °C. Pomak pH-vrijednosti u nekim slučajevima, npr. kad se ispituju nestabilne hemikalije ili metali; pH-vrijednost trebala bi ostati u rasponu 6 – 9.

Trajanje

Ispitivanje završava 14 dana nakon prenošenja biljaka u ispitne posude.

Mjerenja i analitička određivanja

Na početku ispitivanja dužina glavnog izdanka ispitnog organizma je 2,5 cm; mjeri se pokretnim mjernim instrumentom (vidjeti Dodatak 4.) ili fotografisanjem i analizom slike. Dužinu glavnog izdanka ispitnog organizma koji izgleda normalno ili neuobičajeno treba odrediti na početku ispitivanja, najmanje jedanput tokom 14-dnevnog perioda izlaganja i na kraju ispitivanja. Napomena: kao alternativa za one kojima nije dostupna analiza slika, ako je radna površina sterilizovana prije stavljanja biljaka u ispitne posude, dužina glavnog izdanka može se izmjeriti i sterilnim pokretnim mjernim instrumentom na početku i tokom ispitivanja. Treba zabilježiti sve promjene u razvoju biljaka npr. deformaciju izdanka, izgled, naznake nekroze, hlorozu, raspadanje ili gubitak sposobnosti plutanja te promjene dužine i izgleda korijenja. Treba zabilježiti i bitne ispitni medijumum (npr. prisutnost nerastvorenog materijala, rast algi, gljivica ili bakterija u ispitnoj posudi).

Uz određivanja dužine glavnog izdanka tokom ispitivanja, trebalo bi procijeniti i efekte ispitivane hemikalije na tri sljedeće mjerne varijable (ili više njih):

1) ukupna dužina bočnih grana;
2) ukupna dužina izdanka;
3) ukupna dužina korijena;
4) svježa masa;
5) suva masa;
6) Broj pršljena

Opažanja tokom ispitivanja za utvrđivanje raspona mogu pomoći u izboru odgovarajućih dodatnih mjerenja šest navedenih varijabila. Poželjno je odrediti svježu i suvu masu. Zbog činjenice da saharoza i svjetlost (izloženost korijenja svjetlosti tokom ispitivanja) mogu uticati na nositelje auksina (biljni hormon rasta) i da neke hemikalije mogu imati način djelovanja sličan djelovanju auksina treba li uključiti krajnju tačku koja se odnosi na korijen (parametar iii.). Rezultati međulaboratorijskog ispitivanja pokazuju velike koeficijente varijacije (> 60 %) za ukupnu dužinu bočnih grana. Ukupna dužina bočnih grana u svakom je slučaju uključena u mjeru ukupne dužine izdanka koja pokazuje prihvatljivije koeficijente varijacije od < 30 %. S obzirom na navedeno, glavne krajnje tačke koje je preporučljivo mjeriti su: ukupna dužina izdanka, svježa masa i suva masa, mjerenje parametra - broj pršljena zavisi od izboru izvođača eksperimenta.

Prednost je dužine glavnog izdanka i broja pršljena u tome što ih se može odrediti za svaku ispitnu i kontrolnu posudu na početku, za vrijeme i na kraju ispitivanja fotografiranjem i analizom slike, iako se može upotrijebiti i (sterilno) pokretni mjerni instrument.

Ukupna dužina bočnih grana, ukupna dužina korijena (kao zbir svih bočnih grana ili korijena) te ukupna dužina izdanka (kao zbir dužine glavnog izdanka i ukupne dužine bočnih grana) mogu se mjeriti pokretnim mjernim instrumentom na kraju izlaganja.

Svježu i/ili suvu masu trebalo bi odrediti na početku ispitivanja na uzorku pretkulture reprezentativnom za biljni materijal koji se upotrebljava na početku ispitivanja te na kraju ispitivanja na biljnom materijalu iz svake ispitne i kontrolne posude.

Ukupna dužina bočnih grana, ukupna dužina izdanka, ukupna dužina korijena, svježa masa, suva masa i broj pršljena mogu se odrediti kako slijedi:

i. ukupna dužina bočnih grana: dužina bočnih grana može se odrediti mjerenjem svih bočnih grana pokretnim mjernim instrumentom na kraju izlaganja. Ukupna dužina bočnih grana zbir je dužina svih bočnih grana u svakoj ispitnoj i kontrolnoj posudi;

ii. ukupna dužina izdanka: dužina glavnog izdanka može se odrediti analizom slike ili pokretnim mjernim instrumentom. Ukupna dužina izdanka zbir je ukupne dužine bočnih grana i dužine glavnog izdanka u svakoj ispitnoj i kontrolnoj posudi na kraju izlaganja;

iii. ukupna dužina korijena: ukupna dužina korijena može se odrediti mjerenjem svih korijena pokretnim mjernim instrumentom na kraju izlaganja. Ukupna dužina korijena zbir je dužina svih korijena u svakoj ispitnoj i kontrolnoj posudi;

iv. svježa masa: svježa masa može se odrediti vaganjem ispitnih organizama na kraju izlaganja. Sav biljni materijal iz svake ispitne i kontrolne posude ispira se destilovanom vodom i lagano suši celuloznim papirom. Nakon te pripreme svježa masa određuje se
vaganjem. Početna biomasa (svježa masa) određuje se na osnovu uzorka ispitnih organizama uzetog iz iste šarže koja je upotrijebljena za inokulaciju ispitnih posuda;

v. suva masa: nakon pripreme za određivanje suva masa. Početna biomasa (suva masa)
određuje se na osnovu uzorka ispitnih organizama uzetog iz iste šarže koja je upotrijebljena za inokulaciju ispitnih posuda; vi. broj pršljena: broje se svi pršljeni na glavnom izdanku.

Učestalost mjerenja i analitičkih određivanja

Ako se primjenjuje statičko ispitivanje, trebalo bi na početku i kraju ispitivanja odrediti pH svake tretirane grupe. Ako se primjenjuje polustatičko ispitivanje, pH bi trebalo izmjeriti u svakoj šarži „svježe" ispitne rastvora prije svakog obnavljanja te u odgovarajućim „potrošenim" rastvor.

Intenzitet svjetlosti trebalo bi mjeriti u uzgojnoj komori, inkubatoru odnosno prostoriji, na tačkama koje su jednako udaljene od izvora svjetlosti kao i ispitni organizmi. Mjerenja bi trebalo ssprovesti najmanje jedanput tokom ispitivanja. Usto najmanje jedanput dnevno (ili neprekidno, pomoću uređaja za automatsko bilježenje podataka) treba bilježiti temperaturu medijumuma u posudi koja se drži u istim uslovima u uzgojnoj komori, inkubatoru odnosno prostoriji.

Koncentracije ispitivane hemikalije (ili više hemikalija) određuju se u prikladnim razmacima tokom ispitivanja. U statičkom ispitivanju koncentracije se moraju odrediti barem na početku i na kraju ispitivanja.

U polustatičkom ispitivanju u kojem se očekuje da koncentracija ispitivane hemikalije (ili više hemikalija) neće ostati u granicama od ± 20 % nazivne koncentracije potrebno je analizirati sve svježe pripremljene ispitne rastvora i ponoviti analizu pri svakom obnavljanju rastvora. Međutim, u svim ispitivanjima u kojima izmjerene početne koncentracije ispitivane hemikalije (ili više hemikalija) nisu u granicama od ± 20 % nazivne koncentracije, ali ima dovoljno

dokaza da su početne koncentracije ponovljive i stabilne (tj. unutar područja od 80 – 120 % početne koncentracije), hemijska se određivanja mogu sprovoditi samo na najvišoj i najnižoj ispitnoj koncentraciji. U svakom slučaju, određivanje ispitnih koncentracija prije obnavljanja potrebno je ssprovesti samo na po jednoj posudi za svaku ispitnu koncentraciju (ili na združenom sadržaju posuda iste koncentracije).

Ako se može dokazati da se ispitna koncentracija tokom cijelog ispitivanja na zadovoljavajući način održavala u granicama od ± 20 % nazivne ili izmjerene početne koncentracije, analiza rezultata može se bazira ti na nazivnim ili izmjerenim početnim vrijednostima. Ako je odstepene od nazivne ili izmjerene početne koncentracije veće od ± 20 %, analiza rezultata treba se bazira ti na srednjoj geometrijskoj koncentraciji tokom izlaganja ili na modelima kojima se opisuje pad koncentracije ispitivane hemikalije.

Ispitivanje granične koncentracije

U određenim okolnostima, npr. kad preliminarno ispitivanje ukazuje na to da ispitivana hemikalija ne djeluje toksično u koncentraciji do 100 mg/l ili do granice svoje rastvorljivosti u ispitnom medijumumu, odnosno, ako je riječ o formulaciji, do granice disperzivnosti, može se ssprovesti ispitivanje granične koncentracije koje uključuje poređenje odgovora kontrolne grupe s odgovorom jedne tretirane grupe (100 mg/l ili koncentracija koja odgovara granici rastvorljivosti). Preporučuje se da se uz ispitivanje granične koncentracije svakako sprovede i analiza koncentracije za izlaganje. Svi navedeni ispitni uslovi i kriterijumi valjanosti vrijede i za ispitivanje granične koncentracije, s time da broj tretiranih ponovljenih uzoraka treba udvostručiti. Rast u kontrolnoj i tretiranoj grupi može se analizirati statističkim testom za poređenje srednjih vrijednosti, npr. Studentovim t-testom.

Podaci i izvještavanje
Varijable odgovora

Svrha ispitivanja je odrediti efekte ispitivane hemikalije na vegetativni rast klasastog krocnja (*Myriophyllum spicatum*). U ovoj ispitnoj metodi opisane su dvije varijable odgovora:

a) prosječna specifična brzina rasta: ta varijabla odgovora izračunavanju na osnovu promjena logaritama dužine glavnog izdanka, i usto na osnovu promjena logaritama drugih mjernih parametara – ukupne dužine izdanka, svježe mase, suve mase ili broja pršljena – tokom vremena (izraženo po danu) u kontrolama i svim tretiranim grupama. Za mjerne parametre ukupnu dužinu bočnih grana i ukupnu dužinu korijena ne može se izračunati prosječna specifična brzina rasta. Na početku ispitivanja ispitni organizam nema bočne grane ni korijenje (nakon pripreme iz pretkulture); nakon početne vrijednosti nula, izračunavanje prosječne specifične brzine rasta nije definisano;

b) prirast: ta se varijabla odgovora izračunava na osnovu promjena dužine glavnog izdanka, i usto na osnovu promjena drugih mjernih parametara – najbolje ukupne dužine izdanka, svježe mase, suve mase ili broja pršljena, te drugih parametara ako se smatraju korisnima, u kontrolama i svim tretiranim grupama do kraja ispitivanja.

Procjene toksičnosti se baziraju na dužini glavnog izdanka i trima dodatnim mjernim varijablama (najbolje ukupna dužina izdanka, svježa masa, suva masa ili broj pršljena) jer neke hemikalije mogu uticati na druge mjerne varijable znatno više nego na dužinu glavnog izdanka. Taj bi uticaj ostao neotkriven kad bi se računala samo dužina glavnog izdanka.

Prosječna specifična brzina rasta

Prosječna specifična brzina rasta za određeno Period izračunava se kao logaritamsko povećanje varijabila rasta – dužine glavnog izdanka i još triju mjernih varijabila (ukupna dužina izdanka, svježa masa, suva masa ili broj pršljena) – primjenom formule u nastavku za svaki ponovljeni uzorak kontrolne i tretirane grupe:

$$\mu_{i-j} = \frac{ln\ N_j\ - ln\ N_i}{t}$$

pri čemu je: μ_{i-j} : prosječna specifična brzina rasta od vremena i do j N_i : mjerna varijabla u ispitnoj ili kontrolnoj posudi u vremenu i N_j : mjerna varijabla u ispitnoj ili kontrolnoj posudi u vremenu j t : vremensko Period od i do j

Za svaku tretiranu i kontrolnu grupu treba izračunati srednju vrijednost brzine rasta i procjene varijance.

Prosječnu specifičnu brzinu rasta treba izračunati za čitavo Period ispitivanja (vrijeme „i" u navedenoj formuli označava početak ispitivanja, a vrijeme „j" kraj ispitivanja). Za svaku ispitnu koncentraciju i kontrolu treba izračunati srednju vrijednost prosječne specifične brzine rasta te procjene varijance. Usto je potrebno procijeniti i brzinu rasta u pojedinim etapama tokom perioda izlaganja kako bi se ocijenili efekti ispitivane hemikalije koji se javljaju (npr. pregledom logaritamski transformiranih kriva rasta).

Postotak inhibicije brzine rasta (I_r) tada se može izračunati za svaku ispitnu koncentraciju (tretiranu grupu) prema sljedećoj formuli:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

pri čemu je:

% Ir : postotak inhibicije prosječne specifične brzine rasta μC : srednja vrijednost μ u kontroli μT : srednja vrijednost μ u tretiranoj grupi *Prirast*

Efekti na prirast određuju se na osnovu mjerne varijable dužine glavnog izdanka i još triju mjernih varijabila (najbolje ukupna dužina izdanka, svježa masa, suva masa ili broj pršljena) u svakoj ispitnoj posudi na početku i na kraju ispitivanja. Za svježu ili suvu masu početna biomasa određuje se na osnovu uzorka ispitnih organizama uzetog iz iste šarže koja je upotrijebljena za inokulaciju ispitnih posuda. Za svaku ispitnu koncentraciju i kontrolu treba izračunati srednju vrijednost prirasta i procjene varijance. Srednji postotak inhibicije prirasta (% I_y) za svaku tretiranu grupu može se izračunati kako slijedi:

$$\%I_y = \frac{b_c - b_T}{b_c}$$

pri čemu je:

% Iy : postotak smanjenja prirasta

bC : konačna biomasa u kontrolnoj grupi umanjena za početnu biomasu bT : konačna biomasa u tretiranoj grupi umanjena za početnu biomasu

Vrijeme udvostručenja

Da bi se odredilo vrijeme udvostručenja (T_d) dužine glavnog izdanka i utvrdilo je li ispunjen taj kriterijum valjanosti, dobijene podatke za kontrolne posude treba uvrstiti u sljedeću formulu:

T_d = ln 2/μ pri čemu je prosječna specifična brzina rasta određena.

Prikaz kriva koncentracija-odgovor

Treba izraditi krive koncentracija-odgovor kao prikaz odnosa srednje vrijednosti postotka inhibicije varijable odgovora (I_r ili I_y,) i logaritma koncentracije ispitivane hemikalije.

Procjena EC_x

Procjene EC_x trebale bi se bazira ti i na prosječnoj specifičnoj brzini rasta (E_rC_x) i na prirastu (E_yC_x), a svaka od njih bi se pak trebala bazira ti na dužini glavnog izdanka te eventualno drugim mjernim varijablama (najbolje ukupna dužina izdanka, svježa masa, suva masa ili broj pršljena). Razlog tomu je što neke hemikalije ne utiču jednako na dužinu glavnog izdanka i na druge mjerne varijable. Potrebni parametri toksičnosti stoga su četiri vrijednosti EC_x za svaku izračunanu nivo inhibicije x: E_rC_x (dužina glavnog izdanka), E_rC_x (najbolje ukupna dužina izdanka, svježa masa, suva masa ili broj pršljena), E_yC_x (dužina glavnog izdanka) i E_yC_x (najbolje ukupna dužina izdanka, svježa masa, suva masa ili broj pršljena).

Treba napomenuti da vrijednosti EC_x izračunane primjenom tih dviju varijabila odgovora nisu uporedive i tu razliku treba uzeti u obzir pri korištenju rezultatima ispitivanja. Uz poštovanje ispitnih uslova ove ispitne metode, vrijednosti EC_x na osnovu prosječne specifične brzine rasta (E_rC_x) u većini će slučajeva biti više od rezultata na osnovu prirasta (E_yC_x) zbog razlike u matematičkoj osnovi tih dva pristupa. Tu razliku ne treba tumačiti kao razliku u osjetljivosti tih dviju varijabila odgovora; jednostavno je riječ o matematički različitim vrijednostima.

Statistički postupci

Cilj je dobiti kvantitativan odnos koncentracija-odgovor regresijskom analizom. Ako se sprovede linearizacijska transformacija podataka odgovora, npr. pomoću probit, logit ili Weibullova modela, može se primijeniti ponderisana linearna regresija; ipak, prednost se daje pokolonama nelinearne regresije kojima se bolje rješavaju neizbježne nepravilnosti podataka i odstepena od pravilnih distribucija. S približavanjem izostanku inhibicije ili potpunoj inhibiciji te se nepravilnosti transformacijom mogu i dodatno povećati te tako otežati analizu. Treba napomenuti da su standardne metode analize za vrijednosti probit, logit ili Weibull namijenjene kvantalnim podacima (npr. smrtnost ili preživljavanje) te se moraju posebno prilagoditi da bi se mogle primijeniti na podatke o brzini rasta i prirastu.

Za svaku varijablu odgovora koja se analizira treba izračunati procjene vrijednosti EC_x na osnovu odnosa koncentracija-odgovor. Po mogućnosti, za sve procjene treba odrediti granice pouzdanosti od 95 %. Valjanost podudaranja podataka odgovora s regresionim modelom trebalo bi procijeniti grafički ili statistički. Regresijsku analizu trebalo bi ssprovesti na osnovu odgovora pojedinačnih ponovljenih uzoraka, a ne na osnovu srednjih vrijednosti tretiranih grupa.

Ako rapoloživi regresijski modeli / regresijske metode nisu prikladni/-e za te podatke, procjene EC_{50} i granice pouzdanosti mogu se dobiti i linearnom interpolacijom sa samonadopunjavanjem (*bootstrapping*).

Za procjenu LOEC-a, a time i NOEC-a, potrebno je uporediti srednje vrijednosti tretiranih grupa primjenom tehnika analize varijance (ANOVA). Zatim srednju vrijednost za svaku koncentraciju treba uporediti sa srednjom vrijednošću kontrole primjenom odgovarajuće metode višestruke poređenja ili testa trenda. Može biti koristan Dunnettov ili Williamsov test.

Treba provjeriti vrijedi li pretpostavka homogenosti varijanci ANOVA-e. To se može procijeniti grafički ili formalnim testom. Prikladni su Leveneov ili Bartlettov test. Ako pretpostavka homogenosti varijanci nije ispunjena, to se ponekad može ispraviti logaritamskom transformacijom podataka. Ako je heterogenost varijanci prevelika i ne može se ispraviti transformacijom, treba razmotriti mogućnost analize metodama kao što su Jonckheereovi „step-down" testovi trenda.

Novije nauče studije rezultirale su preporukom da se pojam NOEC-a napusti i zamijeni procjenama
EC_x dobijenima regresijom. Za ovo ispitivanje s klasastim krocnjem nije utvrĐena primjerena vrijednost x. Ipak, čini se da je primjeren raspon od 10 do 20 % (zavisi od odabranoj varijabila odgovora), a poželjno je da se navedu obje vrijednosti, EC_{10} i EC_{20}, te njihove granice pouzdanosti.

Izvještavanje

Izvještaj o ispitivanju treba obuhvatati sljedeće:

Ispitivana hemikalija supstanca s jednim sastojkom:

— fizički izgled, rastvorljivost u vodi i druga relevantna fizičko-hemijska svojstva,

— podaci za hemijsku identifikaciju supstanci, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, oznaka SMILES ili InChI, strukturna formula, čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je praktički izvodivo itd. (uključujući udio organskog ugljenika, prema potrebi), supstanca s više sastojaka, supstanca nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcioni proizvod ili biološki materijal (UVCB supstancar) ili smješa:

— opis (koliko je to moguće) hemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativni udio i relevantna fizičko-hemijska svojstva sastojaka. *Ispitne vrste*

— naučni naziv i porijeklo.

Ispitni uslovi

— ispitni postupak (statički ili polustatički),
— datum početka i trajanje ispitivanja,

— ispitni medijumum,

— opis plana ispitivanja: ispitne posude i pokrovi, količine rastvora, dužina glavnog izdanka po ispitnoj posudi na početku ispitivanja,

— ispitne koncentracije (nazivne odnosno izmjerene, prema potrebi) i broj ponovljenih uzoraka po koncentraciji,

— način pripreme matičnih i ispitnih rastvora, uključujući eventualnu upotrebu rastvarača ili dispergenata,

— temperatura tokom ispitivanja,

— izvor svjetlosti, intenzitet i homogenost svjetlosti,

— pH-vrijednosti ispitnih i kontrolnih medijumuma,

— metoda analize ispitivane hemikalije s odgovarajućim podacima za procjenu kvaliteta (validacione studije, standardne devijacije ili granice pouzdanosti analiza),

— metode određivanja dužine glavnog izdanka i drugih mjernih varijabila, npr. ukupne dužine bočnih grana, ukupne dužine izdanka, ukupne dužine korijena, svježe mase, suve mase ili broja pršljena,

— stanje kulture (sterilna ili nesterilna) u svakoj ispitnoj i kontrolnoj posudi pri svakom posmatranju,

— sva odstepena od ove ispitne metode.

Rezultati

— neobrađeni podaci: dužina glavnog izdanka i druge mjerne varijable u svakoj ispitnoj i kontrolnoj posudi pri svakom posmatranju i svakoj analizi,

— srednje vrijednosti i standardne devijacije za svaku mjernu varijablu,

— krive rasta za svaku mjernu varijablu,

— izračunane varijable odgovora za svaki tretirani ponovljeni uzorak, uključujući srednje vrijednosti i koeficijente varijacije za ponovljene uzorke,

— grafički prikaz odnosa koncentracija-efekat,

— procjene krajnjih tačaka toksičnosti za varijable odgovora, npr. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, i pripadajući intervali pouzdanosti; ako se izračunavaju LOEC i NOEC, njihove vrijednosti i statističke metode koje su upotrijebljene za izračun,

— ako se primjenjuje ANOVA, jačina efekta koji se može utvrditi (npr. najmanja značajna razlika),

— svaka stimulacija rasta u bilo kojoj tretiranoj grupi,

— svi vidljivi znaci fitotoksičnosti i zapažanja u ispitnim rastvor,

— rasprava o rezultatima, uključujući i sve uticaje na rezultate ispitivanja nastale uslijed odstepena od ove ispitne metode.

Dodatak 2.

MODIFIKOVANI ANDREWSOV MEDIJUMUM ZA OSNOVNU KULTURU I PRETKULTURU

Modifikovani Andrewsov medijumum potreban za osnovnu kulturu i pretkulturu pravi se od pet odvojeno pripremljenih hranjivih matičnih rastvora s dodatkom 3 % saharoze.

Tabela 1. Sastav Andrewsove hranjive rastvora: (ASTM-ov standard E 1913-04)

Pravljenje hranjivih matičnih rastvora			Pravljenje hranjive rastvora
Matični rastvor	Hemikalija	Početna masa na 1 000 ml	ml na 5 l hranjive rastvora
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO_3	8,08 g	
	$Ca(NO_3)_2 \times 4\ H_2O$	18,88 g	

2	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	9,86 g	50
3	Vidjeti u nastavku: matična rastvora 3.1.		50
4	KH_2PO_4	2,72 g	50
5	$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	0,278 g	50
	$Na_2EDTA \times 2\ H_2O$	0,372 g	

Matični rastvori mogu se čuvati u frižideru šest mjeseci (na 5 – 10 °C). Samo matična rastvori 5 ima kraći rok trajanja (dva mjeseca).

Tabela 2. Pravljenje matičnog rastvora 3.1 za pripremu matičnog rastvora 3

Hemikalija	Početna masa u g/100 ml
$MnSO_4 \times 4\ H_2O$	0,223
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	0,115
H_3BO_3	0,155
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,0125
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4\ H_2O$	0,0037

Nakon što je matični rastvora 3.1 napravljen (tabela 2.), ona se zamrzava u alikvotima od približno 11 ml (na najmanje – 18 °C). Duboko smrznute doze rastvora imaju rok trajanja od pet godina.

Da bi se pripravila matična rastvora 3, treba odmrznuti matičnu rastvor 3.1, uliti 10 ml te rastvora u odmjernu bočicu od 1 l i dodati ultra čistu vodu do oznake na bočici.

Za dobijanje modifikovanog Andrewsova medijumuma treba uliti približno 2500 ml ultra čiste vode u odmjernu bočicu od 5 l. Nakon dodavanja po 50 ml svakog matičnog rastvora, 90 % odmjerne bočice treba napuniti ultra čistom vodom i podesiti pH na 5,8.

Zatim treba dodati 150 g rastvorene saharoze (3 % na 5 l) te napuniti odmjernu bočicu ultra čistom vodom do oznake. Naposljetku se hranjiva rastvora ulijeva u Schottove boce od 1 l i tretira u autoklavu na 121 °C 20 minuta.

Tako dobijena hranjiva rastvora može ostati sterilna u frižideru (na 5 – 10 °C) tri mjeseca.

Modifikovani Andrewsov medijumum za ispitivanje toksičnosti u sistemu bez sedimenta

Deseterostruko koncentrovani modifikovani Andrewsov medijumum koji je potreban za dobijanje ispitnih rastvora pravila se od pet odvojeno pripremljenih hranjivih matičnih rastvora iz tabela 1. i 2. s dodatkom 30 % saharoze. Za dobijanje takvog medija treba uliti približno 100 ml ultra čiste vode u odmjernu bočicu od 1 l. Nakon dodavanja po 100 ml svake matične rastvora treba podesiti pH na 5,8. Zatim treba dodati 30 % rastvorene

saharoze (300 g na 1 000 ml) te napuniti odmjernu bočicu ultra čistom vodom do oznake. Hranjiv rastvor uliva u Schottove boce od 0,5 l i tretira u autoklavu na 121 °C 20 minuta.

Tako dobijena deseterostruko koncentrirana hranjiva rastvora može ostati sterilna u frižideru (na 5 – 10 °C) tri mjeseca.

Dodatak 3.

DRŽANJE OSNOVNE KULTURE

U ovom Dodatku opisuje se osnovna kultura klasastog krocnja – *Myriophyllum spicatum* L, podvodne vodene dvosupnice, vrste iz porodice krocanja. Između juna i avgusta njeni sitni ružičasto-bijeli cvjetići izlaze iznad površine vode. Biljke su ukorijenjene u zemljištu sistemom čvrstih rizoma. Mogu se pronaći u cijeloj sjevernoj hemisferi u eutrofičnim, no nezagađenim stajaćim vodama bogatijima kalcijumom i s muljevitim supstratom. Klasasti krocanj bolje uspijeva u slatkim vodama, no može se pronaći i u bočatim vodama.

Za osnovnu kulturu u sistemu bez sedimenta u laboratorijaskim uslovima potrebne su sterilne biljke. Alternativno, ispitni organizmi mogu se pripremiti od nesterilnih biljaka u skladu s ASTM-ovim standardom E 1913-04. Vidjeti u nastavku: ulomak iz ASTM-ova Standardnog vodiča – postupak za uzgoj kulture *Myriophyllum sibiricum* prikupljene u prirodi:

Ako se počinje raditi s nesterilnim biljkama *Myriophyllum sibiricum* prikupljenima u prirodi, treba prikupljati njihove pupove (turione) u jesen. Pupove treba staviti u akvarije od 20 l koji sadrže 5 cm sterilnog sedimenta prekrivenog silikatnim pijeskom ili na primjer materijalom Turface® i 18 l vode odgovarajuće čistoće. Akvarijumi se prozračuju i drže na temperaturi od 15 °C s brzinom protoka od 200 do 300 μmol m^{-2} s^{-1} 16 sati dnevno. Biljne kulture u akvarijumu mogu se držati kao rezervni izvor biljaka u slučaju da sterilne biljne kulture budu uništene zbog mehaničkih neispravnosti u odjeljku za uzgoj kulture, zbog kontaminacije, ili iz drugih razloga. Biljke koje se uzgajaju u akvarijumu nisu sterilne i sterilne kulture ne mogu se držati u šaržnom sistemu za uzgoj kultura. Za sterilizaciju kulture biljke se uklanjaju iz akvarijuma i ispiru u tekućoj dejonizovanoj vodi oko pola sata. Zatim se dezinficiraju u aseptičkim uslovima u komorama sa laminarnim protokom vazduha manje od 20 minuta (dok većina biljnog tkiva ne izbijeli i samo vrh koji raste ostane zelen) u rastvoru s masenim udjelom natrijuma hipohlorita od 3 % i s 0,01 % odgovarajuće površinski aktivne supstanci. Dezinfekciono sredstvo i biljni materijal se miješaju. Segmenti s više nodija prenose se u sterilne epruvete za uzgoj kultura koje sadrže po 45 ml sterilizovanog modifikovanog Andrewsova medijumuma i začepljene su jednostavnim čepovima za epruvete. U svaku ispitnu komoru stavlja se samo jedan biljni segment. Na posude za uzgoj kultura nanosi se laboratorijaski film za brtvljenje. Kad se uspostavi sterilna kultura, biljne segmente koji sadrže više nodija treba prenositi u nove ispitne komore sa svježim tekućim hranjivim medijumumima svakih deset do dvanaest dana. Biljke moraju biti sterilne, što se dokazuje uzgojem kultura na agarnim podlogama, i ostati sterilne osam nedelja prije početka ispitivanja.

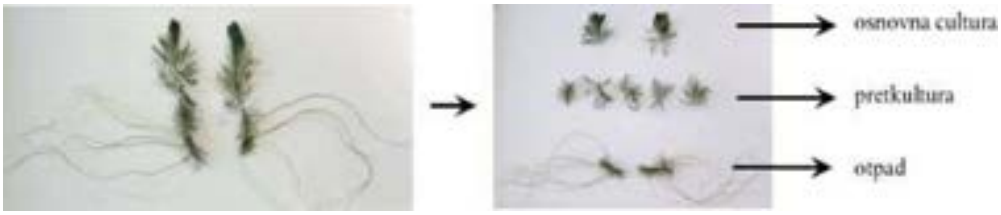
Budući da modifikovani Andrewsov medijumum sadrži saharozu (koja podstiče rast gljivica i bakterija), potrebni su sterilni uslovi za pripremu materijala, držanje rastvora i uzgoj kultura. Sve tečnosti i oprema steriliziraju se prije upotrebe. Sterilizacija se sprovodi tretiranjem zagrijanim vazduhom (210 °C) 4 sata ili tretiranjem u autoklavu 20 minuta na 121 °C. Usto, sve bočice, zdjelice, zdjele i ostala oprema tretiraju se plamenom na sterilnoj radnoj površini neposredno prije upotrebe.

Osnovne se kulture mogu držati na slabijoj svjetlosti i nižoj temperaturi (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C) duže vrijeme bez premještanja. Uzgojni medijumum za krocanj trebao bi biti isti kao onaj koji se upotrebljava za ispitivanje, ali i drugi mediji bogati hranjivim supstancima mogu se upotrebljavati za osnovne kulture.

Biljni segmenti raspoređujju se aksenično u nekoliko Erlenmeyerovih bočica od 500 ml ili/i Fernbachovih bočica od 2 000 ml, od kojih je svaka napunjena s približno 450 odnosno 1 000 ml modifikovanog Andrewsova medijumuma. Zatim se bočice zatvaraju aksenično celuloznim čepom. Osim toga, tretirati opremu plamenom na sterilnoj radnoj površini neposredno prije upotrebe. Biljke treba prenositi u svježu hranjivu rastvor otprilike svaka tri nedelje, zavisi od broja i njihovoj veličini.

Za tu obnovljenu kulturu mogu se upotrebljavati i apeksi i segmenti srednjeg dijela stabljike. Broj i veličina biljaka (ili segmenata biljaka) koje se prenose zavise od toga koliko je biljaka potrebno. Na primjer, može se prenijeti pet dijelova izdanka u Fernbachovu bočicu, a tri dijela u Erlenmeyerovu bočicu; svaki je dio dug 5 cm. Odbacuju se svi dijelovi s korijenima ili cvjetovima.

Slika 1. Rezanje biljaka za osnovnu kulturu i pretkulturu nakon tri nedelja uzgoja.



Kulture biljaka treba uzgajati u Erlenmeyerovim bočicama od 500 ml i Fernbachovim bočicama od 2 000 ml u inkubatoru s hlaĐenjem na 20 ± 2 °C sa stalnom svjetlošću od otprilike 100 – 150 µE m^{-2} s^{-1} ili 6 000 – 9 000 lux (iz izvora sobne rasvjete boje „toplo bijelo svjetlo”).

Slika 2.Uzgoj biljaka u inkubatoru s hlaĐenjem sa sobnom rasvjetom.

Upotrebljavaju se hemijski čiste (kiselinom očišćene) i sterilne staklene uzgojne posude, a pri rukovanju se primjenjuju aseptički postupci. U slučaju zagađenja osnovne kulture npr. algama, gljivicama i/ili bakterijama, treba pripremiti novu kulturu ili upotrijebiti osnovnu kulturu iz druge laboratorijae za obnovu kulture.

Dodatak 4.

DRŽANJE PRETKULTURE I PRIPREMA ORGANIZAMA ZA ISPITIVANJE

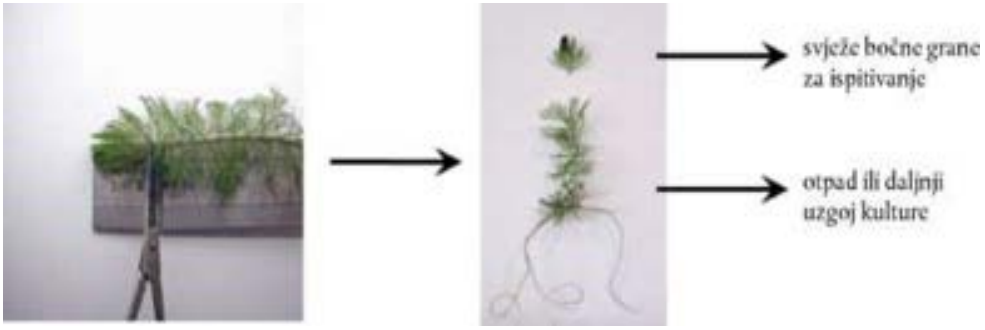
Za dobijanje pretkultura treba izrezati izdanke osnovne kulture u segmente od kojih svaki ima dva pršljena; segmenti se stavljaju u Fernbachove bočice napunjene modifikovanim Andrewsovim medijumumom (s 3 % saharoze). Svaka bočica može sadržati do 50 segmenata izdanka. Ipak, treba paziti da su segmenti vitalni i da nemaju korijenje ni bočne grane ili njihove pupoljke (vidjeti sliku 1. u Dodatku 3.).

Organizmi pretkulture uzgajaju se 14 dana – 21 dan u sterilnim uslovima u komori s izmjeničnim fazama svjetlost/tama od 16/8 sati. Intenzitet svjetlosti izbora se u rasponu 100 – 150 μE m^{-2} s^{-1}. Temperatura u ispitnim posudama trebala bi biti 23 ± 2 °C.

Budući da modifikovani Andrewsov medijumum sadrži saharozu (koja podstiče rast alga, gljivica i bakterija), potrebni su sterilni uslovi za pripremu rastvora ispitivane hemikalije i uzgoj kultura. Sve tečnosti i oprema steriliziraju se prije upotrebe. Sterilizacija se sprovodi tretiranjem zagrijanim vazduhom (210 °C) 4 sata ili tretiranjem u autoklavu 20 minuta na 121 °C. Usto, sve bočice, zdjelice, zdjele i ostala oprema tretiraju se plamenom na sterilnoj radnoj površini neposredno prije upotrebe.

Izdanci se aksenično uklanjaju iz bočica s pretkulturama, pri čemu se bira što homogeniji materijal. Za svako ispitivanje potrebno je najmanje 60 ispitnih organizama (ispitivanje s osam koncentracija ispitivane hemikalije). Za ispitivanje se uzimaju svježe bočne grane iz pretkultura, skraćuju se na 2,5 cm od baze (mjerenje pokretnim mjernim instrumentom) i prenose u čašu sa sterilnim modifikovanim Andrewsovim medijumumom. Te svježe bočne grane mogu se upotrijebiti za ispitivanje toksičnosti klasastog krocnja u sistemu bez sedimenta.

Slika 2. Rezanje biljaka iz pretkulture za ispitivanje toksičnosti na Myriophyllum spicatum u sistemu bez sedimenta.



C.51. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI NA KLASASTOM KROCNJU (*MYRIOPHYLLUM SPICATUM*) U SISTEMU VODA-SEDIMENT

1. Uvod

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 239 (2014.). Dostupne su ispitne metode za plutajuće vodene jednosupnice iz roda *Lemna* i za alge. Te se metode često primjenjuju za prikupljanje podataka o rizicima povezanima s ispitivanim hemikalijama, posebice hemikalijama herbicidnog djelovanja, na neciljane vrste vodenog bilja. Međutim, u nekim slučajevima mogu biti potrebni podaci za dodatne vrste makrofita. U smjernicama koje su nedavno objavljene kao rezultat radionice Društva za toksikologiju i hemiju životna sredinaa (SETAC) o procjeni rizika od pesticida za vodene makrofite (AMRAP) navedeno je da za ispitivane hemikalije mogu biti potrebni podaci za ukorijenjenu makrofitnu vrstu ako je poznato da alge i vrste iz roda *Lemna* nisu osjetljive na način djelovanja predmetne hemikalije ili ako postoji mogućnost raspodjele u sedimentu koja bi dovela do izloženosti apsorpcijom kroz korijen. Na osnovu postojećeg znanja i iskustva *Myriophyllum* spp. odabrane su kao preferirana vrsta u slučajevima kada su potrebni podaci za podvodne ukorijenjene dvosupnice. Ovo ispitivanje ne zamjenjuje druga ispitivanja toksičnosti u vodi, već bi im trebalo biti nadopuna radi cjelovitije procjene opasnosti i rizika za vodene biljke. Ispitivanjem toksičnosti na klasastom krocnju (*Myriophyllum spicatum*) u sistemu voda-sediment nadopunjuje se ispitivanje toksičnosti na klasastom krocnju u sistemu bez sedimenta.

U ovom dokumentu opisuje se ispitna metoda kojom se mogu procijeniti efekti ispitivane hemikalije na ukorijenjenu vodenu biljnu vrstu klasasti krocanj (*Myriophyllum spicatum*) u sistemu voda-sediment. Ispitna metoda djelimično se bazira na postojećim metodama i u

njoj se uzimaju u obzir novija istraživanja povezana s procjenom rizika za vodene biljke. Metoda voda-sediment validovana je međunarodnim međulaboratorijskim testom s vrstama krocnja koje su uzgojene u statičkim uslovima te izložene ispitivanoj hemikaliji u vodenoj koloni. Međutim, ispitni sistem lako
se prilagođava za izlaganje u sedimentu s dodatkom ili izlaganje u vodenoj fazi u polustatičkom sistemu ili sistemu s pulsnim doziranjem, iako te metode nisu formalno ispitane međulaboratorijskim testom. Nadalje, opšta metoda može se primjenjivati i na druge ukorijenjene podvodne i nadvodne vrste, uključujući druge vrste krocnja (npr. *Myriophyllum aquaticum*) i veliku pirevinu (*Glyceria maxima*). Za druge vrste može biti potrebno izmijeniti ispitne uslove, plan i trajanje ispitivanja. Posebno je potrebno dodatno utvrditi odgovarajuće postupke za *Myriophyllum aquaticum*. U ovoj ispitnoj metodi nisu navedene pojedinosti o tim drugim mogućnostima, nego se opisuje standardni pristup za izlaganje *Myriophyllum spicatum* u statičkom sistemu u vodenoj fazi.

Ova ispitna metoda primjenjuje se na supstanci za koje je ispitna metoda validovana (vidjeti pojedinosti u izvještaju o međulaboratorijskom testu), formulacije ili poznate smješe. Ispitivanje na krocnju može se ssprovesti kako bi se ispunio zahtjev za podatke osnovnog stupnja zbog potencijalne raspodjele u sedimentu ili problema povezanih s načinom djelovanja / selektivnošću ispitivane hemikalije. Laboratorijasko ispitivanje na krocnju može biti potrebno i kao dio višenivoiske strategije za preispitivanje mogućih rizika za vodene biljke. U skladu s konkretnim razlogom za sprovođenje ispitivanja odredit će se način izlaganja (u vodi ili sedimentu). Prije primjene ove ispitne metode za ispitivanje smješe namijenjeno u regulatornu svrhu trebalo bi razmotriti mogu li se tom metodom osigurati odgovarajući rezultati za tu svrhu, i zašto.

1.1 Načelo ispitivanja

Ispitivanje je namijenjeno ocjenjivanju efekata hemikalija na vegetativni rast krocnja (*Myriophyllum*) u standardizovanim medijima (voda, sediment i hranjive supstanci). U tu se svrhu vrhovi izdanaka zdravih biljaka bez cvjetova stavljaju u lonce za biljke sa standardizovanim dodatnim sedimentom kojemu se dodaju hranjive supstanci kako bi se osigurao prikladan rast biljaka te se zatim biljke drže u Smartovu i Barkovu medijumu (Dodatak 1.). Nakon perioda potrebnog za formiranje korijena biljke se izlažu nizu ispitnih koncentracija u vodenom koloni. Alternativno, može se simulirati izlaganje u sedimentu dodatkom ispitivane hemikalije dodatnom sedimentu i presađivanjem biljaka u taj sediment s dodatkom. U oba slučaja biljke se zatim drže u kontrolisanim okolnim uslovima 14 dana. Efekti na rast određuju se na osnovu kvantitativnih procjena dužine izdanka, svježe mase i suve mase, kao i kvalitativnih zapažanja simptoma kao što su hloroza, nekroza ili deformacije pri rastu.

Da bi se kvantifikovali efekti hemikalije, rast u ispitnim rastvorima upoređuje se s rastom kontrolnih biljaka te se određuje koncentracija koja uzrokuje određeni postotak (x %) inhibicije rasta i izražava se kao EC_x; „x" može biti bilo koja vrijednost, npr. EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}. Treba napomenuti da su procjene EC_{10} i EC_{20} pouzdane i primjerene samo u ispitivanjima u kojima su koeficijenti varijacije za kontrolne biljke niži od nivoa efekta koji se procjenjuje, tj. za pouzdanu procjenu EC_{20} koeficijent varijacije trebao bi biti < 20 %.

Trebalo bi odrediti prosječnu specifičnu brzinu rasta (na osnovu procjena dužine izdanka, svježe mase izdanka i suve mase izdanka) i prirast (na osnovu povećanja dužine izdanka, svježe mase izdanka i suve mase izdanka) netretiranih i tretiranih biljaka. Na osnovu specifične brzine rasta (r) i prirasta (y) zatim se određuju E_rC_x (npr. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) odnosno E_yC_x (npr. E_yC_{10}, E_yC_{20}, EyC50).

Ako je potrebno, mogu se statistički odrediti i najniža koncentracija s vidljivim efektom (LOEC) i najviša koncentracija bez vidljivog efekta (NOEC) na osnovu procjena prosječnih specifičnih brzina rasta i prirasta.

1.2 Podaci o ispitivanoj hemikaliji

Mora biti raspoloživa analitička metoda odgovarajuće osjetljivosti za kvantifikaciju hemikalija u ispitnom medijumumu.
Za određivanje ispitnih uslova korisno je imati podatke o ispitivanoj hemikaliji kao što su strukturna formula, sastav ako je riječ o supstanci s više sastojaka, UVCB supstanci, smješi ili formulaciji, čistoća, rastvorljivost u vodi, stabilnost u vodi i na svjetlosti, konstanta disocijacije kiseline (pK_a), koeficijent raspodjele oktanol/voda (K_{ow}), ako je dostupan K_d u sedimente, napon pare i biorazgradivost. Rastvorljivost u vodi i napon pare mogu se upotrijebiti za izračunavanje konstante Henryjeva zakona, iz koje se može zaključiti mogu li se u periodu ispitivanja očekivati značajni gubitci ispitivane hemikalije. Ako se mogu očekivati gubitci ispitivane hemikalije, treba ih kvantifikovati i naznačiti dalje mjere za kontrolu takvih gubitaka. Ako podaci o rastvorljivosti i stabilnosti ispitivane hemikalije / ispitivanih hemikalija nisu pouzdani, preporučuje se da se one procijene u uslovima ispitivanja, tj. u uzgojnom medijumu te pri temperaturi i osvjetljenju koji će se upotrebljavati tokom ispitivanja. Napomena: kada se ispituju herbicidi koji izazivaju peroksidaciju ovisnu o svjetlosti, trebalo bi upotrebljavati laboratorijasku rasvjetu s jednakom količinom solarnog ultraljubičastog svjetla kao u prirodnoj sunčevoj svjetlosti.
pH-vrijednost treba mjeriti i prema potrebi prilagođavati u ispitnom medijumumu. Kontrola pHvrijednosti ispitnog medijumuma posebno je važna, npr. pri ispitivanju metala ili hemikalija koje su hidrolitički nestabilne. Dodatne smjernice za ispitivanje hemikalija čija fizičko-hemijska svojstva otežavaju ispitivanje nalaze se u Smjernicama OECD-a.

1.3 Valjanost ispitivanja

Da bi rezultati ispitivanja bili valjani, srednja ukupna dužina izdanaka i srednja ukupna svježa masa izdanaka kontrolnih biljaka trebaju se najmanje udvostručiti u fazi izlaganja. Osim toga, na samim kontrolnim biljkama, na površini sedimenta i u ispitnom medijumu ne smije biti vidljivih znakova hloroze ni zagađenja drugim organizmima kao što su alge i/ili bakterijski filmovi.

Srednji koeficijent varijacije za prirast na osnovu mjerenja svježe mase izdanka (od početka do kraja ispitivanja) u kontrolnim kulturama ne bi trebao prelaziti 35 % među ponovljenim uzorcima.

1.4 Referentna hemikalija

Referentnu hemikaliju (ili više njih), kao što je 3,5-dihlorofenol, koji je upotrijebljen u međulaboratorijskom testu, trebalo bi povremeno ispitati radi provjere uspješnosti ispitnog postupka. Prema podacima iz međulaboratorijaskog testa srednje su vrijednosti EC_{50} 3,5dihlorofenola za različite varijable odgovora između 4,7 i 6,1 mg/l (za pojedinosti o očekivanom intervalu pouzdanosti za te vrijednosti vidjeti izvještaj o međulaboratorijskom testu). Preporučljivo je da se referentna hemikalija ispita barem dvaput godišnje ili, ako se ispitivanje sprovodi rjeđe, istovremeno s glavnim ispitivanjem toksičnosti. Vodič za očekivane vrijednosti EC_{50} 3,5dihlorofenola dostupan je u statističkom izvještaju o međunarodnom međulaboratorijskom testu.

2 Opis metode

Ispitna oprema

Ispitivanje bi trebalo sprovoditi u kontrolisanim uslovima, tj. u uzgojnoj komori, prostoriji ili laboratorijau u kojoj se mogu kontrolisati dužina dana, svjetlost i temperatura (vidjeti „Ispitni uslovi”,). Osnovne kulture treba držati odvojeno od ispitnih posuda.

Za ispitivanje bi trebalo upotrebljavati staklene ispitne posude kao što su akvarijumi ili laboratorijaske čaše; obično se upotrebljavaju staklene laboratorijaske čaše od 2 l (približno 24 cm visoke i 11 cm u prodnosu). Međutim, mogu biti prikladne i veće posude uz uslov da

je voda dovoljno duboka da biljke mogu neograničeno rasti i biti uronjene tokom cijelog ispitivanja.

Biljke se mogu stavljati u sediment u plastičnim ili staklenim loncima za biljke (približno 9 cm u prodnosu, visine 8 cm i volumena 500 ml). Umjesto lonaca mogu se upotrebljavati staklene čaše, koje i imaju prednost u nekim slučajevima (npr. ispitivanje hidrofobnih hemikalija ili hemikalija s visokim K_{ow}).

Veličinu lonca/čaše treba odabrati u skladu s odabranom ispitnom posudom i plana ispitivanja (vidjeti dolje). Ako se primjenjuje plan ispitivanja A (jedan izdanak u loncu, tri lonca u posudi), vjerovatno će biti potrebni manji lonci ili veće posude. Ako se primjenjuje plan ispitivanja B (tri izdanka u loncu, jedan lonac u posudi), lonci i posude trebaju biti odgovarajuće veličine. U svakom slučaju dubina vode trebala bi biti 12 cm iznad vrha sedimenta te bi trebalo zabilježiti podnos površine/volumena sedimenta i površine/volumena vode.

Ispitni organizam

Opšti pristupi opisani u ovoj ispitnoj metodi mogu se primijeniti za ispitivanje niza vodenih biljnih vrsta. Međutim, uslovi izneseni u ovoj ispitnoj metodi prilagođeni su za ispitivanje vrste klasastog krocnja – *Myriophyllum spicatum*. Ta vrsta pripada porodici dvosupnica *Haloragaceae* (krocnji).

Klasasti krocanj (*Myriophyllum spicatum*) podvodna je ukorijenjena vrsta koja uspijeva u vrlo raznolikim uslovima i nalazi se u stajačim i tekućim vodama. Višegodišnja je biljka koja tokom zime ugiba, ostaje samo korijen. Biljke obično slobodno cvjetaju i stvaraju sjemenke iako je vegetativno razmnožavanje pomoću aksilarnih pupoljaka ili dijelova stabljike koji se odvoje prirodno ili zbog djelovanja na biljku često primarna metoda kolonizacije. *Uzgoj kulture ispitnog organizma*

Biljke se mogu dobiti iz prirodnih populacija ili od dobavljača vodenih biljaka. U svakom slučaja treba dokumentovati porijeklo biljaka i provjeriti identitet vrste. Pri prikupljanju klasastog krocnja u prirodi treba posebno pripaziti da se prikuplja odgovarajuća vrsta, posebno u regijama u kojima može hibridizovati s drugim vrstama krocnja *(Myriophyllum*). Biljke koji su bile izložene hemijskim kontaminantima ili su prikupljene iz područja za koje je poznato da su kontaminirana ne bi trebalo upotrebljavati u ovom ispitivanju.

U regijama gdje klasasti krocanj nije lako pronaći tokom zimskih mjeseci može biti potrebno dugoročno držati osnovne kulture u laboratorijaskim uslovima. Osnovne kulture treba držati u uslovima sličnima ispitnim uslovima, iako se mogu smanjiti osvjetljenje i temperatura kako bi rjeđe bilo potrebno održavati kulture (npr. kad za određeni period nisu planirana ispitivanja na krocnju). Uotrebljavati akvarijume i lonce za biljke veće od onih koji se namjeravaju upotrebljavati u ispitivanjima, kako bi bilo dovoljno prostora za širenje. Sastav sedimenta i vode trebao bi biti isti kao onaj koji se namjerava upotrebljavati u ispitivanjima, iako se mogu primijeniti i druge metode obogaćivanja sedimenta (npr. upotreba komercijalnih formulacija za postupno ispuštanje gnojiva).

Na osnovnim biljkama ne bi smjelo biti vidljivih znakova kontaminacije bilo kakvim drugim organizmima, uključujući puževe, vlaknaste alge, gljivice i insekte, npr. jajašca ili larve noćnog leptira *Paraponyx stratiotata* i larve ili odrasle kukce pipe *Eubrychius velutus*. Može biti potrebno isprati biljni materijal u slatkoj vodi kako bi se uklonila vidljiva kontaminacija. Osim toga, trebalo bi nastojati smanjiti kontaminaciju jednoćelijskim algama i bakterijama, iako biljni materijal ne mora biti potpuno sterilan. Osnovne kulture treba nadzirati i prema potrebi presađivati kako bi se izbjegla kontaminacija algama i bakterijama. Ako kontaminacija algama i bakterijama uzrokuje probleme, može pomoći prozračivanje osnovnih kultura.

U svakom slučaju biljke se uzgajaju/aklimatizuju u uslovima koji su slični, ali ne nužno jednaki uslovima u ispitivanju tokom odgovarajućeg perioda (tj. > 2 nedelje) prije njihove upotrebe u ispitivanju.

Osnovne kulture u cvijetu ne upotrebljavaju se u ispitivanju jer brzina vegetativnog rasta uopšteno pada tokom i nakon cvjetanja.

Sediment

U ovom ispitivanju preporučuje se upotrebljavati formulirani sediment opisan u nastavku koji se bazira na dodatom sedimentu iz poglavlja C.28. ovog Priloga. Sediment se priprema kako je opisano u ispitnoj metodi u C.28., osim što se dodaju hranjive supstance kako je opisano u nastavku:

1) 4 – 5 % (suve mase) treseta (u skladu s 2 ± 0,5 % organskog ugljenika) što bliže pHvrijednosti od 5,5 do 6.,0; važno je da se upotrijebi treset u prahu, fino usitnjen (po mogućnosti veličine čestica < 1 mm) i sušen samo na vazduhu;
2) 20 % (suve mase) kaolinske gline (sadržaj kaolinita po mogućnosti više od 30 %);
3) 75 – 76 % (suve mase) kvarcnog pijeska (trebao bi prevladavati fini pijesak, s više od 50
   % čestica između 50 i 200 μm);
4) dodaje se hranjivi vodeni medijumum tako da konačna šarža sedimenta sadrži 200 mg amonijum hlorida i 200 mg natrijuma fosfata po kilogramu suvog sedimenta te da je udio vlage u konačnoj smješi od 30 do 50 %;
5) dodaje se kalcijum karbonat hemijski čistog kvaliteta ($CaCO_3$) kako bi se pH-vrijednost konačne smješe sedimenta podesila na 7,0 ± 0,5.

Porijeklo treseta, kaolinske gline i pijeska mora biti poznato i dokumentovano. Ako je porijeklo nepoznato ili uzrokuje zabrinutost, treba provjeriti da komponente nisu hemijski kontaminirane (npr. teškim metalima, organohlornim jedinjenjima, organofosfornim jedinjenjima).

Suve sastojke sedimenta treba homogeno izmiješati u hranjivi vodeni rastvor u sediment. Vlažni sediment trebalo bi pripremiti najmanje dva dana prije upotrebe kako bi se omogućilo bazira to natapanje treseta i spriječilo plutanje njegovih hidrofobnih čestica na površini kada se sediment prekrije medijem; prije upotrebe vlažni se sediment može skladištiti u mraku.

Za ispitivanje sediment se prenosi u rezervoare odgovarajuće veličine, na primjer u lonce za biljke prečnika prikladnog za staklene posude (površina sedimenta trebala bi prekrivati približno 70 % ili više površine posude). Ako rezervoar ima otvore na dnu, može se umetnuti komad filtar papira kako bi sediment ostao unutar rezervoara. Lonci za biljke pune se sedimentom tako da površina sedimenta bude ravna, nakon čega se pokriva tankim slojem (~ 2 do 3 mm) inertnog materijala kao što je pijesak ili fini pijesak za hortikulturu (ili drobljeni koralj) kako bi sediment ostao na mjestu.

Ispitni medijumum

Za uzgoj kulture klasastog krocnja i ispitivanje na njemu preporučuje se Smartov i Barkov medijumum. Sastav tog medijumuma naveden je u Dodatku 1. pH-vrijednost medija (vodena faza) na početku ispitivanja treba biti između 7,5 i 8,0 za optimalni rast biljaka.

Plan ispitivanja

Za ispitivanje treba upotrijebiti najmanje šest ispitnih posuda kao ponovljenih uzoraka za netretiranu kontrolu i najmanje četiri ispitne posude kao ponovljene uzorke za svaku od najmanje pet koncentracija.

Ako nije potrebno odrediti NOEC, plan ispitivanja može se izmijeniti tako da se poveća broj koncentracija i smanji broj ponovljenih uzoraka po koncentraciji.

Svaka ispitna posuda predstavlja ponovljeni uzorak s tri izdanka. Postoje dvije mogućnosti za uzgoj tri izdanka u svakoj ispitnoj posudi:

— plan ispitivanja A: jedan izdanak u loncu, tri lonca u posudi,

— plan ispitivanja B: tri izdanka u loncu, jedan lonac u posudi,

— drugačiji planovi ispitivanja s jednim izdankom u loncu po ispitnoj posudi prihvatljivi su uz uslov da se broj ponovljenih uzoraka po potrebi prilagodi kako bi se ispunili potrebni kriterijumi valjanosti.

Pojedinačne ispitne posude trebalo bi nasumično rasporediti u grupe za tretiranje. Ispitne posude treba nasumično rasporediti i po prostoru za ispitivanje kako bi se minimizovao uticaj prostornih razlika u intenzitetu svjetlosti i temperaturi.

Koncentracije hemikalije i kontrolne grupe

Koncentracije bi trebale slijediti geometrijski niz; faktor za koji se ispitne koncentracije razlikuju ne bi smio biti veći od 3,2. Prethodna saznanja o toksičnosti ispitivane hemikalije na osnovu ispitivanja za utvrđivanje raspona mogu pomoći u izboru prikladnih ispitnih koncentracija.

Da bi se pri određivanju EC_x obezbijedila primjerena nivo pouzdanosti, EC_x mora biti između najviše i najniže ispitne koncentracije. Na primjer, ako se procjenjuje EC_{50}, najviša ispitna koncentracija trebala bi biti viša od EC_{50}. Ako je vrijednost EC_{50} izvan raspona ispitnih koncentracija, pripadajući intervali pouzdanosti bit će veliki i možda neće biti moguće ispravno ocijeniti statističku prikladnost modela. Upotrebom više ispitnih koncentracija poboljšat će se interval pouzdanosti za dobijenu vrijednost EC_x.

Za određivanje LOEC/NOEC (krajnja tačka po izboru), najniža ispitna koncentracija mora biti dovoljno niska da se rast ne razlikuje značajno od rasta kontrolnih biljaka. Isto tako, najviša ispitna koncentracija trebala bi biti dovoljno visoka da rast bude znatno niži od rasta kontrolnih biljaka. Upotrebom više ponovljenih uzoraka poboljša će se statistička pouzdanost najviše koncentracije bez efekta / analize varijance (ANOVA).

Ispitivanje granične koncentracije

Kad ispitivanje za utvrđivanje raspona ukazuje na to da ispitivana hemikalija nema štetno djelovanje u koncentraciji do 100 mg/l ili do granice svoje rastvorljivosti u ispitnom medijumu, odnosno, ako je riječ o formulaciji, do granice disperzivnosti, može se sprovesti ispitivanje granične koncentracije kako bi se mogli uporediti odgovori kontrolne grupe s odgovorom jedne tretirane grupe (100 mg/l ili koncentracija koja odgovara granici rastvorljivosti, ili 1 000 mg/kg suhog sedimenta). To ispitivanje treba ssprovesti u skladu s opštim načelima standardnog ispitivanja koncentracija-odgovor, s napomenom da se savjetuje povećati minimalni broj ponovljenih uzoraka na šest ispitnih posuda po kontroli i koncentraciji. Rast u kontrolnoj i tretiranoj grupi može se analizirati statističkim testom za poređenje srednjih vrijednosti, npr. Studentovim t-testom.

Ispitni rastvori

Ispitni rastvori se pripremaju razrjeđivanjem matičnog rastvora, koja se priprema rastvaranjem ili disperzijom ispitivane hemikalije u Smartovu i Barkovu medijumu s demineraliziranom (tj. destilovanom ili deioniziranom) vodom (vidjeti Dodatak 1.).

Najviša ispitna koncentracija nije veća od rastvorljivosti ispitivane hemikalije ili, ako je riječ o formulaciji, njene disperzivnosti u ispitnim uslovima.

Za ispitivane hemikalije slabe rastvorljivosti u vodi možda će biti potrebno pripremiti koncentriranu matičnu rastvor ili disperziju hemikalije upotrebljavajući organsko rastvarač ili dispergent kako bi se olakšalo dodavanje tačnih količina ispitivane hemikalije u ispitni

medijumum te ubrzalo njenu disperziju i rastvaranje. Treba svakako nastojati izbjeći upotrebu takvih rastvarača ili dispergenata. Pomoćna rastvarača ili dispergenti koji se upotrijebe ne bi smjeli djelovati fitotoksično. Neka od rastvarača u širokoj upotrebi koja nemaju fitotoksično djelovanje u koncentracijama do 100 µl/l su aceton i dimetilformamid. Ako se upotrebljava rastvarač ili dispergent, treba navesti njegovu konačnu koncentraciju, koju treba svesti na najmanju moguću mjeru (≤ 100 µl/l). U tim uslovima sve tretirane grupe i kontrole (s rastvaračem) trebale bi sadržati istu koncentraciju rastvarača odnosno dispergenta. Netretirani kontrolni ponovljeni uzorci koji ne sadrže rastvarač ili dispergent također su uključeni u plan ispitivanja. Dodatne smjernice o upotrebi dispergenata dostupne su u Smjernicama OECD-a.

2.1 Ispitni postupak

Ispitni postupak varira s obzirom na način primjene ispitivane hemikalije (u vodenoj ili sedimentnoj fazi). Pri izboru načina izlaganja u ispitivanju (statički postupak ili statički postupak s obnavljanjem, voda s dodatkom ili sediment s dodatkom) trebalo bi razmotriti očekivano ponašanje ispitivane hemikalije u sistemu voda-sediment. Sediment s dodatkom ponekad može imati prednost za hemikalije za koje se očekuje znatna raspodjela u sedimentu.

Faza uspostave kulture

Od biljaka odabrane kulture odrežu se vrhovi zdravih izdanaka, tj. bez bočnih izdanaka, dužine 6 cm (± 1 cm). Za plan ispitivanja A (jedan izdanak u loncu, tri lonca u posudi) u svaki lonac sadi se po jedan izdanak. Za plan ispitivanja B (tri izdanka u loncu, jedan lonac u posudi) u svaki lonac sa sedimentom sadi se po četiri do pet vrhova izdanka.

U oba slučaja potrebno je posaditi izdanke u više lonaca kako bi se na početku ispitivanja mogle odabrati jednolike biljke te kako bi bilo rezervnih biljaka koje se mogu upotrijebiti za pregled rasta korijena neposredno prije tretiranja i onih koje se mogu ubrati radi mjerenja biomase i dužine izdanka 0. dan.

Izdanci se sade tako da približno 3 cm, na kojima se nalaze najmanje dva nodija, budu ispod površine sedimenta.

Lonci se zatim prenose u ispitne posude u istim okolnim uslovima kao za fazu izlaganja te se sedam dana drže u Smartovu i Barkovu medijumumu kako bi se počeo razvijati korijen.

Nakon tog perioda nekoliko se biljaka u rezervnim loncima uzima za pregled rasta korijena. Ako nije vidljiv rast korijena (tj. ne vide se vrhovi korijena), fazu uspostave kulture treba produžiti dok ne bude vidljiv rast korijena. Taj se korak preporučuje kako bi se osiguralo da biljke aktivno rastu u vrijeme započinjanja ispitivanja.

Izbor jednolikog biljnog materijala

Za plan ispitivanja A (jedan izdanak u loncu, tri lonca u posudi) jednoliki lonci biraju se prije započinjanja ispitivanja. Za plan ispitivanja B (tri izdanka u loncu, jedan lonac u posudi), suvišne se biljke uklanjaju kako bi ostale tri biljke jednake veličine i izgleda.

Izlaganje u vodenoj fazi

Lonci s biljkama koji su odabrani zbog jednolikosti stavljaju se u ispitne posude kako je određeno u planu ispitivanja. Zatim se u ispitne posude dodaje Smartov i Barkov medijumum. Treba paziti da se izbjegne remećenje sedimenta. Zato se medijumumi mogu dodavati koristeći se lijevkom ili plastičnim diskom za pokrivanje sedimenta dok se medijumum uliva u ispitne posude, uz uslov da se disk ukloni odmah nakon toga. Biljni lonci mogu se staviti u ispitne posude i nakon dodavanja medijumuma. U oba slučaja svježi medijumumi mogu se upotrebljavati na početku faze izlaganja, ako je potrebno, kako bi se

smanjilo potencijalno gomilanje algi i bakterija ili omogućila priprema jedinstvenih šarži ispitnog rastvora među ponovljenim uzorcima.

Prije ili nakon dodavanja medijumuma mjeri se dužina izdanka iznad sedimenta.

Odgovarajuća količina ispitivane hemikalije može se dodati u ispitni medijium prije nego se on doda u ispitne posude. Ispitivana hemikalija može se dodati u medijumum i nakon što je on dodat u ispitne posude. U tom slučaju treba paziti da se ispitivana hemikalija jednoliko rasporedi u cijelom ispitnom sistemu bez remećenja sedimenta. U svakom slučaju na početku ispitivanja bilježi se izgled ispitnog medijumuma (npr. jasan, mutan itd.).

Izlaganje u sedimentu

Sedimenti s dodatkom odabrane koncentracije pripremaju se dodavanjem rastvora ispitivane hemikalije direktno u svježi sediment. Matični rastvor ispitivane hemikalije rastvorene u

dejonizovanoj vodi miješa se s formulisanim sedimentom valjkastim mlinom, miješalicom hrane ili ručnim miješanjem. Ako je ispitivana hemikalija slabo rastvoriva u vodi, može se rastvoriti u što je moguće manjem volumenu prikladnog organskog rastvarača (npr. heksan, aceton ili hloroform). Ta se rastvora zatim miješa s otprilike 10 g finog kvarcnog pijeska po jednoj ispitnoj posudi. Rastvarač se pusti da ispari, a pijesak se zatim miješa s prikladnom količinom sedimenta po ispitnoj laboratorijaskoj čaši. Samo lako ispariva sredstva mogu se upotrebljavati za rastvaranje, dispergiranje ili emulgiranje ispitivane hemikalije. Treba imati na umu da se u završnoj fazi pripreme sedimenta mora uzeti u obzir volumen/masa pijeska s dodatkom ispitivane hemikalije (sediment stoga treba pripremiti s manje pijeska). Ispitivana hemikalija koja se dodaje u sediment mora biti ravnodnosno raspoređena u njemu.

Sediment s dodatkom stavlja se u lonče (kako je opisano). Biljke odabrane zbog jednolikosti i odgovarajućeg sistema korijenja vade se iz lonaca kojima se koristilo u fazi uspostave kulture i presađuju u sediment s dodatkom kako je opisano.

Lonci s biljkama stavljaju se u ispitne posude kako je određeno u planu ispitivanja. Zatim se u ispitne posude dodaje Smartov i Barkov medijumum, oprezno (pomoću lijevka) kako bi se izbjeglo remećenje sedimenta. Prije ili nakon dodavanja medijumuma mjeri se dužina izdanka iznad sedimenta.

Održavanje nivoa vode tokom ispitivanja

Mora se zabilježiti konačni volumen vode i označiti nivo vode na svakoj ispitnoj posudi. Ako tokom ispitivanja voda ispari za više od 10 %, trebalo bi nadomjestiti nivo vode destilovanom vodom. Ako je potrebno, laboratorijaske se čaše mogu lagano pokriti prozirnim pokrovom, npr. prozirnim plastičnim poklopcima, kako bi se smanjilo isparavanje i kontaminacija sporama algi.

Ispitni uslovi

Upotrebljava se toplo ili hladno bijelo fluorescentno svjetlo za osvjetljenje od otprilike 140 (± 20) $\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$ izmjereno kao fotosintetski aktivno zračenje (400 – 700 nm) na površini vode te u ciklusu svjetlost-tama od 16: 8 h. Odstepena od odabranog osvjetljenja u ispitnom prostoru ne bi smjela biti veća od ± 15 %.

Temperatura u ispitnim posudama trebala bi biti 20 ± 2 °C.

pH-vrijednost kontrolnog medijumuma tokom ispitivanja ne bi se smjela povećati za više od 1,5 jedinica. Ipak, zbog odstepena za više od 1,5 jedinica ne dovodi se u pitanje valjanost ispitivanja ako se može dokazati da su zadovoljeni navedeni kriterijumi valjanosti.

Trajanje ispitivanja

Period izlaganja traje 14 dana.

Mjerenja i analitička određivanja

Nakon faze uspostave kulture i neposredno prije tretiranja (tj. 0. dan) rezervne biljke iz pet nasumično odabranih lonaca za plan s tri biljke u loncu ili 15 lonaca za plan s jednom biljkom u loncu izdvajaju se za procjenu dužine izdanka i svježe i suve mase kako je opisano u nastavku.

Za biljke koje se prenose u fazu izlaganja sprovode se sljedeće procjene, kako je prikazano u tabeli 1.:

1) dužina glavnog izdanka, broj bočnih izdanaka i dužina bočnih izdanaka bilježe se barem na kraju perioda izlaganja (14. dan),
2) vizualne procjene zdravlja biljke bilježe se najmanje tri puta tokom perioda izlaganja (npr. 0., 7. i 14. dan),
3) procjene svježe i suve mase izdanaka sprovode se na kraju ispitivanja (14. dan).

Dužina izdanka mjeri se pokretnim mjernim instrumentom. Ako ima bočnih izdanaka potrebno je utvrditi njihov broj i dužinu.

Pri vizualnim procjenama zdravlja biljaka bilježe se izgled biljaka i opšte stanje ispitnog medijumuma. Zapažanja koja je potrebno zabilježiti uključuju:

1) nekrozu, hlorozu i druge promjene boje, npr. pretjerano crvenilo u odnosu na kontrolne biljke,
2) kontaminaciju bakterijama ili algama,
3) anomalije rasta kao što su zaostajanje u rastu, promjene dužine između nodija, deformacije izdanaka/listova, umnožavanje bočnih izdanaka, gubitak listova, gubitak turgora i fragmentacija stabljike,
4) zdravlje korijena procjenjuje se vizualno na kraju ispitivanja uz pažljivo ispiranje sedimenta s korijena kako bi se mogao posmatrati sistem korijena. U nastavku je prijedlog ljestvice za procjenu u odnosu na kontrolne biljke:

— nema korijena
— malo korijena
— srednje razvijen korijen
— vrlo dobro razvijen korijen, slično kontrolnim biljkama.

Svježa masa procjenjuje se na početku i kraju ispitivanja; izdanak se odreže na nivou sedimenta i suši upijajućim materijalom prije vaganja. Treba paziti da se uklone čestice sedimenta koje mogu prionuti uz dno izdanka. Izdanak se zatim stavi u sušionik na otprilike 60 °C i suši do konstantne mase, a zatim se ponovno vaga i bilježi se suva masa.

U tabeli 1. prikazane su minimalne biološke procjene koje je potrebno ssprovesti tokom ispitivanja.

Tabela 1. Plan procjena

Dan nakon tretiranja	*Myriophyllum spicatum*			
	Dužina izdanka, dužina i broj bočnih izdanaka	Vizualne procjene izdanaka	Svježa i suva masa izdanka, vizualna procjena korijenja	pH O_2
0	P	P	P	P

4	—	—	—	—
7	—	P	—	P
14	P	P	P	P
P znači da su tada potrebne procjene — znači da nisu potrebna mjerenja				

Učestalost mjerenja i analitičkih određivanja

Najmanje jedanput dnevno (ili neprekidno, pomoću uređaja za automatsko bilježenje podataka) treba bilježiti temperaturu medijumuma u dodatnoj posudi koja se drži u istim uslovima u uzgojnoj komori, inkubatoru odnosno prostoriji.

pH ispitnog medijumuma i koncentraciju u njemu rastvorenog kiseonika treba provjeriti na početku ispitivanja, najmanje jedanput tokom ispitivanja te na kraju u svim posudama kao ponovljenim uzorcima. Mjerenja bi trebalo sprovoditi uvijek u isto vrijeme dana. Ako se jedna rastvora upotrebljava za pripremu svih ponovljenih uzoraka pojedinih ispitnih koncentracija, dovoljno je jedno mjerenje za svaku takvu rastvor 0. dan.

Osvjetljenje bi trebalo mjeriti u uzgojnoj komori, inkubatoru odnosno prostoriji u tačkama jednakima nivou površine vode. Mjerenja bi trebalo ssprovesti najmanje jedanput na početku ispitivanja ili tokom ispitivanja. Metoda detekcije i mjerenja svjetlosti, posebno vrsta senzora, utjeca će na izmjerenu vrijednost. Sferičnim senzorima (koji reaguju na svjetlost iz svih uglova iznad i ispod mjerne ravnine) i „kosinusnim" senzorima (koji reaguju na svjetlost iz svih uglova iznad mjerne ravnine) daje se prednost u odnosu na usmjerene senzore jer bolje mjere vrijednosti za višetačkasti izvor svjetlosti kakav je ovdje opisan.

Analitička mjerenja ispitivane hemikalije

Pravilna primjena ispitivane hemikalije mora biti potkrijepljena analitičkim mjerenjima koncentracija ispitivane hemikalije.

Uzorke vode za analizu ispitivane hemikalije trebalo bi prikupiti ubrzo nakon početka ispitivanja (tj. na dan primjene za stabilne ispitivane hemikalije ili jedan sat nakon primjene za hemikalije koje nisu stabilne) i na kraju ispitivanja za sve ispitne koncentracije.

Koncentracije u sedimentu i međuprostornoj vodi sedimenta trebalo bi odrediti na početku ispitivanja i na kraju ispitivanja, u najvišoj ispitnoj koncentraciji, osim ako je poznato da su ispitivane hemikalije stabilne u vodi (> 80 % nazivne koncentracije). Možda neće biti potrebno sprovoditi mjerenja u sedimentu i meĐuprostornoj vodi ako je raspodjela ispitivane hemikalije između vode i sedimenta jasno određena u ispitivanju vode/sedimenta u sličnim uslovima (npr.
odnos sedimenta i vode, način uvođenja hemikalije, vrsta sedimenta). Uzorkovanje sedimenta na početku ispitivanja vjerovatno bi negativno uticalo na ispitni sistem. Stoga mogu biti potrebne dodatne tretirane ispitne posude kako bi se olakšala analitička određivanja na početku i kraju ispitivanja. Slično tome, ako se smatra da su potrebne procjene na polovini perioda ispitivanja, tj. 7. dan, a za analize su potrebni veliki uzorci sedimenta koji se ne mogu lako uzeti iz ispitnog sistema, analitička određivanja trebalo bi sprovoditi pomoću dodatnih ispitnih posuda koje su tretirane na isti način kao posude kojima se koristi za biološke procjene.

Za izoliranje meĐuprostorne vode preporučuje se centrifugiranje na, na primjer, 10 000 g i 4 °C 30 minuta. Međutim, ako je dokazano da se ispitana hemikalija ne apsorbuje na filtre,

prihvatljivo je i filtriranje. U nekim slučajevima možda neće biti moguće analizirati koncentracije u međuprostornoj vodi ako je uzorak premalen.

U polustatičkim ispitivanjima (izloženost u vodenoj fazi) kada se očekuje da koncentracija ispitivane hemikalije / ispitivanih hemikalija neće ostati u granicama od 20 % nazivne koncentracije tokom perioda ispitivanja bez obnavljanja ispitnih rastvora, trebalo bi pri svakom obnavljanju uzorkovati i upotrijebljene i svježe pripremljene ispitne rastvore za analize koncentracije ispitivane hemikalije.

Za ispitivanja u kojima izmjerena početna koncentracija ispitivane hemikalije nije u granicama od 20 % nazivne koncentracije, ali ima dovoljno dokaza da su početne koncentracije ponovljive i stabilne (tj. unutar raspona od 80 do 120 % početne koncentracije), hemijska se određivanja mogu sprovoditi samo na najvišoj i najnižoj ispitnoj koncentraciji.

U svakom slučaju određivanje koncentracija ispitivane hemikalije potrebno je ssprovesti samo na jednoj posudi po ispitnoj koncentraciji. Druga je mogućnost za analizu objediniti ispitne rastvore svih ponovljenih uzoraka za svaku koncentraciju.

Ako se može dokazati da se koncentracija ispitivane hemikalije tokom cijelog ispitivanja održavala u granicama od 20 % nazivne ili izmjerene početne koncentracije, analiza rezultata i naknadno izvođenje krajnih tačaka mogu se bazirati na nazivnim ili izmjerenim početnim vrijednostima.

U tim slučajevima koncentracije s efektom trebale bi se bazirati na nazivnim ili izmjerenim koncentracijama vode na početku ispitivanja.

Međutim, ako postoji dokaz da je koncentracija padala (tj. nije se održavala u granicama od 20 % nazivne ili izmjerene početne koncentracije u tretiranom prostoru) tokom ispitivanja, analiza rezultata trebala bi se bazira ti na srednjoj geometrijskoj koncentraciji tokom izlaganja ili modelima kojima se opisuje pad koncentracije ispitivane hemikalije u tretiranom prostoru.

2. 2 Procjena podataka

Kada je potrebno upotrijebiti rastvarač ili dispergent, podaci iz kontrola s rastvaračem i netretiranih kontrola mogu se objediniti radi statističke analize, uz uslov da odgovori kontrola s rastvaračem i netretiranih kontrola nisu statistički značajno različiti.

Varijable odgovora

Svrha ispitivanja je određivanje efekata ispitivane hemikalije na vegetativni rast ispitne vrste pomoću dvije varijable odgovora, prosječne specifične brzine rasta i prirasta, kako slijedi:

Prosječna specifična brzina rasta

Ta varijabla odgovora bazira se na promjenama logaritama ukupne dužine izdanka, ukupne svježe mase i ukupne suve mase izdanka tokom vremena u kontrolama i svim tretiranim grupama. Izračunava se za svaki ponovljeni uzorak svake kontrolne i tretirane grupe. Za svaki ponovljeni uzorak treba izračunati srednju dužinu i masu triju biljaka po ispitnoj posudi (ponovljenom uzorku) te zatim brzinu rasta primjenom sljedeće formule:

$$\mu_{i-j} = \frac{ln\ N_j - ln\ N_i}{t}$$

pri čemu je: μ_{i-j} : prosječna specifična brzina rasta od vremena i do vremena j

N_i : mjerna varijabla u ispitnoj ili kontrolnoj posudi u vremenu i N_j : mjerna varijabla u ispitnoj ili kontrolnoj posudi u vremenu j t : Vremenski period od i do j

U skladu s odgovorima ponovljenih uzoraka treba izračunati srednju vrijednost brzine rasta s procjenama varijance za svaku tretiranu i kontrolnu grupu.

Prosječnu specifičnu brzinu rasta treba izračunati za čitav period ispitivanja (vrijeme „i" u navedenoj formuli označava početak ispitivanja, a vrijeme „j" kraj ispitivanja). Za svaku ispitnu koncentraciju i kontrolu treba izračunati srednju vrijednost prosječne specifične brzine rasta te procjene varijance.

Postotak inhibicije brzine rasta (I_r) tada se može izračunati za svaku ispitnu koncentraciju (tretiranu grupu) prema sljedećoj formuli:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

pri čemu je:% Ir : postotak inhibicije prosječne specifične brzine rasta, μC :

srednja vrijednost μ u kontroli μT : srednja vrijednost μ u tretiranoj grupi

Prirast

Ta varijabla odgovora bazira se na promjenama ukupne dužine izdanka, ukupne svježe mase i ukupne suve mase izdanka tokom vremena u kontrolama i svim tretiranim grupama. Srednji postotak inhibicije prirasta (% Iy) za svaku tretiranu grupu može se izračunati kako slijedi:

$$\%I_y = \frac{b_C - b_T}{b_C}$$

pri čemu je: % I_y : postotak smanjenja prirasta

b_C : konačna biomasa u kontrolnoj grupi umanjena za početnu biomasu b_T : konačna

biomasa u tretiranoj grupi umanjena za početnu biomasu

Prikaz kriva koncentracija-odgovor

Treba izraditi krive koncentracija-odgovor kao prikaz odnosa srednje vrijednosti postotka inhibicije varijable odgovora (I_r ili I_y), izračunanog kako je opisano, i logaritma koncentracije ispitivane hemikalije.

Procjena EC_x

Procjene EC_x (npr. EC_{50}) trebale bi se bazirati i na prosječnoj specifičnoj brzini rasta (E_rC_x) i na prirastu (E_yC_x), a svaka od njih bi se pak trebala bazirati na ukupnoj svježoj masi izdanka, ukupnoj suvoj masi izdanka te ukupnoj dužini izdanka.

Treba napomenuti da vrijednosti EC_x izračunane primjenom tih dviju varijabila odgovora nisu uporedive i tu razliku treba uzeti u obzir pri korištenju rezultata ispitivanja. Uz poštovanje ispitnih uslova ove ispitne metode, vrijednosti EC_x na osnovu prosječne specifične brzine rasta (E_rC_x) u većini će slučajeva biti više od rezultata na osnovu prirasta (E_yC_x) zbog razlike u matematičkoj osnovi tih dva pristupa. Tu razliku ne treba tumačiti kao razliku u osjetljivosti dviju varijabila odgovora; jednostavno je riječ o matematički različitim vrijednostima.

Statistički postupci

Cilj je regresijskom analizom dobiti kvantitativan odnos koncentracija-odgovor. Ako se sprovede linearizaciona transformacija podataka odgovora, npr. u jedinice probit, logit ili Weibullova modela, može se ssprovesti ponderirana linearna regresija; ipak, prednost se daje pokolonama nelinearne regresije kojima se bolje rješavaju neizbježne nepravilnosti podataka i odstepena od pravilnih distribucija. S približavanjem izostanku inhibicije ili potpunoj inhibiciji te se nepravilnosti transformacijom mogu i dodatno povećati te tako

otežati analizu. Treba napomenuti da su standardne metode analize za vrijednosti probit, logit ili Weibull namijenjene kvantalnim podacima (npr. smrtnost ili preživljavanje) i moraju se posebno prilagoditi da bi se mogle primijeniti na podatke o brzini rasta i prirastu. Konkretni postupci za određivanje vrijednosti EC_x iz kontinuiranih podataka mogu se pronaći u literaturi.

Za svaku varijablu odgovora koja se analizira treba izračunati procjene vrijednosti EC_x na osnovu odnosa koncentracija-odgovor. Za svaku procjenu određuju se granice pouzdanosti od 95 %, a valjanost podudaranja podataka odgovora s regresijskim modelom trebalo bi procijeniti grafički ili statistički. Regresijsku analizu treba ssprovesti na osnovu odgovora pojedinačnih ponovljenih uzoraka, a ne na osnovu srednjih vrijednosti tretiranih grupa.

Ako rapoloživi regresijski modeli / regresijske metode nisu prikladni/-e za te podatke, procjene EC_{50} i granice pouzdanosti mogu se dobiti i linearnom interpolacijom sa samonadopunjavanjem („bootstrapping”).

Za procjenu LOEC-a, a time i NOEC-a, potrebno je uporediti srednje vrijednosti tretiranih grupa primjenom tehnika analize varijance (ANOVA). Zatim srednju vrijednost za svaku koncentraciju treba uporediti sa srednjom vrijednošću kontrole primjenom odgovarajućeg testa (npr. Dunnettov ili Williamsov test). Treba provjeriti vrijedi li pretpostavka normalne distribucije i homogenosti varijanci
ANOVA-e. To bi trebalo provjeriti Shapiro-Wilksovim testom (normalna raspodjela) ili Leveneovim testom (homogenost varijanci). Ako pretpostavka normalne raspodjele i homogenosti varijanci nije ispunjena, to se ponekad može ispraviti logaritamskom transformacijom podataka. Ako je heterogenost varijanci i/ili devijacija od normalne raspodjele prevelika i ne može se ispraviti transformacijom, treba razmotriti mogućnost analize metodama kao što su Bonferroni-Welchov ttest, Jonckheere-Terpstrin „step-down” test i Bonferronijev test jednakovrijednosti medijana.

3. Izvještavanje

Izvještaj o ispitivanju sadrži sljedeće podatke: *Ispitivana hemikalija* supstancas jednim

sastojkom:

— fizički izgled, rastvorljivost u vodi i druga relevantna fizičko-hemijska svojstva,

— podaci za hemijsku identifikaciju supstanci, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, oznaka SMILES ili InChI, strukturna formula, čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je praktički izvodivo itd.,

supstanca s više sastojaka, supstanca nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcioni proizvod ili biološki materijal (UVCB supstanca) ili smješa:

— opis (koliko je to moguće) hemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativni udio i relevantna fizičko-hemijska svojstva sastojaka. *Ispitne vrste*

— naučni naziv i porijeklo.

Ispitni uslovi

— trajanje i uslovi faze uspostave kulture,

— ispitni postupak (statički, polustatički, s pulsnim doziranjem),

— datum početka i trajanje ispitivanja,

— ispitni medijumum, tj. sediment i tečni hranjivi medijumum,

— opis plana ispitivanja: komora/prostorija za uzgoj ili laboratorijaa, ispitne posude i pokrovi, količine rastvora, dužina i masa ispitnih biljaka po ispitnoj posudi na početku

ispitivanja, odnos površine sedimenta i površine vode, odnos volumena sedimenta i vode,

— ispitne koncentracije (nazivne odnosno izmjerene, prema potrebi) i broj ponovljenih uzoraka po koncentraciji,

— način pripreme matičnih i ispitnih rastvora, uključujući eventualnu upotrebu rastvarača ili dispergenata,

— temperatura tokom ispitivanja,

— izvor svjetlosti, osvjetljenje ($\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$),

— pH-vrijednosti ispitnih i kontrolnih medijumuma te izgled ispitnih medijumuma na početku i na kraju ispitivanja,

— koncentracije kiseonika,

— metoda analize s odgovarajućim podacima za procjenu kvaliteta (validacione studije, standardne devijacije ili granice pouzdanosti analiza),

— metode određivanja mjernih varijabla, npr. dužine, suve mase, svježe mase, — sva odstepena od ove ispitne metode.

Rezultati

— neobrađeni podaci: dužina izdanaka i masa izdanaka pojedinih biljaka / svih biljaka u pojedinom loncu i druge mjerne varijable u svakoj ispitnoj i kontrolnoj posudi pri svakom posmatranju i analizi u skladu s planom procjena iz tabele 1.,

— srednje vrijednosti i standardne devijacije za svaku mjernu varijablu,

— krive rasta za svaku koncentraciju,

— vrijeme udvostručenja / brzina rasta u kontroli na osnovu dužine i svježe mase izdanka, uključujući koeficijent varijacije za prirast svježe mase, — izračunane varijable odgovora za svaki tretirani ponovljeni uzorak, uključujući srednje vrijednosti i koeficijente varijacije za ponovljene uzorke,

— grafički prikaz odnosa koncentracija-efekat,

— procjene toksičnih krajnjih tačaka za varijable odgovora, npr. EC_{50}, i povezani intervali pouzdanosti, ako se izračunavaju LOEC i/ili NOEC, njihove vrijednosti i statističke metode koje su upotrijebljene za izračun,

— ako se primjenjuje ANOVA, jačina efekta koji se može utvrditi (npr. najmanja značajna razlika),

— svaka stimulacija rasta u bilo kojoj tretiranoj grupi,

— svi vidljivi znaci fitotoksičnosti i zapažanja u ispitnim rastvor,

— rasprava o rezultatima, uključujući i sve uticaje na rezultate ispitivanja nastale uslijed odstepena od ove ispitne metode.

Dodatak 1.

SASTAV SMARTOVA I BARKOVA MEDIJUMUMA

Sastojak	Količina reagensa koji se dodaje u vodu(mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	91,7

$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	69,0
$NaHCO_3$	58,4
$KHCO_3$	15,4
pH (po uspostavljanju ravnoteže sa vazduhom)	7,9
(*1) demineralizovana (tj. destilovana ili dejonizovana) voda.	

C.52. ISPITIVANJE REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI NA PRODUŽENOJ GENERACIJI MEDAKE (MEOGRT)

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 240. U ispitivanju reproduktivne toksičnosti na produženoj generaciji medake (MEOGRT, engl. Medaka Extended One Generation Reproduction Test) opisuje se sveobuhvatna ispitna metoda koja se zasniva na ribama koje su izlagane tokom više generacija kako bi se dobili podaci o ekološkoj opasnosti i procjeni rizika hemikalija, uključujući navodno endokrino disruptivne hemikalije (EDC). Izlaganje u ispitivanju MEOGRT nastavlja se do valjenja (do dvije nedelje nakon oplodnje) u drugoj (F2) generaciji. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se obrazložila korisnost produženja generacije F2 poslije tačke valjenja; trenutno ne postoji dovoljno informacija koje pružaju relevantne uslove ili kriterijume koji zahtijevaju produženje generacije F2. Međutim, ova se ispitna metoda može ažurirati nakon što se razmotre nove informacije i podaci. Na primjer, smjernice o produženju generacije F2 reprodukcijom potencijalno bi mogle biti korisne u određenim okolnostima (npr. hemikalije s velikim potencijalom biokoncentracije ili naznake transgeneracijskih efekata kod drugih taksona). Ova ispitna metoda može se primjenjivati za procjenu potencijalnih hroničnih efekata hemikalija, uključujući potencijalno endokrino disruptivne hemikalije, na ribe. U metodi se najveća važnost pridaje efektima koji su potencijalno relevantni za populaciju (tačnije, štetnim efektima na preživljavanje, razvoj, rast i razmnožavanje) za izračun najviše koncentracije bez vidljivog efekta (NOEC) ili koncentracije s efektom (ECx), iako treba napomenuti da su pristupi u kojima se upotrebljava ECx rijetko primjereni za velike studije ove vrste u kojima povećanje broja ispitnih koncentracija kako bi se omogućilo utvrđivanje željene vrijednosti ECx može biti nepraktično, a može dovesti i do znatne zabrinutosti za dobrobit životinja zbog velikog broja upotrijebljenih životinja. Za hemikalije za koje nije potrebna procjena u više generacija ili za hemikalije koje nisu potencijalno endokrino disruptivne hemikalije mogu biti primjerenije druge ispitne metode. Japanska medaka 1. primjerena je vrsta za upotrebu u ovoj ispitnoj metodi zbog njena kratkog životnog vijeka i mogućnosti utvrđivanja genetskog pola, što se smatra ključnom sastavnicom ove ispitne metode. Specifične metode i krajnje tačke posmatranja opisane u ovoj ispitnoj metodi primjenjive su samo na japansku medaku. Druge riblje vrste manje veličine (npr. zebrica) mogu se prilagoditi sličnom protokolu ispitivanja.

Ovom se ispitnom metodom mjeri nekoliko bioloških krajnjih tačaka. Najveća važnost pridaje se potencijalnim štetnim efektima na parametre koji su relevantni za populaciju, uključujući

preživljavanje, ukupni razvoj, rast i reprodukciju. Potom se, kako bi se pružile mehanističke informacije i poveznica s rezultatima iz drugih vrsta terenskih istraživanja i laboratorijskih studija ako postoje a posteriori dokazi da hemikalija potencijalno djeluje kao endokrini disruptor (npr. androgena ili estrogena aktivnost u drugim testovima i analizama), dobijaju druge korisne informacije mjerenjem mRNA za vitelogenin (vtg) (ili proteina vitelogenina, VTG), fenotipskih sekundarnih polnih obilježja (SSC) koja se odnose na genetski pol te procjenom histopatologije. Treba napomenuti da, ako se ne sumnja u to da su ispitivana hemikalija ili njeni metaboliti endokrino disruptivne hemikalije, možda neće biti potrebno mjeriti te sekundarne krajnje tačke te mogu biti primjerenije studije koje zahtijevaju manje resursa i manji broj životinja (1.). Definicije koje se upotrebljavaju u ovoj ispitnoj metodi navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

Zbog ograničenog broja ispitanih hemikalija i laboratorija uključenih u validaciju ovog poprilično složenog testa predviđa se da će se ispitna metoda revidirati i, prema potrebi, prilagoditi stečenom iskustvu kada za utvrđivanje efekta ovog novog dizajna studije bude dostupan dovoljan broj studija. Podaci se mogu upotrebljavati na petoj nivou OECD-ova konceptualnog okvira za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih hemikalija (3.). Ispitna metoda započinje izlaganjem odraslih riba (generacija F0) ispitivanoj hemikaliji tokom faze reprodukcije. Izlaganje se nastavlja tokom razvoja i reprodukcije u generaciji F1 i valjenja u generaciji F2; stoga test omogućuje da se procijene i strukturni i aktivacijski endokrini putovi. Pri tumačenju krajnjih tačaka povezanih s endokrinim sistemom može se primijeniti pristup snage dokaza.

U ispitivanju treba sudjelovati dovoljno jedinki kako bi se osigurala dovoljna snaga za procjenu krajnjih tačaka relevantnih za reprodukciju (vidjeti Dodatak 3.), uz istovremeno osiguravanje upotrebe najmanjeg broja životinja potrebnog za ispitivanje radi dobrobiti životinja. Zbog velikog broja životinja koje se koriste važno je pažljivo razmotriti potrebu za provedbom ispitivanja u odnosu na postojeće podatke koji možda već sadržiju relevantne informacije o brojnim krajnjim tačkama u ispitivanju MEOGRT. OECD-ov okvir za ispitivanje toksičnosti za ribe može pružiti određene smjernice u tom pogledu.

Ispitna metoda osmišljena je prvenstveno za razlikovanje efekata jedne supstance. Međutim, ako je potrebno ispitivanje smješe, trebalo bi razmotriti hoće li se njime dobiti prihvatljivi rezultati za predviđenu regulatornu svrhu.

Prije započinjanja ispitivanja važno je imati informacije o fizičko-hemijskim svojstvima ispitivane hemikalije, naročito kako bi se omogućilo dobijanje stabilnih RASTVORA hemikalija. Važno je i imati dovoljno osjetljivu analitičku metodu za provjeru koncentracija ispitivane hemikalije.

Ispitivanje započinje izlaganjem polno zrelih mužjaka i ženki (najmanje 12 nedelja nakon oplodnje) u uzgojnim parovima u razdoblju od tri nedelje, tokom kojih se ispitivana hemikalija distribuira u organizmu roditeljske generacije (F0) u skladu s njenim toksikokinetičkim ponašanjem. Jajašca se prikupljaju što bliže prvom danu četvrtog nedelje kako bi se započela generacija F1. Tokom uzgoja generacije F1 (ukupno 15 nedelja) procjenjuju se valjivost i preživljavanje. Osim toga ribe se uzorkuju 9–10 nedelja nakon oplodnje radi razvojnih krajnjih tačaka i mriješćenje se procjenjuje tri nedelje, od 12. do 14. nedelje nakon oplodnje. Generacija F2 započinje se nakon trećeg nedelje procjene reprodukcije i uzgaja se do završetka valjenja.

KRITERIJUMI VALJANOSTI ISPITIVANJA
Primjenjuju se sljedeći kriterijumi za valjanost ispitivanja:

- tokom cijelog ispitivanja koncentracija otopljenog kiseonika trebala bi iznositi ≥ 60 % vrijednosti zasićenosti kiseonikom,
- tokom cijelog trajanja studije srednja temperatura vode treba biti od 24 do 26 °C. Kratka odstepena pojedinačnih akvarija od srednje vrijednosti ne bi trebala biti veća od 2 °C,
- srednja potencijalna plodnost kontrola u svakoj generaciji (F0 i F1) treba biti veća od 20 jajašaca po paru dnevno. Plodnost svih jajašaca koja nastanu tokom procjene treba biti veća od 80 %. Osim toga, 16 parova od 24 preporučena kontrolna uzgojna para (> 65 %) treba proizvesti više od 20 jajašaca po paru dnevno,
- valjivost jajašaca u kontrolama treba biti ≥ 80 % (prosjek) (u svakoj od generacija F1 i F2),
- preživljavanje u kontrolama (F1) nakon valjenja do tri nedelje nakon oplodnje odnosno od tri nedelje nakon oplodnje do usmrćivanja za generaciju F1 (tj. 15 nedelja nakon oplodnje) treba biti ≥ 80 % (prosjek) odnosno ≥ 90 % (prosjek),
- trebali bi postojati dokazi da su se koncentracije ispitivane hemikalije u rastvorini uspješno održavale u rasponu od ±20 % srednjih izmjerenih vrijednosti.
- Kad je riječ o temperaturi vode, iako to nije kriterij valjanosti, ponavljanja u okviru tretiranja ne bi se trebala međusobno statistički razlikovati i ispitne grupe u ispitivanju ne bi se trebale međusobno razlikovati (na osnovu svakodnevnog mjerenja temperature i isključujući kratka odstepena).

Iako se smanjena reprodukcija može uočiti u grupama s većim izlaganjem, reprodukcija bi se trebala odvijati u dovoljnoj mjeri barem u trećoj najvišoj grupi i svim nižim grupama generacije F0 kako bi se napunili inkubatori za valjenje. Nadalje, u trećoj najvišoj grupi i nižim grupama izlaganja u generaciji F1 treba doći do primjerenog preživljavanja embrija kako bi se omogućila procjena krajnjih tačaka na uzorcima riba koje nisu odrasle (vidjeti stavke 36. i 38. te Dodatak

Osim toga, treba doći do barem minimalnog preživljavanja nakon valjenja (~ 20 %) u drugoj najvišoj grupi izlaganja generacije F1. To nisu kriterijumi valjanosti sami po sebi, već preporuke kojima se omogućuje izračun pouzdanih vrijednosti NOEC.

Ako se uoči odstepene od kriterijuma valjanosti ispitivanja, potrebno je razmotriti posljedice u odnosu na pouzdanost rezultata ispitivanja te ta odstepena i razmatranja uključiti u izvještaj o ispitivanju.

OPIS METODE
Oprema

Uobičajena laboratorijska oprema, posebno:
(a) mjerači kiseonika i pH-vrijednosti;
(b) oprema za utvrđivanje tvrdoće i lužnatosti vode;
(c) odgovarajući uređaji za regulaciju temperature i po mogućnosti stalno praćenje;
(d) akvariji izrađeni od hemijski inertnog materijala i odgovarajuće veličine s obzirom na preporučeno punjenje i gustinu nasada (vidjeti Dodatak 3.);
(e) vaga prikladne tačnosti (odnosno tačnost u rasponu od ±0,5 mg).

Voda

Kao ispitna voda može se koristiti svaka voda koja je prikladna za preživljavanje i rast ispitne vrste u dovoljno dugom razdoblju. Ona treba biti stalne kvaliteta tokom perioda ispitivanja. Kako voda za razrjeđivanje ne bi neprimjereno utjecala na rezultat ispitivanja (npr. kompleksiranjem ispitivane hemikalije) ili imala negativan utjecaj na uspješnost uzgojnog jata, potrebno je u određenim razmacima uzimati uzorke na analizu. Mjerenja teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), glavnih aniona i kationa (npr. Ca2+, Mg2+, Na+, K+, Cl-, SO4 2-), pesticida, ukupnog organskog ugljika i suspendujene čvrste supstance treba sprovoditi npr. svakih šest mjeseci ako se zna da je voda za razrjeđivanje relativno stalne kvaliteta. Neka hemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje navedena su u Dodatku 2. pH vode treba biti u području od 6,5 do 8,5, ali tokom jednog ispitivanja ne smije odstupati za više od ±0,5 pH jedinica.

Sistem izlaganja

Nisu utvrđeni dizajn i materijali koji se upotrebljavaju za sistem izlaganja. Za izgradnju ispitnog sistema koji nije kontaminiran tokom prethodnih ispitivanja treba upotrebljavati staklo, nehrđajući čelik ili drugi hemijski inertan materijal. Za potrebe ovog ispitivanja primjeren sistem izlaganja može se sastojati od kontinuiranog protačnog sistema (4., 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11., 12. i 13.).

Ispitne rastvora

Glavnu rastvor ispitivane hemikalije treba uvesti u sistem izlaganja odgovarajućom crpkom. Brzinu protoka glavne rastvora treba kalibrirati u skladu s analitičkom potvrdom ispitnih RASTVORA prije početka izlaganja i tokom ispitivanja periodično volumetrijski provjeravati. Ispitna RASTVORA u svakoj komori primjereno se obnavlja (npr. najmanje pet obnavljanja volumena dnevno do 16 obnavljanja volumena dnevno ili do protoka od 20 ml/min), u zavisnosti o stabilnosti ispitivane hemikalije i kvaliteti vode.
Ispitne rastvora odabranih koncentracija pripremaju se razrjeđivanjem glavne rastvora. Glavnu rastvor trebalo bi po mogućnosti pripremiti jednostavnim miješanjem ili mućkanjem ispitivane hemikalije u vodi za razrjeđivanje mehaničkim sredstvima (npr. miješanjem i/ili tretiranjem ultrazvukom). Za postizanje odgovarajuće koncentracije glavne rastvora mogu se upotrebljavati kolone/sistemi za zasićivanje ili pasivne metode doziranja (14.). Treba nastojati izbjeći rastvarača ili nosače jer: 1. određena rastvarača sama po sebi mogu dovesti do toksičnosti i/ili nepoželjnih ili neočekivanih odgovora; 2. ispitivanje hemikalija iznad njihove rastvorljivosti u vodi (što se često javlja upotrebom rastvarača) može dovesti do pogrešnih utvrđivanja efektovitih koncentracija; 3. upotreba rastvarača u dugoročnim ispitivanjima može dovesti do znatnog stupnja nastanka „biofilma" povezanog s djelovanjem mikroba, što može uticati na okolišne uslove te sposobnost održavanja koncentracija izlaganja i 4. ako ne postoje prošli podaci koji pokazuju da rastvarač ne utiče na ishod studije, upotreba rastvarača zahtijeva tretiranje kontrola s rastvaračem, što ima posljedice u pogledu dobrobiti životinja jer su potrebne dodatne životinje za primjenu ispitivanja. Za hemikalije koje se teško ispituju, rastvarač se može upotrebljavati kao krajnje sredstvo i potrebno je proučiti Smjernicu OECD-a 23 za ispitivanje toksičnosti teških supstanci i smješa u vodi (15.) kako bi se utvrdila najbolja metoda. Izbor rastvarača zavisit će o hemijskim svojstvima ispitivane hemikalije i dostupnosti prošlih podataka o upotrebi rastvarača. Ako se upotrebljavaju rastvarača nosači, uz (negativne) kontrole bez rastvarača (samo voda za razrjeđivanje) treba procijeniti i primjerene kontrole s rastvaračem. Ako se ne može izbjeći upotreba rastvarača i dođe do djelovanja mikroba (nastanak biofilma), preporučuje se evidentiranje/izvještavanje o nastanku biofilma po rezervoaru (najmanje jednom nedeljno)

tokom cijelog ispitivanja. U idealnim uslovima koncentraciju rastvarača u kontroli s rastvaračem i svim ispitnim obradama trebalo bi održavati stalnom. Ako se koncentracija rastvarača ne održava stalnom, najvišu koncentraciju rastvarača u ispitnoj obradi treba upotrijebiti u kontroli s rastvaračem. U slučajevima u kojima se upotrebljava rastvarač nosač najviše koncentracije rastvarača ne bi smjele biti veće od 100 µl/l ili 100 mg/l (15.) i preporučuje se da se koncentracija rastvarača održava što nižom (npr. < 20 µl/l) kako bi se izbjegao mogući efekat rastvarača na krajnje tačke koje se mjere (16.).

Ispitne životinje
Izbor i držanje riba

Ispitna je vrsta japanska medaka Oryzias latipes zbog njena kratkog životnog vijeka i mogućnosti utvrđivanja genetskog pola. Iako se druge riblje vrste manje veličine mogu prilagoditi sličnom protokolu ispitivanja, specifične metode i krajnje tačke posmatranja opisane u ovoj ispitnoj metodi primjenjive su samo na japansku medaku (vidjeti stav 1.). Medaka se lako uzgaja u zatočeništvu; postoje objavljene metode za njenu kulturu (17., 18. i 19.) te su dostupni podaci iz kratkoročnih ispitivanja smrtonosnog djelovanja, ispitivanja u ranim životnim stadijima i ispitivanja cijelog životnog ciklusa (5., 6., 8., 9. i 20.). Sve se ribe drže u fotoperiodu od 16 sati svjetla i osam sati tame. Ribe se hrane živim ličinkama račića Artemia spp. koje se po potrebi mogu dopuniti komercijalno dostupnom hranom u listićima. Komercijalno dostupnu hranu u listićima treba redovno analizirati radi kontaminirajućih supstanci.

Ako se primjenjuje odgovarajuće gospodarenje životinjama, nije potreban specifičan protokol za uzgoj. Na primjer, medake se mogu uzgajati u spremnicima od dvije litre s 240 larvi riba po rezervoaru do četiri nedelje nakon oplodnje, a zatim se mogu uzgajati u spremnicima od dvije litre s deset riba po rezervoaru do osam nedelje nakon oplodnje, kada se raspoređuju u uzgojne parove u spremnicima od dvije litre.
Aklimatizacija i izbor riba

Ispitne ribe treba odabrati iz iste laboratorijske zalihe koja je najmanje dvije nedelje prije ispitivanja aklimatizirana u uslovima kvaliteta vode i osvjetljenja koji su slični ispitnim uslovima (napomena: to period aklimatizacije nije period prije izlaganja in situ). Preporučuje se da se ispitne ribe dobiju iz interne kulture jer je prijevoz odraslih riba stresan i može ometati pouzdano mriješćenje. Ribe treba hraniti ličinkama račića Artemia dvaput dnevno tokom cijelog perioda držanja i tokom faze izlaganja, koje se po potrebi dopunjuju komercijalno dostupnom hranom u listićima. Smatra se da su za početak ovog ispitivanja potrebna najmanje 42 uzgojna para (54 uzgojna para ako je potrebna kontrola s rastvaračem, djelimično zbog nedostatka prošlih podataka kojima se podupire upotreba samo kontrole bez rastvarača) kako bi se osigurala primjerena replikacija. Osim toga, treba provjeriti ima li svaki uzgojni par generacije F0 gene XX-XY (tj. uobičajeni par polnih hromosoma za svaki pol) kako bi se spriječilo moguće uključivanje mužjaka kod kojih se spontano javljaju parovi XX (vidjeti stav 39.).

Tokom faze aklimatizacije treba evidentirati smrtnost riba u kulturi i primijeniti sljedeće kriterijume nakon perioda prilagođavanja od 48 sati:

— smrtnost iznad 10 % populacije kulture u sedam dana prije prijenosa u ispitni sistem: odbacuje se cijela šarža,
— smrtnost od 5 % do 10 % populacije u sedam dana prije prijenosa u ispitni sistem: aklimatizacija se nastavlja još sedam dana nakon perioda aklimatizacije od dvije

nedelje; ako je smrtnost tokom drugih sedam dana veća od 5 %, odbacuje se cijela šarža,

— smrtnost manja od 5 % populacije u sedam dana prije prijenosa u ispitni sistem: šarža se prihvaća.

Ribe se ne smiju liječiti u razdoblju aklimatizacije od dvije nedelje prije ispitivanja ni tokom perioda izlaganja te liječenje treba u potpunosti izbjegavati ako je moguće. Ribe s kliničkim znacima bolesti ne treba koristiti u studiji. Treba voditi evidenciju zapažanja i svih profilaktičkih i terapeutskih liječenja tokom perioda kulture koje prethodi ispitivanju.

Fazu izlaganja treba započeti polno dimorfnom odraslom ribom, kojoj je genetski utvrđen pol, iz laboratorijske grupe reproduktivno zrelih životinja koje se uzgajaju na 25 ± 2 °C. Ribe treba identifikovati kao dokazane rasplodne životinje (tj. dale su žive potomke) tokom nedelje koji prethodi izlaganju. Pojedinačne mase riba po polu u cijeloj grupi koja se koristi u ispitivanju trebale bi se na početku ispitivanja nalaziti u granicama od ±20 % aritmetičke srednje mase istog pola. Prije ispitivanja treba izvagati poduzorak riba radi procjene srednje mase. Treba odabrati ribe starosti od najmanje 12 nedelja nakon oplodnje, mase ≥ 300 mg za ženke i ≥ 250 mg za mužjake.

PLAN ISPITIVANJA

Ispitne koncentracije

Preporučuje se upotreba pet koncentracija hemikalija i kontrole. Pri izboru raspona ispitnih koncentracija treba razmotriti sve izvore informacija, uključujući kvantitativne odnose strukture i djelovanja (QSAR), primjenu analogije s analognim hemikalijama, rezultate ispitivanja riba kao što su analize akutne toksičnosti (poglavlje C.1. ovog Priloga), kratkoročni reprodukcijski test na ribama (poglavlje C.48. ovog Priloga) i druge ispitne metode, npr. poglavlja C.15., C.37., C.41., C.47. i C.49. ovog Priloga (21., 22., 23., 24., 25. i 26.), ako su dostupni, ili, prema potrebi, ispitivanje za utvrđivanje raspona koje može uključivati fazu reprodukcije. Ako je potrebno, ispitivanje za utvrđivanje raspona može se sprovesti u uslovima (kakvoća vode, ispitni sistem, prostor za određeni broj životinja) koji su slični onima koji se upotrebljavaju u konačnom ispitivanju. Ako se mora upotrijebiti rastvarač, a nisu dostupni prošli podaci, može se upotrijebiti ispitivanje za utvrđivanje raspona kako bi se utvrdila prikladnost rastvarača. Najviša ispitna koncentracija ne smije biti viša od rastvorljivosti u vodi, 10 mg/l ili 1/10 koncentracije LC50 u 96 h (27.). Najniža koncentracija trebala bi biti manja od najviše koncentracije za faktor od 10 do 100 puta. Upotrebom pet koncentracija u ovom ispitivanju ne omogućuje se samo mjerenje odnosa između doze i odgovora, već se dobija i najniža koncentracija s vidljivim efektom (LOEC) i NOEC, koji su potrebni za procjenu rizika u nekim regulatornim programima ili nadležnostima. Interval između nominalnih koncentracija ispitivane hemikalije između susjednih nivoa tretiranja obično je ≤ 3,2.

POSTUPAK
Početak ispitivanja

Reproduktivno aktivne odrasle ribe koje se upotrebljavaju za započinjanje generacije F0 ispitivanja izboru se na osnovu dva kriterijuma: dobi (obično više od 12 nedelja nakon oplodnje, ali po mogućnosti ne više od 16 nedelja) i mase (treba biti ≥ 300 mg za ženke i ≥ 250 mg za mužjake).

Parovi ženki i mužjaka koji ispunjavaju prethodne specifikacije premještaju se kao pojedinačni parovi u svaki rezervoar s ponavljanjem, tj. 12 ponavljanja u kontrolama i šest ponavljanja u tretiranjima hemikalijom na početku ispitivanja. Tim se spremnicima nasumično dodjeljuju oznake za tretiranje (npr. T1–T5 i kontrola) i ponavljanje (npr. A–L u kontrolama i A–F u tretiranjima) te se zatim stavljaju u sistem izlaganja s odgovarajućim protokom u svaki rezervoar.

Uslovi izlaganja

Potpuni rezime ispitnih parametara i uslova dostupan je u Dodatku 3. Poštovanje tih specifikacija treba dovesti do kontrolnih riba čije su vrijednosti krajnjih tačaka slične onima navedenima u Dodatku 4.

Rastvoreni kiseonik, pH i temperaturu treba mjeriti u barem jednoj ispitnoj posudi svake ispitne grupe i kontrole tokom ispitivanja. Ta mjerenja, osim temperature, treba obavljati barem jednom nedeljno tokom cijelog perioda izlaganja. Srednja temperatura vode tokom cijelog trajanja studije treba biti od 24 do 26 °C. Temperaturu treba mjeriti svakog dana tokom cijelog perioda izlaganja. pH vode treba biti u području od 6,5 do 8,5, ali tokom jednog ispitivanja ne smije odstupati za više od ±0,5 pH jedinica. Ponavljanja u tretiranju međusobno se ne bi trebala statistički razlikovati i ispitne grupe u ispitivanju ne bi se trebale međusobno razlikovati (na osnovu svakodnevnog mjerenja temperature i isključujući kratka odstepena).

Trajanje izlaganja

U ispitivanju se polno zrele ribe iz generacije F0 izlažu u trajanju od tri nedelje. Četvrtog nedelje, približno na 24. ispitni dan, uspostavlja se generacija F1 i uzgojni parovi generacije F0 humano se usmrćuju te se evidentiraju njihova masa i dužina (vidjeti stav 34.). Nakon toga slijedi izlaganje generacije F1 u trajanju od još 14 nedelja (ukupno 15 nedelja za F1) i generacije F2 tokom dvije nedelje do valjenja. Ukupno trajanje ispitivanja iznosi u prvom redu 19 nedelja (tj. do valjenja generacije F2). Vremenski okvir za ispitivanje prikazan je u tabeli 2. i dodatno detaljno objašnjen u Dodatku 9.

Režim hranjenja

Ribe se mogu hraniti ad libitum račićima Artemia spp. (stari 24 sata, ličinke), koji se po potrebi mogu dopuniti komercijalno dostupnom hranom u listićima. Komercijalno dostupnu hranu u listićima treba redovno analizirati radi kontaminirajućih supstanci, kao što su organohlorni pesticidi, policiklički aromatski ugljovodici (PAH-i), polihlorirani bifenili (PCB-i). Treba izbjegavati hranu s povišenom razinom endokrinološki aktivnih supstanci (tj. fitoestrogena) koje bi mogle dovesti u pitanje odgovor ispitivanja. Nepojedenu hranu i izmet treba prema potrebi uklanjati iz ispitnih posuda, primjerice pažljivim čišćenjem dna svakog akvarija s pomoću sifona. Stranice i dno svakog akvarija isto treba čistiti jednom ili dvaput nedeljno (npr. struganjem s pomoću lopatice). Primjer rasporeda hranjenja dostupan je u Dodatku 5. Količina hrane zasniva se na broju riba po ponavljanju. Stoga se količina hrane smanjuje ako se u ponavljanju javi smrtnost.

Analitička utvrđivanja i mjerenja

Prije početka perioda izlaganja potrebno je osigurati pravilno funkcionišenje sistema dovoda hemikalije. Potrebno je utvrditi sve potrebne analitičke metode, uključujući dostatna

saznanja o stabilnosti hemikalije u ispitnom sistemu. Koncentracije ispitivane hemikalije utvrđuju se u primjerenim razmacima tokom ispitivanja, po mogućnosti barem svakog nedelje u jednom ponavljanju za svaku ispitnu grupu, uz rotaciju ponavljanja iz iste ispitne grupe svakog nedelje.

Brzine protoka sredstva za razrjeđivanje i glavne rastvora treba provjeravati u odgovarajućim razmacima tokom ispitivanja (npr. najmanje tri puta nedeljno). Preporučuje se da se rezultati baziraju na izmjerenim koncentracijama. Međutim, ako je tokom ispitivanja koncentracija ispitivane hemikalije u rastvorini uspješno održavana unutar 20 % srednjih izmjerenih vrijednosti, tada se rezultati mogu bazirati na nominalnim ili izmjerenim vrijednostima. U slučaju hemikalija koje se znatno akumuliraju u ribi, ispitne koncentracije mogu se smanjiti kako ribe rastu. U tim se slučajevima preporučuje da se prilagodi stopa obnavljanja ispitne rastvora u svakoj komori kako bi se ispitne koncentracije održale što stabilnijima.

Zapažanja i izmjerene krajnje tačke

Krajnje tačke koje se mjere uključuju potencijalnu plodnost, plodnost, valjenje, rast i preživljavanje radi procjene mogućih efekata na razni populacije. Svakodnevno treba uočavati i ponašanje te evidentirati svako neuobičajeno ponašanje. Ostale mehanističke krajnje tačke uključuju imunotest za određivanje nivoa hepatičkog vtg mRNA ili proteina VTG (28.), polne fenotipske markere kao što papile na podrepnoj peraji karakteristične za mužjake, histološku ocjenu gonadnog pola te histopatološku ocjenu bubrega, jetre i gonada (vidjeti lista krajnjih tačaka u tabeli 1.). Sve se te specifične krajnje tačke ocjenjuju u kontekstu utvrđivanja genetskog pola jedinke, na osnovu prisustva ili odsustva gena dmy, kojim se određuje muški pol medake (vidjeti stav 41.). Uz to se ocjenjuje i vrijeme mriješćenja. Osim toga, mogu se izvesti jednostavni odnosi fenotipskog pola upotrebom informacija o broju papila na podrepnoj peraji kako bi se pojedinačne medake utvrdile kao fenotipski mužjaci ili ženke. Ne očekuje se da će se ovom ispitnom metodom utvrditi mala odstepena od očekivanog odnosa polova jer relativno mali broj riba po ponavljanju neće osigurati dovoljnu statističku snagu. Isto tako, tokom histopatološke ocjene procjenjuju se gonade i provode se znatno pouzdanije analize za procjenu gonadnog fenotipa u kontekstu genetskog pola.

Primarni je cilj ove ispitne metode ocijeniti efekte ispitivane hemikalije koji su potencijalno relevantni za populaciju. Mehanističke krajnje tačke (VTG, SSC-i i određeni histopatološki efekti na gonade) isto mogu pomoći da se utvrdi posreduje li endokrina aktivnost nekim efektima. Međutim, na te mehanističke krajnje tačke mogu uticati i sistemske i druge toksičnosti. Stoga se mogu detaljno ocijeniti i histopatološki pregledi jetre i bubrega kako bi se pomoglo u boljem razumijevanju mogućih odgovora na mehanističkim krajnjim tačkama. Međutim, ako se ne provode te detaljne ocjene, ipak treba evidentirati velike abnormalnosti koje su slučajno uočene tokom histopatološke ocjene i treba izvijestiti o njima.

Humano usmrćivanje riba

Kod završetka izlaganja generacija F0 i F1 te kada se uzimaju poduzorci riba koje nisu odrasle, ribe treba eutanazirati odgovarajućim količinama rastvora anestetika (npr. trikain-metansulfonat, MS-222 (CAS.886-86-2), 100–500 mg/l) puferiranima s 300 mg/l NaHCO3 (natrijum bikarbonat, CAS.144-55-8) kako bi se smanjilo nadraživanje sluznice. Ako ribe pokazuju znake znatne patnje (vrlo teška patnja i smrt mogu se pouzdano predvidjeti) te se smatra da su na umoru, životinje treba anesteziratи i eutanazirati, a u analizi podataka te se ribe tretiraju kao smrtnost. Ako se riba eutanazira zbog morbiditeta, to treba evidentirati i o

tome treba izvijestiti. Riba se može zadržati radi primjene histopatološke analize u zavisnosti o tome u kojoj se fazi studije eutanazira (fiksiranje ribe za moguću histopatološku analizu).

Rukovanje jajašcima i ličinkama riba
Prikupljanje jajašaca uzgojnih parova radi razmnožavanja sljedeće generacije

Jajašca se prikupljaju prvog dana (ili po potrebi prva dva dana) četvrtog ispitnog nedelje za prelazak s generacije F0 na generaciju F1 te 18. ispitnog nedelje za prelazak s generacije F1 na generaciju F2. Osamnaesti ispitna nedelja odgovara generaciji F1, odraslim ribama 15 nedelja nakon oplodnje. Važno je iz svakog rezervoara ukloniti sva jajašca jedan dan prije početka prikupljanja jajašaca kako bi se osiguralo da su sva jajašca koja se prikupe od uzgojnog para iz istog mrijesta. Nakon mriješćenja ženke medake ponekad nose svoja jajašca blizu otvora dok ih ne polože na supstrat. Ako u rezervoaru nema supstrata, jajašca mogu biti pričvršćena na ženku ili na dnu rezervoara. U zavisnosti o tome gdje se nalaze, jajašca se oprezno uklanjaju sa ženke ili se s pomoću sifona uklanjaju s dna četvrtog ispitnog nedelje generacije F0 i 18. ispitnog nedelje generacije F1. Sva jajašca prikupljena u okviru tretiranja objedinjuju se prije distribucije u inkubacijske komore.

Treba ukloniti filamente jajašaca, koji drže jajašca mrijesta na okupu. Oplođena jajašca (do 20) prikupljaju se od svakog uzgojnog para (jedan par po ponavljanju), objedinjuju se prema tretiranju i sistemno distribuiraju u primjerene inkubacijske komore (dodaci 6. i 7.). Upotrebom kvalitetnog disekcijskog mikroskopa mogu se uočiti znaci rane oplodnje/razvoja kao što su stvaranje fertilizacijske membrane (korion), dioba ćelija koja je u tijeku ili nastanak blastule. Komore inkubatora mogu se staviti u posebne „inkubacijske akvarije” koji se uspostavljaju za svako tretiranje (u tom se slučaju u njima moraju izmjeriti parametri kvaliteta vode i koncentracije ispitivanih hemikalija) ili u akvarij s ponavljanjem u kojem će se držati izvaljene ličinke (npr. eleutero-embrij). Ako je potreban drugi dan prikupljanja (23. ispitni dan), sva jajašca iz oba dana treba objediniti i zatim sistemno raspodijeliti u svako od ponavljanja tretiranja.
Uzgoj jajašaca do valjenja

Oplođena jajašca kontinuirano se protresaju, npr. mjehurićima zraka u inkubatoru jajašaca ili vertikalnim njihanjem inkubatora jajašaca. Smrtnost oplođenih jajašaca (embrija) svakodnevno se provjerava i evidentira. Mrtva jajašca uklanjaju se iz inkubatora (Dodatak 9.). Sedmog dana nakon oplodnje protresanje se zaustavlja ili smanjuje kako bi se jajašca spustila na dno inkubatora. Time se potiče valjenje, do kojeg obično dolazi sljedećeg dana ili za dva dana. Mladunci (mlade ličinke; eleutero-embrij) broje se za svako tretiranje i kontrolu (osnova objedinjenih ponavljanja). Oplođena jajašca koja se ne izvale u razdoblju dvostruko dužem od srednjeg dana valjenja u kontroli (obično 16 ili 18 dana nakon oplodnje) smatraju se neodrživima te se odbacuju.

U svaki se rezervoar s ponavljanjem premješta 12 mladunaca. Mladunci iz inkubacijskih komora objedinjuju se i sistemno distribuiraju u rezervoare s ponavljanjem (Dodatak 7.). To se može obaviti nasumičnim izborom mladunca iz grupe za tretiranje i uzastopnim dodavanjem mladunaca neselektivnim izvlačenjem u akvarij s ponavljanjem. Svaki rezervoar treba da sadrži jednak broj (n = 12) izvaljenih larvi (najviše 20 larvi u svakom rezervoaru). Ako nema dovoljno mladunaca da bi se popunila sva ponavljanja tretiranja, preporučuje se da što više ponavljanja ima 12 mladunaca. Mladuncima se sigurno može rukovati s pomoću staklenih pipeta velikog prodnosa. Svi dodatni mladunci humano se usmrćuju anestetikom. Tokom nekoliko nedelja prije uspostave uzgojnih parova treba evidentirati dan na koji se u svakom ponavljanju uoči prvo mriješćenje.

Uspostava uzgojnih parova
Obrezivanje peraja i utvrđivanje genotipskog pola

Utvrđivanje genotipskog pola rezanjem peraja obavlja se od devetog do desetog nedelje nakon oplodnje (tj. od 12. do 13. ispitnog nedelje za generaciju F1). Sve ribe u rezervoaru anesteziraju se (upotrebom odobrenih metoda, npr. IACUC) i uzima se mali uzorak s leđnog ili trbušnog vrha repne peraje svake ribe kako bi se utvrdio genotipski pol jedinke (29.). Ribe iz ponavljanja mogu se smjestiti u male kaveze (po mogućnosti jedna riba po kavezu) u rezervoaru s ponavljanjem. Umjesto toga, u kavezu se mogu držati dvije ribe ako ih se može razlikovati. Jedna je metoda da se pri uzimanju uzorka tkiva repna peraja različito odreže (npr. leđni ili trbušni vrh).

Genotipski pol medake utvrđuje se identifikovanim i sekvenciranim genom (dmy) koji se nalazi na Y hromosomu. Prisustvo gena dmy ukazuje na jedinku XY bez obzira na fenotip, dok njegovo odsustvo ukazuje na jedinku XX bez obzira na fenotip (30.); (31.). Iz svakog uzorka peraje ekstrahira se deoksiribonukleinska kiselina (DNK), a prisustvo ili odsustvo gena dmy može se utvrditi metodama lančane reakcije polimerazom (PCR).
Utvrđivanje uzgojnih parova

Informacije o genotipskom polu upotrebljavaju se za utvrđivanje uzgojnih parova XX-XY neu zavisnosti o vanjskom fenotipu koji se može izmijeniti izlaganjem ispitivanoj hemikaliji. Na dan nakon utvrđivanja genotipskog pola svake ribe nasumično se izboru dvije ribe XX i dvije ribe XY iz svakog ponavljanja i utvrđuju se dva uzgojna para XX-XY. Ako u ponavljanju ne postoje dvije ribe XX ili dvije ribe XY, primjerene ribe treba uzeti iz drugih ponavljanja u tretiranju. Prioritet je dobiti preporučeni broj ponavljanja uzgojnih parova (12) u svakom tretiranju i u kontrolama (24). Ribe s očiglednim abnormalnostima (problemi s plivaćim mjehurom, deformacije kralježnice, iznimne varijacije u veličini itd.) trebalo bi isključiti pri utvrđivanju uzgojnih parova. Tokom reprodukcijske faze za generaciju F1 svaki rezervoar s ponavljanjem treba da sadrži samo jedan uzgojni par.
Uzorkovanje riba koje nisu odrasle i ocjena krajnjih tačaka

Uzorkovanje riba koje nisu u uzgojnim parovima

Nakon uspostave uzgojnih parova ribe koje nisu odabrane za dalji uzgoj humano se usmrćuju radi mjerenja krajnjih tačaka riba koje nisu odrasle u ispitnim tjednima od 12. do 13. (F1). Isključivo je važno da se s ribama postupa tako da se genotipski pol utvrđen za izbor uzgojnih parova i dalje može povezati s pojedinačnim ribama. Svi prikupljeni podaci analiziraju se u kontekstu genotipskog pola određene ribe. Svaka se riba upotrebljava za različita mjerenja krajnjih tačaka, među ostalim: utvrđivanje stopa preživljavanja juvenilnih riba/riba koje nisu odrasle (od sedmog do 12. ili 13. ispitnog nedelje (F1)), rast u dužinu (standardna dužina može se izmjeriti ako je repna peraja skraćena u svrhu uzorkovanja radi analize genetskog pola). Ukupna dužina može se izmjeriti ako se samo dio repne peraje, leđni ili trbušni, uzorkuje za dmy i tjelesnu masu (tj. mokra masa, osušeno upijajućim materijalom), vtg mRNA (ili VTG) iz jetre i papile na podrepnoj peraji (vidjeti tabele 1. i 2.). Napominje se da su mase i dužine uzgojnih parova potrebne i za izračun srednjeg rasta u ispitnoj grupi.

Uzorkovanje tkiva i mjerenje vitelogenina

Jetra se disecira i treba je spremiti na temperaturu ≤ –70 °C do mjerenja vtg mRNA (ili VTG-a). Rep ribe, uključujući repnu peraju, čuva se u odgovarajućem fiksativu (npr. Davidsonov fiksativ) ili se fotografira tako da se papile na podrepnoj peraji mogu prebrojati u kasnijoj fazi. Po želji se istovremeno mogu uzorkovati i sačuvati i druga tkiva (npr. gonade). Koncentraciju VTG-a u jetri treba kvantifikovati homolognom ELISA tehnikom (vidjeti preporučene postupke za medaku u Dodatku 6. u poglavlju C.48. ovog Priloga). Umjesto toga, Agencija SAD-a za zaštitu okoliša (U.S. EPA) utvrdila je metode za kvantifikaciju vtg mRNA, tj. ekstrakciju mRNA gena vtg I iz uzorka jetre i kvantifikaciju broja kopija gena vtg I (po nanogramu ukupnog mRNA) s pomoću kvantitativne metode lančane reakcije polimerazom (29.). Umjesto utvrđivanja broja kopija gena vtg u kontrolnim i ispitnim grupama, može se upotrijebiti i metoda koja je ekonomičnija i tehnički manje zahtjevna, odnosno utvrđivanje relativne promjene (odnos) u ekspresiji gena vtg I iz kontrolnih i ispitnih grupa.

Sekundarna polna obilježja

U normalnim okolnostima samo polno zreli mužjaci medake imaju papile, koje se razvijaju kao sekundarno polno obilježje na kostima bodlje šipčice određenih podrepnih peraja, što čini potencijalni biomarker za endokrino disruptivne efekte. Metoda brojanja papila na podrepnoj peraji (broj kosti bodlje s papilama) nalazi se u Dodatku 8. Isto tako, broj papila na podrepnoj peraji po jedinki upotrebljava se za kategorizaciju te jedinke kao mužjaka ili ženke prema vanjskom fenotipu u svrhu izračuna jednostavnog odnosa polova po ponavljanju. Medaka s bilo kojim brojem većim od nule definiše se kao mužjak; medaka bez papila na podrepnoj peraji definiše se kao ženka.

Procjena potencijalne i stvarne plodnosti

Potencijalna i stvarna plodnost procjenjuju se od prvog do trećeg ispitnog nedelje kod generacije F0 te od 15. do 17. ispitnog nedelje kod generacije F1. Jajašca se prikupljaju svakodnevno od svakog uzgojnog para 21 uzastopan dan. Jajašca se svakog jutra nježno uklanjaju s ulovljenih ženki i/ili se s pomoću sifona uklanjaju s dna akvarija. I potencijalna i stvarna plodnost svakodnevno se evidentiraju za svaki uzgojni par ponavljanja. Potencijalna plodnost definiše se kao broj izmriještenih jajašaca, a stvarna plodnost se funkcionalno definiše kao broj oplođenih i živih jajašaca u trenutku brojanja. Jajašca treba prebrojati što prije nakon prikupljanja.

Potencijalna plodnost ponavljanja svakodnevno se evidentira kao broj jajašaca po uzgojnom paru koji se analizira preporučenim statističkim pokolonama upotrebom srednjih vrijednosti ponavljanja. Plodnost ponavljanja zbroj je plodnih jajašaca koje proizvede uzgojni par podijeljen zbrojem jajašaca koje proizvede taj uzgojni par. Statistički se plodnost analizira kao odnos po ponavljanju. Valjivost ponavljanja broj je mladunaca podijeljen brojem postavljenih embrija (obično 20). Statistički se valjivost analizira kao odnos po ponavljanju.
Uzorkovanje odraslih riba i ocjena krajnjih tačaka
Uzorkovanje riba u uzgojnim parovima

Nakon 17. ispitnog nedelje (tj. nakon što uspješno započne generacija F2) odrasle ribe iz generacije F1 humano se usmrćuju i ocjenjuju se različite krajnje tačke (vidjeti tabele 1. i 2.). Podrepna peraja slika se radi ocjene papila na podrepnoj peraji (vidjeti Dodatak 8.) i/ili se uklanja rep, neposredno ventralno od kloake, te se on fiksira za kasnije brojenje papila. Po želji se tada može uzorkovati i čuvati dio repne peraje radi provjere genetskog pola (dmy). Po potrebi se može uzeti uzorak tkiva kako bi se ponovila analiza gena dmy radi potvrde genetskog pola određene ribe. Zatim se otvara trbušna šupljina kako bi se omogućila

perfuzija odgovarajućim fiksativima (npr. Davidsonov fiksativ) prije uranjanja cijelog tijela u fiksativ. Međutim, ako se prije fiksiranja sprovodi odgovarajući korak permeabilizacije, ne treba se otvarati trbušna šupljina.

Histopatologija

Svaka se riba histološki ocjenjuje kako bi se utvrdila patologija u gonadnom tkivu (30.; 29.). Kako je navedeno u stavku 33., sistemske ili druge toksičnosti mogu uticati na ostale mehanističke krajnje tačke koje se ocjenjuju u ovoj analizi (tj. VTG, SSC-i i određeni histopatološki efekti na gonade). Stoga se mogu detaljno ocijeniti i histopatološki pregledi jetre i bubrega kako bi se pomoglo u boljem razumijevanju mogućih odgovora na mehanističkim krajnjim tačkama. Međutim, ako se ne provode te detaljne ocjene, ipak treba evidentirati velike abnormalnosti koje su slučajno uočene tokom histopatološke ocjene i treba izvijestiti o njima. Može se razmotriti „silazno očitavanje" od ispitne grupe s najvećim efektom (u u poređenju s kontrolom) do tretiranja kod kojeg nema efekta, ali preporučuje se proučavanje smjernica za histopatologiju (29.). Uzorci se obično obrađuju/seciraju, nakon čega ih tumači patolog. Ako se upotrebljava pristup „silaznog očitavanja", napominje se da se u postupku RSCABS (engl. Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices) primjenjuje očekivanje da će se s povećanjem nivoa doza povećati i biološki efekat (patologija). Stoga će se izgubiti statistička snaga ako se promatra samo jedna visoka doza bez srednjih doza. Taj pristup može biti prihvatljiv ako nije potrebna statistička analiza kako bi se utvrdilo da visoka doza nema efekat. Iz te se ocjene izvodi i fenotip gonada.

Ostala zapažanja

Ispitivanjem MEOGRT dobijaju se podaci koji se mogu upotrijebiti (npr. u pristupu snage dokaza) za istovremeno ocjenjivanje barem dvaju putova nastanka ishoda (AOP-i) koji završavaju narušavanjem reprodukcije: (a) putova kojima posreduje endokrini sistem koji uključuju disrupciju endokrine osi hipotalamus-hipofiza-gonade (HPG, engl. hypothalamus-pituitary-gonadal endocrine axis) i (b) putova koji uzrokuju smanjenje preživljavanja, rasta (dužina i masa) i reprodukcije putem toksičnosti kojom ne posreduje endokrini sistem. Krajnje tačke koje se obično mjere u ispitivanjima hronične toksičnosti kao što su ispitivanje cijelog životnog ciklusa i ispitivanje u ranim životnim stadijima uključene su i u ovo ispitivanje i mogu se upotrebljavati za ocjenu opasnosti koju predstavljaju i načini djelovanja koji nisu posredovani endokrinim sistemom i putovi toksičnosti posredovani endokrinim sistemom. Tokom ispitivanja svakodnevno treba uočavati ponašanje i evidentirati svako neuobičajeno ponašanje. Osim toga, treba evidentirati smrtnost i izračunati preživljavanje do izdvajanja riba (šesti/sedmi ispitna nedelja), preživljavanje od izdvajanja do uzorkovanja riba koje nisu odrasle (od devetog do desetog nedelje nakon oplodnje) i preživljavanje od uspostave parova do uzorkovanja odraslih riba.

*Tablica 1.***Pregled krajnjih tačaka u ispitivanju MEOGRT**

Faza života	Krajnja tačka	Generacija
Embrijon (2 nedelje nakon oplodnje)	Rolanje (% i vrijeme potrebno za rolanje)	F1, F2
Juvenilna riba (4 nedelje nakon oplodnje)	Preživljavanje	F1

Riba koja nije odrasla (9 ili 10 nedelja nakon oplodnje)	Preživljavanje	F1
	Rast (dužina i masa)	
	Vitelogenin (mRNA ili protein)	
	Sekundarna polna obilježja (papile na podrepnoj peraji)	
	Odnos polova prema spoljašnjim obilježjima	
	Vrijeme do 1. mrijesta	
Odrasla riba (12–14 nedelja nakon oplodnje)	Razmnožavanje (potencijalna i stvarna plodnost)	F0, F1
Odrasla riba (15 nedelja nakon oplodnje)	Preživljavanje	F1
	Rast (dužina i masa)	
	Sekundarna polna obilježja (papile na podrepnoj peraji)	
	Histopatologija (gonada, jetra, bubreg)	

VREMENSKI OKVIR

Vremenski okvir za ispitivanje MEOGRT prikazan u tabeli 2. prikazuje ispitivanje. Ispitivanje MEOGRT uključuje četiri nedelje izlaganja odraslih riba generacije F0 i 15 nedelja izlaganja

generacije F1 te period izlaganja za drugu generaciju (F2), do valjenja (dvije nedelje nakon oplodnje). Aktivnosti tokom ispitivanja MEOGRT sažete su u Dodatku 9.

Tabela 2. Izlaganje i vremenski okvir za mjerenje krajnjih tačaka u ispitivanju MEOGRT

Izlaganje i vremenski okvir krajnjih točaka u ispitivanju MEOGRT

F0	1.	2.	3.	4.																
F1				1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.		
F2																		1.	2.	
Ispitni tjedan	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	
Oznaka životne faze					**Embrij**					**Ličinke**					**Juvenilna riba**			**Riba koja nije odrasla**	**Odrasla riba**	
Krajnje točke																				
Potencijalna plodnost	F_0														F_1					
Plodnost	F_0														F_1					
Valjenje					F_1														F_2	
Preživljavanje						F_1						F_1						F_1		
Rast				F_0								F_1						F_1		
Vitelogenin												F_1								
Sekundarni spol												F_1						F_1		
Histopatologija																		F_1		
Ispitni tjedan	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	

- Plan izvođenja pokusa ima sedam skupina ponavljanja
  - pet za tretiranja ispitivanom kemikalijom
  - dva za kontrolna tretiranja (četiri ako se upotrebljava otapalo)
- Plan unutar skupine
  - 12 ponavljanja za reprodukciju, patologiju odraslih riba i SSC (od desetog do 18. tjedna)
  - šest ponavljanja za valjenje, preživljavanje, Vtg te SSC i rast riba koje nisu odrasle (od prvog do devetog tjedna)

SSC: sekundarna spolna obilježja; t.: tjedni;
Vtg: vitelogenin

PODACI I IZVJEŠTAVANJE
Statistička analiza

Budući da se genotipski pol utvrđuje za sve ispitne ribe, podatke treba analizirati posebno za svaki genotipski pol (tj. mužjaci XY i ženke XX). Ako se to ne učini, znatno će se smanjiti statistička snaga bilo kakve analize. Statističke analize podataka trebale bi po mogućnosti poštovati postupke opisane u OECD-ovu dokumentu Sadašnji pristupi u statističkoj analizi podataka o ekotoksičnosti: Smjernice za primjenu. Dodatne smjernice za statističku analizu navedene su u Dodatku 10.

Plan ispitivanja i izbor statističkog testa trebaju omogućiti odgovarajuću snagu za otkrivanje promjena od biološke važnosti na krajnjim tačkama na kojima se izvješćuje o NOEC-u (32.). Izvještavanje o koncentracijama s relevantnim efektom i parametrima može zavisiti o zakonodavnom okviru. Treba utvrditi postotak promjene na svakoj krajnjoj tački koju je važno otkriti ili procijeniti. Plan ispitivanja trebao bi biti osmišljen tako da se to omogući. Nije vjerovatno da će se isti postotak promjene odnositi na sve krajnje tačke ni da će se moći osmisliti izvediv eksperiment koji bi zadovoljio te kriterijume za sve krajnje tačke i stoga je važno usredotočiti se na krajnje tačke koje su bitne za eksperiment pri odgovarajućem planiranju eksperimenta. U Dodatku 10. dostupni su statistički dijagram toka i smjernice koji mogu pomoći u obradi podataka i izboru najprimjerenijeg statističkog testa ili modela za upotrebu. Mogu se primjenjivati i drugi statistički pristupi uz uslov da su naučno opravdani.

Bit će potrebna analiza varijacija u svakom skupu ponovljenih uzoraka primjenom analize varijance ili tabela kontingencije te primjena odgovarajućih metoda statističke analize na osnovu te analize. Za višestruku usporedbu rezultata pojedinačnih koncentracija i kontrola preporučuje se postupak postupnog snižavanja za kontinuirane odgovore (npr. Jonckheere-Terpstraov test). Ako podaci nisu u skladu s monotoničnim odgovorom na koncentraciju, treba upotrijebiti Dunnettov ili Dunnov test (po potrebi nakon primjerene transformacije podataka).

Za potencijalnu plodnost jajašca se broje svakodnevno, ali se mogu analizirati kao ukupan broj jajašaca ili kao ponovljeno mjerenje. U Dodatku 10. navode se pojedinosti o načinu analiziranja te krajnje tačke. Za histopatološke podatke u obliku ocjene ozbiljnosti razvijen je novi statistički test – RSCABS (engl. Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) (33.).

Treba izvijestiti o svim krajnjim tačkama uočenima u tretiranjima hemikalijom koja su znatno različita od odgovarajućih kontrola.
Razmatranja o analizi podataka
Upotreba kompromitirajućih nivoa obrade

Nekoliko efekata uzima se u obzir kako bi se utvrdilo pokazuje li ponavljanje ili cjelokupna obrada očitu toksičnost i je li potrebno ukloniti ih iz analize. Očita toksičnost definiše se kao više od četiri smrtna slučaja u bilo kojem ponavljanju od trećeg do devetog nedelje nakon oplodnje koji se ne mogu objasniti tehničkom pogreškom. Ostali znaci očite toksičnosti uključuju krvarenje, neobična ponašanja, neuobičajene načine plivanja, anoreksiju i bilo koje druge kliničke znake bolesti. Za subletalne znake toksičnosti mogu biti potrebne kvalitativne procjene i uvijek ih je potrebno obaviti u odnosu na kontrolnu grupu s vodom za razrjeđivanje (samo čista voda). Ako je kod tretiranja s najvišim koncentracijama prisutna očita toksičnost, preporučuje se da se ta tretiranja isključe iz analize.

Kontrole s rastvaračem

Upotrebu rastvarača potrebno je uzeti u obzir samo kao krajnje sredstvo, kada se razmotre sve druge opcije prijenosa hemikalije. Ako se upotrebljava rastvarač, tada je potrebno paralelno sprovesti kontrolu s vodom za razrjeđivanje. Na kraju ispitivanja treba procijeniti moguće efekte rastvarača. To se radi statističkom usporedbom kontrolne grupe s rastvaračem i kontrolne grupe s vodom za razrjeđivanje. Najrelevantnije krajnje tačke koje treba razmotriti u toj analizi determinante su rasta (masa) jer na njih mogu uticati opšte toksičnosti. Ako se na tim krajnjim tačkama otkriju znatne razlike između kontrolnih grupa s vodom za razrjeđivanje i s rastvaračem, treba primijeniti stručnu prosudbu kako bi se utvrdilo je li narušena valjanost ispitivanja. Ako se dvije kontrole razlikuju, tretiranja izložena hemikaliji treba usporediti s kontrolom s rastvaračem osim ako je poznato da se prednost daje kontroli s vodom za razrjeđivanje. Ako nema statistički značajne razlike između dviju kontrolnih grupa, preporučuje se da se tretiranja izložena ispitivanoj hemikaliji usporede s objedinjenim kontrolama (kontrolne grupe s rastvaračem i s vodom za razrjeđivanje), osim ako je poznato da se prednost daje samo kontrolnoj grupi s vodom za razrjeđivanje ili s rastvaračem.

Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju trebalo bi da sadrži sljedeće informacije:

Ispitivana hemikalija: fizikalno stanje i po potrebi fizičko-hemijska svojstva,

— podaci za identifikaciju hemikalije.

— Supstanca s jednim sastojkom:
— fizički izgled, rastvorljivost u vodi i druga relevantna fizičko-hemijska svojstva,
— hemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd. (uključujući udio organskog ugljika, prema potrebi).

— supstance s više sastojaka, UVCB supstance i smješe:
— opis (koliko je to moguće) hemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizičko-hemijskih svojstava sastojaka.

Ispitne vrste:
— naučni naziv, soj ako je dostupno, porijeklo, metoda sakupljanja oplođenih jajašaca i kasnije postepene.

Ispitni uslovi:
— fotoperiodi,
— plan ispitivanja (npr. veličina komore, materijal i volumen vode, broj ispitnih komora i ponavljanja, broj mladunaca po ponavljanju),
— način pripreme glavnih RASTVORA i učestalost obnavljanja (ako se koristi sredstvo za rastvaranje, trebalo bi ga navesti zajedno s koncentracijom),
— metoda doziranja ispitivane hemikalije (npr. crpkama, sistemima za razrjeđivanje),
— iskoristivost metode i nazivnih ispitnih koncentracija, granica kvantifikacije, srednje izmjerene vrijednosti i njihove standardne devijacije u ispitnim posudama te metoda kojom su one dobijene i dokazi da se izmjerene vrijednosti odnose na koncentracije ispitivane hemikalije u stvarnoj rastvorini,
— svojstva vode za razrjeđivanje: pH, tvrdoća, temperatura, koncentracija otopljenog kiseonika, rezidualni hlor (ako se mjeri), ukupni organski ugljik (ako se mjeri), suspendovana čvrsta supstanca (ako se mjeri), salinitet ispitnog medija (ako se mjeri) i ostala sprovedena mjerenja,
— nazivne ispitne koncentracije, srednje izmjerene vrijednosti i njihove standardne devijacije,
— kakvoća vode u ispitnim posudama, pH, temperatura (dnevno) i koncentracija otopljenog kiseonika,
— detaljne informacije o hranjenju (npr. vrsta hrane, izvor, količina hrane i učestalost hranjenja).

Rezultati:
— dokazi o usklađenosti kontrola s opštim validacijskim kriterijumima,
— sljedeći podaci za kontrolu (i kontrolu s rastvaračem ako se koristi) i ispitne grupe: valjenje (valjivost i vrijeme potrebno za valjenje) za generacije F1 i F2, preživljavanje nakon valjenja za F1, rast (dužina i tjelesna masa) za F1, genotipski pol i polna diferencijacija (npr. sekundarna polna obilježja na osnovu papila na podrepnoj peraji i gonadna histologija) za F1, fenotipski pol za F1, sekundarna polna obilježja (papile na podrepnoj peraji) za F1, vtg mRNA (ili protein VTG) za F1, histopatološka ocjena (gonade, jetra i bubreg) za F1 i reprodukcija (potencijalna i stvarna plodnost) za F0, F1 (vidjeti tabele 1. i 2.),
— pristup za statističku analizu (regresijska analiza ili analiza varijance) i obrada podataka (primijenjeni statistički testovi ili modeli),
— najviša koncentracija bez vidljivog efekta (NOEC) za svaki ocijenjeni odgovor,
— najniža koncentracija s vidljivim efektom (LOEC) za svaki ocijenjeni odgovor (pri p = 0,05); ECx za svaki ocijenjeni odgovor, ako je primjenjivo, te intervali pouzdanosti

(npr. 90 % ili 95 %) i graf prilagođenog modela primijenjenog za izračun vrijednosti ECx, nagib krive koncentracija – odgovor, formula regresijskog modela, procijenjeni parametri modela i njihove standardne greške,

— sva odstepena od ove ispitne metode i odstepena od kriterijuma prihvatljivosti te razmatranja potencijalnih posljedica na ishod ispitivanja.

Za rezultate mjerenja krajnjih tačaka treba prikazati srednje vrijednosti i njihove standardne devijacije (ako je moguće, i na osnovu ponavljanja i koncentracija).

Dodatak 2. NEKA HEMIJSKA SVOJSTVA PRIHVATLJIVE VODE ZA RAZRJEĐIVANJE

Tvar	Granična koncentracija
Lebdeće čestice	5 mg/l
Ukupni organski ugljik	2 mg/l
Neionizirani amonijak	1 µg/l
Rezidualni hlor	10 µg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	50 ng/l
Ukupni organohlorni pesticidi plus polihlorirani bifenili	50 ng/l
Ukupni organski hlor	25 ng/l
Aluminij	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Krom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Bakar	1 µg/l
Željezo	1 µg/l
Olovo	1 µg/l
Nikal	1 µg/l
Cink	1 µg/l
Kadmij	100 ng/l
Živa	100 ng/l
Srebro	100 ng/l

Dodatak 3.
ISPITNI USLOVI ZA MEOGRT

1.Preporučena vrsta	Japanska medaka (*Oryzias latipes*)
2.Vrsta ispitivanja	Kontinuirano protačno
3.Temperatura vode	Nominalna ispitna temperatura iznosi 25 °C. Srednja temperatura tokom cijelog ispitivanja u svakom spremniku iznosi od 24 do 26 °C.
4.Kvaliteta osvjetljenja	Fluorescentne žarulje (široki spektar i ~ 150 lumena/m^2) (~ 150 lx).
5.Fotoperiod	16 sati svjetla, osam sati tame
6.Masa riba u odnosu na prostor	F0: dvije odrasle ribe po ponavljanju; F1: počinje se s najviše 20 jajašaca (embrija) po ponavljanju, smanjuje se na 12 embrija po ponavljanju pri valjenju i zatim dvije odrasle ribe (uzgojni par XX-XY) od devetog do desetog nedelje nakon oplodnje za reprodukcijsku fazu
7.Najmanji iskoristivi volumen ispitne komore	1,8 l (npr. ispitna komora veličine: 18 x 9 x 15 cm)
8.Izmjene volumena ispitnih rastvorina	Najmanje pet obnavljanja volumena dnevno do najviše 16 obnavljanja volumena dnevno (ili protok od 20 ml/min)
9.Starost ispitnih organizama na početku	F0: > 12 nedelja nakon oplodnje, ali ne preporučuje se više od 16 nedelja nakon oplodnje
10. Broj organizama po ponavljanju	F0: dvije ribe (par mužjaka i ženke); F1: najviše 20 riba

Dodatak 4.

SMJERNICE ZA TIPIČNE KONTROLNE VRIJEDNOSTI

Treba napomenuti da se te kontrolne vrijednosti baziraju na ograničenom broju validacijskih studija i podliježu izmjeni u kontekstu stjecanja novog iskustva.

Rast

Masa i dužina mjere se kod svih riba koje se uzorkuju devet (ili deset) i 15 nedelja nakon oplodnje. Ako se slijedi ovaj protokol, očekuje se da će se devetog nedelje nakon oplodnje dobiti mokra masa od 85 do 145 mg za mužjake i od 95 do 150 mg za ženke. Očekuje se da će se 15. nedelje nakon oplodnje dobiti masa od 250 do 330 mg za mužjake i od 280 do 350 mg za ženke. Iako su moguća znatna odstepena od tih raspona za pojedinačne ribe, srednje kontrolne mase koje su znatno izvan tih raspona, a naročito manje, ukazuju na poteškoće s hranjenjem, kontrolom temperature, kakvoćom vode, bolešću ili bilo kojom kombinacijom tih efekata.

Valjenje

Uspješnost valjenja u kontrolama obično iznosi približno 90 %, ali nisu neuobičajene ni niže vrijednosti od približno 80 %. Uspješnost valjenja manja od 75 % može ukazivati na nedovoljno protresanje jajašaca koja se razvijaju ili nedovoljan oprez pri postepenu s jajašcima, na primjer nepravovremeno uklanjanje mrtvih jajašaca koje je dovelo do gljivične infekcije.

Preživljavanje

Stope preživljavanja do tri nedelje nakon oplodnje od valjenja i nakon tri nedelje nakon oplodnje obično iznose 90 % ili više za kontrole, ali ni niže stope preživljavanja od približno 80 % u ranim fazama života u kontrolama nisu razlog za zabrinutost. Stope preživljavanja u kontrolama manje od 80 % razlog su za zabrinutost i mogu ukazivati na nedovoljno čišćenje akvarija koje je dovelo do gubitka larvi zbog bolesti ili gušenja do kojeg je došlo zbog niskih nivoa otopljenog kiseonika. Smrtnost može biti i posljedica ozljeda tokom čišćenja rezervoara i gubitka larvi zbog odvodnog sistema rezervoara.

Gen za vitelogenin

Iako se apsolutne nivoa ekspresije gena za vitelogenin (vtg) izražene kao kopije/ng ukupnog mRNA mogu znatno razlikovati među laboratorijima zbog postupaka ili instrumenata koji se koriste, odnos za vtg trebao bi biti približno 200 puta veći kod kontrolnih ženki nego kod kontrolnih mužjaka. Nije neuobičajeno da se taj odnos kreće čak i u rasponu od 1 000 do 2 000, ali odnosi manji od 200 sumnjivi su i mogu ukazivati na poteškoće s kontaminacijom uzorka ili poteškoće s korištenim pokolonama i/ili reagensima.

Sekundarna polna obilježja

Kod mužjaka normalni raspon sekundarnih polnih obilježja, koja se definišeju kao ukupan broj segmenata u šipčicama peraje papila na podrepnoj peraji, iznosi od 40 do 80 segmenata od devetog do desetog nedelje nakon oplodnje. Do 15. nedelje nakon oplodnje raspon za kontrolne mužjake treba biti od približno 80 do 120, a 0 za kontrolne ženke. Iz neobjašnjenih razloga u rijetkim slučajevima neki mužjaci ne razviju papile do 9. nedelje nakon oplodnje, ali budući da svi kontrolni mužjaci razvijaju papile do 15. nedelje nakon oplodnje, uzrok je vjerovatno zakašnjeli razvoj. Prisutnost papila kod kontrolnih ženki ukazuje na prisutnost mužjaka XX u populaciji.

Mužjaci XX

Čini se da je normalna osnovna učestalost pojave mužjaka XX u kulturi približno 4 % ili manje na temperaturi od 25 °C, a učestalost se povećava s povećanjem temperature. Treba preduzeti korake za smanjenje udjela mužjaka XX u populaciji. Budući da se čini da učestalost pojave mužjaka XX ima genetsku komponentu te je stoga nasljedna, praćenje matične kulture i osiguravanje da se mužjaci XX ne upotrebljavaju za razmnožavanje matične kulture efektovit je način smanjenja učestalosti pojave mužjaka XX u populaciji.

Aktivnost mriješćenja

Aktivnost mriješćenja u kontrolnim ponavljanjima treba svakodnevno pratiti prije ocjenjivanja potencijalne plodnosti. Kontrolni parovi mogu se kvalitativno ocijeniti kako bi se dokazala aktivnost mriješćenja. Većina kontrolnih parova trebala bi se mrijestiti od 12. do 14. nedelje nakon oplodnje. Ako se do tog trenutka mrijesti malen broj parova, to ukazuje na moguće poteškoće sa zdravljem, zrelošću ili dobrobiti riba.

Potencijalna plodnost
Zdrave medake koje se dobro hrane trebale bi se svakodnevno mrijestiti od 12. do 14. nedelje nakon oplodnje, pri čemu bi trebale proizvoditi od 15 do 50 jajašaca dnevno. Proizvodnja jajašaca za 16 parova od 24 preporučena kontrolna uzgojna para (> 65 %) treba biti veća od 20 jajašaca po paru dnevno i može iznositi čak i 40 jajašaca dnevno. Manji broj jajašaca može ukazivati na nezrele, pothranjene ili nezdrave parove koji se mrijeste.
Plodnost
Postotak plodnih jajašaca za kontrolne parove koji se mrijeste obično je u rasponu od 90 %, a nisu neuobičajene ni veće vrijednosti. Stope plodnosti manje od 80 % za kontrolna jajašca sumnjive su i mogu ukazivati na jedinke koje nisu zdrave ili na uslove uzgoja kulture koji nisu idealni.

Dodatak 5.
PRIMJER REŽIMA HRANJENJA

Primjer režima hranjenja kojim se osiguravaju primjereni rast i razvoj za potporu pouzdanoj reprodukciji prikazan je u Tabeli 1. Odstepena od tog režima hranjenja mogu biti prihvatljiva, ali preporučuje se da ih se ispita kako bi se potvrdilo da dolazi do prihvatljivog rasta i reprodukcije. Kako bi se slijedio predloženi režim hranjenja, prije početka ispitivanja treba utvrditi suhu masu račića Artemia po volumenu tečne kaše račića. To se može napraviti vaganjem utvrđenog volumena tečne kaše račića koja se sušila 24 sata na 60 °C na unaprijed odvaganim pliticama. Kako bi se uzela u obzir masa soli u tekućoj kaši, identičan volumen iste rastvora soli koja se upotrebljava u tekućoj kaši treba sušiti, vagati i oduzeti od mase osušene kaše račića. Umjesto toga račići se mogu filtrirati i isprati destiliranom vodom prije sušenja, čime se uklanja potreba za mjerenjem mase same soli. Te se informacije upotrebljavaju za pretvaranje informacija iz tabele za suhu masu račića Artemia u volumen tečne kaše račića koji se daje ribama. Osim toga, preporučuje se da se alikvoti tečne kaše račića važu svakog nedelje kako bi se potvrdila točna suha masa račića koji se daju kao hrana.
Tabela 1.Primjer režima hranjenja

Vrijeme (nakon valjenja)	Račići Artemia (mg suhe mase po ribi dnevno)
Dan 1.	0,5
Dan 2.	0,5
Dan 3.	0,6
Dan 4.	0,7
Dan 5.	0,8
Dan 6.	1,0
Dan 7.	1,3
Dan 8.	1,7
Dan 9.	2,2
Dan 10.	2,8
Dan 11.	3,5
Dan 12.	4,2
Dan 13.	4,5
Dan 14.	4,8
Dan 15.	5,2
Dani 16.–21.	5,6
Četvrti tjedan	7,7
Peti tjedan	9,0
Šesti tjedan	11,0
Sedmi tjedan	13,5

Dodatak 6.
PRIMJER KOMORE ZA INKUBACIJU JAJAŠACA
Primjer A

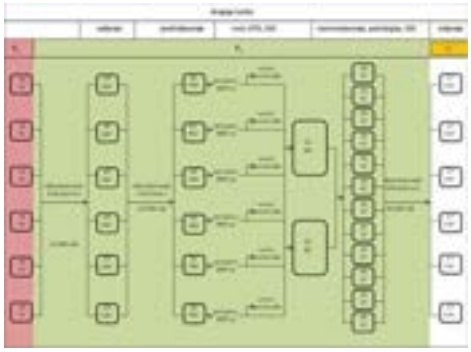
Ovaj se inkubator sastoji od prerezane staklene cijevi centrifuge povezane rukavom od nehrđajućeg čelika, koju drži navojni čep centrifuge. Kroz čep viri malena cijev od stakla ili nehrđajućeg čelika koja je postavljena u blizini zaobljenog dna; ona dovodi mjehuriće zraka kojima se suspendujeju jajašca i smanjuje prijenos saprofitnih gljivičnih infekcija među jajašcima uz istovremeno olakšavanje razmjene hemikalija između inkubatora i rezervoara.

Primjer B

Ovaj inkubator sastoji se od staklene cilindrične osnove (prodnos od 5 cm i visina od 10 cm) i nehrđajuće žičane mreže (0,25 φ i mrežice 32) koja se pričvršćuje na dno osnove PTFE prstenom. Inkubatori se mogu suspendovati na šipkama za podizanje u spremnicima i vertikalno protresati (amplituda od približno pet centimetara) u ciklusu (približno jednom svake četiri sekunde) koji je primjeren za jajašca medake.

Dodatak 7.
SHEMATSKI PRIKAZ ZA OBJEDINJAVANJE I POPUNJAVANJE PONAVLJANJA TOKOM CIJELE ISPITNE METODE MEOGRT

Slika 1.
Objedinjavanje i ponovno popunjavanje ponavljanja tokom cijelog ispitivanja MEOGRT. Slika predstavlja jedno tretiranje ili polovinu kontrole. Zbog objedinjavanja identitet ponavljanja nije kontinuiran tokom cijelog ispitivanja. Napominje se da se izraz „jajašca" odnosi na živa, oplođena jajašca (ekvivalentno embrijima)



Tretiranja i ponavljanje

Za ispitnu metodu preporučuje se pet tretiranja ispitivanom hemikalijom upotrebom materijala tehničkog stupnja čistoće i negativne kontrole. Broj ponavljanja po tretiranju nije isti tokom cijelog ispitivanja MEOGRT te je broj ponavljanja u kontrolnom tretiranju dvostruko veći od bilo kojeg pojedinačnog tretiranja ispitivanom hemikalijom. Kod generacije F0 svako tretiranje ispitivanom hemikalijom ima šest ponavljanja, dok tretiranje negativnom kontrolom ima 12 ponavljanja. Ne preporučuje se upotreba rastvarača, a ako se ona upotrebljavaju, u izvješću o ispitivanju MEOGRT treba obrazložiti i zašto je rastvarač potrebno i izbor specifičnog rastvarača. Isto tako, ako se upotrebljava rastvarač, potrebne su dvije vrste kontrola: a) kontrola s rastvaračem i b) negativna kontrola. Te dvije kontrolne grupe trebale bi se sastojati od cijelog skupa ponavljanja u svim tačkama vremenskog okvira ispitivanja MEOGRT. Ta struktura ponavljanja ostaje ista tokom cijelog razvoja organizama iz generacije F1 (i F2 do valjenja). Međutim, u fazi odraslih riba, kada se uspostave uzgojni

parovi generacije F1, optimalno je da se broj ponavljanja parova za reprodukciju po tretiranju udvostruči; stoga u svakom tretiranju ispitivanom hemikalijom ima do 12 parova ponavljanja, a u kontrolnoj grupi 24 para ponavljanja (i po potrebi još 24 para ponavljanja u kontroli s rastvaračem). Utvrđivanje valjenja i embrija koje su izmrijestili parovi generacije F1 obavlja se prema istoj strukturi ponavljanja kao i za embrije koje su izmrijestili parovi generacije F0, što podrazumijeva prvo šest ponavljanja po tretiranju ispitivanom hemikalijom i 12 ponavljanja u kontrolnim grupama.

Dodatak 8.
BROJANJE PAPILA NA PODREPNOJ PERAJI

Glavni materijali i reagensi

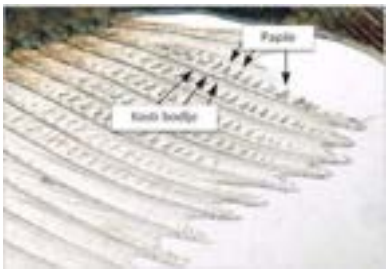
— Disekcijski mikroskop (s pričvršćenom kamerom koja nije obvezna)

— Fiksativ (npr. Davidsonov fiksativ (ne preporučuje se Bouinov fiksativ)), ako se ne broji sa slike

Postupci

Nakon nekropsije treba slikati podrepnu peraju kako bi se omogućilo praktično brojanje papila na podrepnoj peraji. Iako je slikanje preporučena metoda, podrepna peraja može se fiksirati Davidsonovim fiksativom ili drugim odgovarajućim fiksativom približno jednu minutu. Važno je tokom fiksacije držati podrepnu peraju ravnom kako bi se omogućilo lakše brojanje papila. Truplo s podrepnom perajom može se čuvati u Davidsonovu fiksativu ili drugom odgovarajućem fiksativu do analize. Broji se broj kosti bodlje (vidjeti sliku 1.) s papilama koje vire na stražnjem dijelu kosti bodlje.

Slika 1.
Papile na podrepnoj peraji



Dodatak 9.
DETALJAN VREMENSKI OKVIR ISPITIVANJA MEOGRT
1.–3. ispitna nedelja (F0)

Ribe iz generacije F0 koje se mrijeste i koje su ispunile kriterijume za izbor (vidjeti stavke od 16. do 20.) izlažu se tri nedelje kako bi se omogućilo izlaganje gameta i gonadnih tkiva u razvoju ispitivanoj hemikaliji. U svaki se rezervoar s ponavljanjem stavlja jedan uzgojni par riba (uzgojni par ženke XX i mužjaka XY). Izmriješćena jajašca prikupljaju se, broje i procjenjuje se njihova plodnost tokom 21 uzastopnog dana, počevši od prvog ispitnog dana.

4. ispitna nedelja (F0 i F1)

Preporučuje se da se oplođena i živa jajašca (embriji) prikupljaju istog dana; međutim, ako nema dovoljno embrija, mogu se prikupljati tokom dva dana. Ako se prikupljaju dva dana, svi embriji u tretiranjima koji su prikupljeni prvog dana objedinjuju se s onima koji su prikupljeni

drugog dana. Zatim se svi objedinjeni embriji za svako tretiranje nasumično raspodjeljuju u sve inkubatore ponavljanja tako da u svakom inkubatoru bude 20 embrija. Smrtnost oplođenih jajašaca (embrija) svakodnevno se provjerava i evidentira. Mrtva jajašca uklanjaju se iz inkubatora (na smrt oplođenih jajašaca može ukazivati, posebno u ranim stadijima, vidan gubitak prozirnosti i promjena boje zbog koagulacije i/ili taloženja proteina, što rezultira bjelkasto-mutnim izgledom; OECD 2010.).

Napomena: ako je za jednokratno tretiranje potreban drugi dan prikupljanja, kod svih se tretiranja (uključujući kontrole) mora poštovati taj postupak. Ako nakon drugog dana prikupljanja u tretiranju nema dovoljno embrija da bi se napunilo 20 embrija po inkubatoru, broj embrija kojima se pune inkubatori treba smanjiti na 15. Ako nema dovoljno embrija da bi se napunilo 15 embrija po inkubatoru, treba smanjiti broj ponavljanja inkubatora tako da bude dovoljno embrija za 15 embrija po inkubatoru. Osim toga, moglo bi se dodati više uzgojnih parova po tretiranju i kontrolama u generaciji F0 kako bi se dobilo više jajašaca i dosegao preporučeni broj od 20 jajašaca po ponavljanju.

Uzgojni parovi generacije F0 humano se usmrćuju 24. ispitnog dana te se evidentiraju njihova masa i dužina. Uzgojni parovi generacije F0 po potrebi se mogu držati još jedan ili dva dana kako bi se ponovno započela generacija F1.

5.–6. ispitna nedelja (F1)

Od jednog do dva dana prije predviđenog početka valjenja, treba zaustaviti ili smanjiti protresanje jajašaca koja se inkubiraju kako bi se ubrzalo valjenje. Budući da se embriji vale svakog dana, mladunci se objedinjuju prema tretiranju i sistemno raspodjeljuju u svaki rezervoar s ponavljanjem za ličinke u okviru specifičnog tretiranja s najviše 12 mladunaca. To se obavlja nasumičnim izborom mladunaca i stavljanjem pojedinačnih mladunaca u uzastopna ponavljanja neselektivnim izvlačenjem, krećući se redom kroz specifična ponavljanja tretiranja dok sva ponavljanja u okviru tretiranja ne budu imala 12 mladunaca. Ako nema dovoljno mladunaca da se popune sva ponavljanja, treba osigurati da što više ponavljanja ima 12 mladunaca da bi se započela faza F1.
Jajašca koja se ne izvale u razdoblju dvostruko dužem od srednjeg dana valjenja u kontroli smatraju se neodrživima te se odbacuju. Evidentira se broj mladunaca i računa se uspješnost valjenja (valjivost) u svakom ponavljanju.

7.–11. ispitna nedelja (F1)

Preživljavanje larvi riba svakodnevno se provjerava i evidentira u svim ponavljanjima. Evidentira se broj preživjelih riba u svakom ponavljanju 43. ispitnog dana te početni broj mladunaca koji su stavljeni u ponavljanje (najbolje dvanaest). To omogućuje izračun postotka preživljavanja od valjenja do faze riba koje nisu odrasle.

12. ispitna nedelja (F1)

Od 78. do 85. ispitnog dana uzima se mali uzorak s repne peraje svake ribe kako bi se utvrdio genotipski pol jedinke (tj. obrezivanje peraja) za sve ribe. Te se informacije koriste za utvrđivanje uzgojnih parova.
U roku od tri dana od utvrđivanja genotipskog pola svake ribe, nasumično se utvrđuje 12 uzgojnih parova po tretiranju i 24 para po kontroli. Dvije ribe XX i XY iz svakog ponavljanja nasumično se izboru i objedinjuju prema polu te se zatim nasumično izboru za uspostavu uzgojnog para (tj. par XX-XY). Uspostavlja se najmanje 12 ponavljanja po tretiranju

hemikalijom i najmanje 24 ponavljanja za kontrolu s jednim uzgojnim parom po ponavljanju. Ako u ponavljanju ne postoje dvije ribe XX ili dvije ribe XY koje su dostupne za objedinjavanje, ribe s genotipom odgovarajućeg pola treba uzeti iz drugih ponavljanja u tretiranju.
Preostale ribe (najviše osam riba po ponavljanju) humano se usmrćuju i uzorkuju za različite krajnje tačke riba koje nisu odrasle. Podaci o genu dmy (XX ili XY) za sve uzorke riba koje nisu odrasle zadržavaju se kako bi se osiguralo da se svi podaci o krajnjim tačkama mogu povezati s genetskim polom svake pojedinačne ribe.
13.–14. ispitna nedelja (F1)
Izlaganje se nastavlja kako se uzgojni parovi riba koje nisu odrasle razvijaju u odrasle ribe.
Na 98. ispitni dan (tj. dan prije početka prikupljanja jajašaca) jajašca se uklanjaju i iz akvarija i sa ženki.
15.–17. ispitna nedelja (F1)
Izmriješćena jajašca prikupljaju se svakodnevno 21 uzastopan dan u svakom ponavljanju te se procjenjuju u pogledu potencijalne i stvarne plodnosti.
18. ispitna nedelja (ponavljanje 4. ispitnog nedelje) (F1 i F2)
Na 120. ispitni dan prikupljanje jajašaca obavlja se ujutro u svakom rezervoaru s ponavljanjem. Procjenjuju se prikupljena jajašca te se oplođena jajašca (uklonjeni filamenti) od svakog uzgojnog para objedinjuju prema tretiranju i sistemno distribuiraju u komore inkubatora jajašaca s 20 oplođenih jajašaca po inkubatoru. Inkubatori se mogu staviti u posebne „rezervoare inkubatora" uspostavljene za svako tretiranje ili u rezervoar s ponavljanjem u kojem će se ličinke držati nakon valjenja. Preporučuje se da se embriji prikupljaju istog dana; međutim, ako nema dovoljno embrija, mogu se prikupljati tokom dva dana. Ako se prikupljaju dva dana, svi embriji u tretiranjima koji su prikupljeni prvog dana objedinjuju se s onima koji su prikupljeni drugog dana. Zatim se svi objedinjeni embriji za svako tretiranje nasumično raspodjeljuju u sve inkubatore ponavljanja tako da u svakom inkubatoru bude 20 embrija. Napomena: ako je za jednokratno tretiranje potreban drugi dan prikupljanja, kod svih se tretiranja (uključujući kontrole) mora poštovati taj postupak. Ako nakon drugog dana prikupljanja u tretiranju nema dovoljno embrija da bi se napunilo 20 embrija po inkubatoru, broj embrija kojima se pune inkubatori treba smanjiti na 15. Ako nema dovoljno embrija da bi se napunilo 15 embrija po inkubatoru, treba smanjiti broj ponavljanja inkubatora tako da bude dovoljno embrija za 15 embrija po inkubatoru.

Na 121. ispitni dan (ili 122. ispitni dan, kako bi se osiguralo da se generacija F2 dobro započne) uzgojni parovi generacije F1 humano se usmrćuju i analiziraju u pogledu krajnjih tačaka odraslih riba. Uzgojni parovi generacije F1 po potrebi se mogu držati još jedan ili dva dana kako bi se ponovno započela generacija F2.

19.–20. ispitna nedelja (F2)

Od jednog do dva dana prije predviđenog početka valjenja, treba zaustaviti ili smanjiti protresanje jajašaca koja se inkubiraju kako bi se ubrzalo valjenje. Ako ispitivanje završi dovršetkom valjenja generacije F2, mladunci se evidentiraju i odbacuju (embriji koji se ne izvale nakon produženog vremena inkubacije, koje se definiše kao period dvostruko duže od srednjeg dana valjenja u kontroli, smatraju se neodrživima).

Dodatak 10.
STATISTIČKA ANALIZA

Vrste bioloških podataka koji nastanu u ispitivanju MEOGRT nisu jedinstveni za to ispitivanje i, osim za patološke podatke, razvijene su mnoge primjerene statističke metodologije za

pravilnu analizu sličnih podataka u zavisnosti o značajkama podataka, među ostalim, normalnosti, homogenosti varijance, omogućuje li plan studije ispitivanje hipoteza ili regresijsku analizu, parametrijska ispitivanja u odnosu na neparametrijska itd. Generalno, u predloženim statističkim metodama poštuju se preporuke OECD-a za podatke o ekotoksičnosti (OECD, 2006.), a na slici 2. može se vidjeti grafikon odluke za analizu podataka dobijanje ispitivanjem MEOGRT.

Pretpostavlja se da će skupovi podataka najčešće pokazivati monotonične odgovore. Osim toga, treba razmotriti pitanje upotrebe jednosmjernog statističkog testiranja ili dvosmjernog statističkog testiranja. Predlaže se upotreba jednosmjernih statističkih testiranja osim ako postoji biološki razlog zbog kojeg ono ne bi bilo primjereno. Iako se u sljedećem odjeljku predlažu određeni statistički testovi, ako se razviju primjerenije i/ili snažnije statističke metode za primjenu na specifičnim podacima koji se dobiju ispitivanjem MEOGRT, upotrebljavali bi se ti statistički testovi kako bi se iskoristile te prednosti.

Podatke dobijene ispitivanjem MEOGRT treba analizirati zasebno za svaki genotipski pol. Postoje dvije strategije za analizu podataka o ribama s promijenjenim polom (mužjaci XX ili ženke XY): 1) isključivanje svih podataka o ribama s promijenjenim polom iz cijelog ispitivanja, osim učestalosti pojave promjene pola u svakom ponavljanju; 2) zadržavanje podataka o svim ribama s promijenjenim polom u skupu podataka i analiza na osnovu genotipa.

Histopatološki podaci

Histopatološki podaci navode se kao ocjene ozbiljnosti koje se procjenjuju upotrebom novog statističkog postupka – RSCABS (engl. Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices), (Green i dr., 2014.). U prilagođavanjima Rao-Scottova postupka zadržavaju se informacije iz ponavljanja ispitivanja; postupak u dijelovima (engl. by Slices) uključuje biološko očekivanje da se ocjene ozbiljnosti obično povećavaju s povećanjem koncentracija u tretiranjima. Za svaku se dijagnozu u ishodu RSCABS-a navodi kod kojih se tretiranja javlja veća učestalost pojave patologije nego u kontrolama te povezane nivoa ozbiljnosti.

Podaci o potencijalnoj plodnosti

Analize za podatke o potencijalnoj plodnosti sastoje se od Jonckheere-Terpstraova ili Williamsova testa postupnog snižavanja kako bi se utvrdili efekti tretiranja, pod uslovom da su podaci usklađeni s monotoničnim odgovorom na koncentraciju. Kod testa postupnog snižavanja sve se poređenje obavljaju pri nivou značajnosti od 0,05 i nema prilagodbi za broj u poređenju. Očekuje se da su podaci usklađeni s monotoničnim odgovorom na koncentraciju, ali to se može provjeriti vizualnim pregledom podataka ili izradom linearnih i kvadratnih kontrasta srednjih vrijednosti tretiranja nakon transformacije podataka u redoslijed rangova. Test trenda dovršen je osim ako je kvadratni kontrast značajan, a linearni kontrast nije značajan. U suprotnom se obavlja Dunnettov test kako bi se utvrdili efekti tretiranja ako su podaci normalno distribuirani s homogenim varijancama. Ako ti zahtjevi nisu ispunjeni, upotrebljava se Dunnov test s Bonferonni-Holmovom prilagodbom. Svi navedeni testovi obavljaju se neu zavisnosti o bilo kakvom opštem F-testu ili Kruskal-Wallisovu testu. Dodatne pojedinosti nalaze se u OECD-ovoj publikaciji iz 2006.

Mogu se koristiti i alternativne metode, kao što su opšteniti linearni model s Poissonovim pogreškama za brojeve jajašaca (bez transformacije), ako se to statistički obrazloži

(Cameron i Trividi, 2013.). Ako se upotrebljava alternativni pristup, preporučuje se statističko savjetovanje.

Dnevni broj jajašaca u jednoj generaciji

Model ANOVA računa se kao Y = Vrijeme * Vrijeme + Tretiranje + * Tretiranje + Vrijeme * Tretiranje + * Vrijeme * Tretiranje, s nasumičnim efektima ponavljanja (Generacija * Tretiranje) i Vrijeme * Ponavljanje (Tretiranje), pri čemu se dopuštaju nejednake komponente varijance oba tipa kroz generacije. Vrijeme se ovdje odnosi na učestalost brojenja jajašaca (npr. dan ili nedelja). Ovo je analiza ponovljenog mjerenja, s korelacijama između zapažanja na istim ponavljanjima kojima se uzima u obzir priroda ponovljenih mjerenja podataka.

Glavni efekti tretiranja ispituju se upotrebom Dunnettova (ili Dunnett-Hsuova) testa, kojim se prilagođava broj u poređenju. Potrebne su prilagođavanja za glavni efekat generacije ili vremena jer za ta dva efekata ne postoji nivoa „kontrole" i svaki je par nivoa upoređivanje od mogućeg interesa. U slučaju tih dvaju glavnih efekata, ako je F-test za glavni efekat značajan na nivou od 0,05, poređenje u parovima među nivoama tog efekata zatim se mogu ispitati na nivou od 0,05 bez dalje prilagođavanja.

Model uključuje interakcije s dva i tri efekata, tako da glavni efekat za, na primjer, vrijeme, ne može biti značajan iako vrijeme znatno utiče na rezultate. Stoga, ako je interakcija s dva ili tri efekata koja uključuje vrijeme značajna na nivou od 0,05, mogu se prihvatiti poređenje nivoa vremena na nivou značajnosti od 0,05 bez dalje prilagođavanja.

Zatim slijede F-testovi za značajnost tretiranja u vremenu, takozvani dijelovi u tabeli ANOVA. Ako je, na primjer, dio za tretiranje u generaciji F1 i vremenu 12 značajan na nivou od 0,05, poređenje u parovima za tretiranje u generaciji F1 i vremenu 12 mogu se prihvatiti na nivou od 0,05 bez dalje prilagođavanja. Slične izjave primjenjuju se na testove za vrijeme u generaciji F1 i tretiranju te za generaciju u okviru vremena i tretiranja.

Naposljetku, u slučaju u poređenju koje ne pripadaju nijednoj od prethodno navedenih kategorija, poređenje treba prilagoditi upotrebom Bonferonni-Holmove prilagođavanja p-vrijednostima. Dalje informacije o analizama tih modela mogu se pronaći u Hocking (1985.) te Hochberg i Tamhane (1987.).

Umjesto toga, neobrađeni podaci evidentiraju se i prikazuju u izvješću o studiji kao potencijalna plodnost (broj jajašaca) po ponavljanju za svaki dan. Treba izračunati srednju vrijednost ponavljanja iz neobrađenih podataka i zatim primijeniti drugi korijen transformacija. Treba izračunati jednosmjernu ANOVA-u na transformiranim srednjim vrijednostima ponavljanja, nakon čega slijede Dunnettovi kontrasti. Može biti korisno i vizualno pregledati podatke o potencijalnoj plodnosti svakog tretiranja i/ili ponavljanja s pomoću dijagrama raspršenosti na kojem se prikazuju podaci kroz vrijeme. Time će se omogućiti neformalna procjena potencijalnih efekata kroz vrijeme.

Svi ostali biološki podaci

Statističke analize baziraju se na temeljnoj pretpostavci da će podaci biti monotonični ako je doza pravilno odabrana. Stoga se pretpostavlja da su podaci monotonični te se oni formalno procjenjuju u pogledu monotoničnosti upotrebom linearnih i kvadratnih kontrasta. Ako su podaci monotonični, preporučuje se Jonckheere-Terpstraov test trenda na srednjim

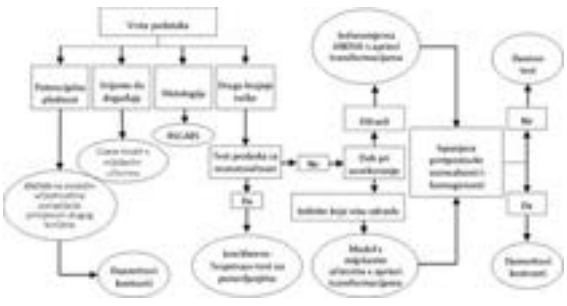
vrijednostima ponavljanja (kako se savjetuje u publikaciji OECD-a iz 2006.). Ako je kvadratni kontrast značajan, a linearni kontrast nije, smatra se da podaci nisu monotonični.
Ako podaci nisu monotonični, naročito zbog smanjenog odgovora najvišeg tretiranja ili prva dva najviša tretiranja, treba razmotriti isključivanje tih tretiranja iz skupa podataka za analizu. Za tu odluku potrebna je stručna prosudba i svi dostupni podaci, posebno podaci koji ukazuju na očitu toksičnost na tim nivoama tretiranja.

Za masu i dužinu ne preporučuju se nikakve prilagođavanja, iako ponekad mogu biti potrebne. Međutim, za podatke o vitelogeninu preporučuje se log transformacija; za podatke o SSC-u preporučuje se log transformacija (papile na podrepnoj peraji); za podatke o udjelu valjenja, postotku preživljavanja, odnosu polova i postotku plodnih jajašaca preporučuje se transformacija arkus sinusa drugog korijena. Vrijeme do valjenja i vrijeme do prvog mriješćenja treba tretirati kao podatke o vremenu do događaja, pri čemu se pojedinačni embriji koji se ne izvale u utvrđenom razdoblju ili ponavljanja u kojima ne dođe do mriješćenja tretiraju kao podaci koji se cenzuriraju desno. Vrijeme do valjenja treba računati od srednjeg dana valjenja svakog ponavljanja. Te krajnje tačke treba analizirati upotrebom Coxova modela proporcionalne opasnosti s miješanim efektima.

Biološki podaci uzoraka odraslih riba imaju jedno mjerenje po ponavljanju, odnosno postoji jedna riba XX i jedna riba XY po akvariju s ponavljanjem. Stoga se preporučuje da se na srednjim vrijednostima ponavljanja provede jednosmjerna ANOVA. Ako se ispune pretpostavke ANOVA-e (normalnost i homogenost varijanci, kako su procijenjeni na rezidualima ANOVA-e Shapiro-Wilksovim odnosno Leveneovim testom), treba upotrijebiti Dunnettove kontraste kako bi se utvrdila tretiranja koja su različita od kontrole. S druge strane, ako se ne ispune pretpostavke ANOVA-e, treba sprovesti Dunnov test kako bi se utvrdilo koja su tretiranja različita od kontrole. Sličan se postupak preporučuje za podatke koji su u obliku postotaka (plodnost, valjenje i preživljavanje).

Biološki podaci uzoraka riba koje nisu odrasle imaju od jednog do osam mjerenja po ponavljanju, odnosno može postojati različit broj jedinki koje doprinose srednjoj vrijednosti ponavljanja za svaki genotipski pol. Stoga se preporučuje upotreba modela ANOVA s miješanim efektima, nakon čega slijede Dunnettovi kontrasti ako su ispunjene pretpostavke normalnosti i homogenosti varijanci (na rezidualima ANOVA-e s miješanim efektima). Ako one nisu ispunjene, treba sprovesti Dunnov test kako bi se utvrdilo koja su tretiranja različita od kontrole.

Slika 2. Dijagram toka za preporučene statističke postupke za analizu podataka u ispitivanju MEOGRT



C.53. TEST RASTA I RAZVOJA VODOZEMACA U FAZI LARVI (LAGDA)

UVOD

Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 241 (2015.). Potreba za razvojem i validacijom testa kojim se mogu identifikovati i opisati štetne posljedice izlaganja toksičnim hemikalijama u vodozemaca pojavila se zbog zabrinutosti da nivoa hemikalija u okolišu mogu štetno uticati i na ljude i na životinje. U Smjernici OECD-a za ispitivanje pod nazivom Test rasta i razvoja vodozemaca u fazi larvi (LAGDA, engl. Larval Amphibian Growth and Development Assay) opisuje se toksikološko ispitivanje s vrstom vodozemaca u kojem se razmatraju rast i razvoj od oplodnje i tokom ranog juvenilnog perioda. To je test (obično 16 nedelja) u kojem se procjenjuju rani razvoj, metamorfoza, preživljavanje, rast i djelimično reproduktivno sazrijevanje. U njemu se omogućuje i mjerenje skupa drugih krajnjih tačaka koje omogućuju dijagnostičku ocjenu hemikalija za koje se sumnja da su endokrino disruptivne ili drugih vrsta razvojnih i reproduktivnih toksikanata. Metoda opisana u ovoj ispitnoj metodi izvedena je iz validacione studije s afričkom pandžašicom (Xenopus laevis) koju je provela Agencija SAD-a za zaštitu okoliša (U.S. EPA) uz popratni rad obavljen u Japanu (1.). Iako se druge vrste vodozemaca mogu prilagoditi protokolu testa rasta i razvoja, pri čemu je mogućnost utvrđivanja genetskog pola važna sastavnica, specifične metode i krajnje tačke posmatranja opisane u ovoj ispitnoj metodi primjenjive su samo na vrstu Xenopus laevis.

LAGDA služi kao ispitivanje više nivoa na vodozemcima za prikupljanje sveobuhvatnijih informacija o odnosu koncentracije i odgovora u pogledu štetnih efekata, a primjereno je za identifikaciju i opis opasnosti te za procjenu rizika za okoliš. Test pripada četvrtoj nivou OECD-ova konceptualnog okvira za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih hemikalija, na kojoj in vivo testovi pružaju i informacije o štetnim efektima na relevantne endokrine krajnje tačke (2.). Opšti plan izvođenja eksperimenta obuhvata izlaganje embrija vrste X. laevis u 8.–10. stadiju prema Nieuwkoopu i Faberu (NF) (3.) najmanje četirima različitim koncentracijama ispitivane hemikalije (obično raspoređene barem u polulogaritamske intervale) i kontrolama do deset nedelja nakon srednjeg vremena do 62. stadija NF-a u kontroli, s jednim međuvremenim poduzorkom u 62. stadiju NF-a (≤ 45 nakon oplodnje; obično približno 45 dana (dana nakon oplodnje). Svaka se ispitivana koncentracija sastoji od četiri ponavljanja s osam ponavljanja za kontrolu. Krajnje tačke koje se ocjenjuju tokom izlaganja (kod međuvremenog poduzorka i konačnog uzorka na kraju ispitivanja) uključuju tačke koje ukazuju na opštu toksičnost: smrtnost, abnormalno ponašanje i utvrđivanja rasta (dužina i masa) te krajnje tačke koje su osmišljene za opis specifičnih načina djelovanja endokrine toksičnosti koji su usmjereni na fiziološke procese kojima posreduje estrogen, androgen ili hormon štitne žlijezde. U metodi se najveća važnost pridaje efektima koji su potencijalno relevantni za populaciju (tačnije, štetnim efektima na preživljavanje, razvoj, rast i reproduktivni razvoj) za izračun najviše koncentracije bez vidljivog efekta (NOEC) ili koncentracije s x-postotnim efektom (ECx) na krajnjoj tački koja se mjeri. Iako treba napomenuti da su pristupi u kojima se upotrebljava ECx rijetko primjereni za velike studije ove vrste kod kojih povećanje broja ispitnih koncentracija kako bi se omogućilo utvrđivanje željenog ECx može biti nepraktično. Treba napomenuti i da metodom nije obuhvaćena sama reproduktivna faza. Definicije koje se upotrebljavaju u ovoj ispitnoj metodi navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

Zbog ograničenog broja ispitanih hemikalija i laboratorija uključenih u validaciju ovog poprilično složenog testa (naročito obnovljivost između više laboratorija za sada nije dokumentirana s eksperimentalnim podacima) predviđa se da će se Smjernica OECD-a za ispitivanje 241 revidirati i, prema potrebi, prilagoditi stečenom iskustvu kada za utvrđivanje

efekta ovog novog dizajna studije bude dostupan dovoljan broj studija. LAGDA je važan test za rasvjetljavanje efekata koji potencijalno doprinose smanjenju populacije vodozemaca procjenom efekata izlaganja hemikalijama tokom osjetljivog stadija ličinke, u kojem efekti na preživljavanje i razvoj, uključujući normalan razvoj reproduktivnih organa, mogu štetno uticati na populacije.

Ispitivanje je osmišljeno za otkrivanje apikalnih efekata koji su rezultat i endokrinih mehanizama i mehanizama koji nisu endokrini te uključuje dijagnostičke krajnje tačke koje su djelimično specifične za ključne endokrine modalitete. Treba napomenuti da prije razvoja testa LAGDA nije postojao validirani test koji je služio toj svrsi za vodozemce.

Prije započinjanja testa važno je imati informacije o fizičko-hemijskim svojstvima ispitivane hemikalije, naročito kako bi se omogućilo dobijanje stabilnih RASTVORA hemikalija. Važno je i imati dovoljno osjetljivu analitičku metodu za provjeru koncentracija ispitivane hemikalije. Za test, koji traje približno 16 nedelja, potrebno je ukupno 480 životinja, tj. embrija vrste X. laevis (ili 640 embrija ako se upotrebljava kontrola s rastvaračem) kako bi se osigurala dovoljna snaga ispitivanja za ocjenu krajnjih tačaka koje su relevantne za populaciju, kao što su rast, razvoj i reproduktivno sazrijevanje.

Prije primjene ispitne metode za regulatorno ispitivanje smješe trebalo bi razmotriti hoće li se njome dobiti prihvatljivi rezultati za predviđenu regulatornu svrhu. Nadalje, ovim se testom potencijalna plodnost ne ocjenjuje direktno pa možda neće biti primjenjiv za upotrebu na nivou višoj od četvrte nivoa OECD-ova konceptualnog okvira za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih supstanci.

NAUČNA OSNOVA ZA ISPITNU METODU

Velik dio trenutačnih spoznaja o biologiji vodozemaca dobijen je upotrebom ogledne laboratorijske vrste X. laevis. Ta se vrsta može rutinski uzgajati u laboratoriju, ovulacija se može indukovati upotrebom humanog korionskog gonadotropina (hCG) i zalihe životinja lako su dostupne kod komercijalnih uzgajivača.

Kao i kod svih kralježnjaka, razmnožavanje vodozemaca pod kontrolom je osi hipotalamus-hipofiza-gonade (HPG) (4.). Estrogeni i androgeni posrednici su tog endokrinog sistema, koji određuju razvoj i fiziologiju polno dimorfnih tkiva. U životnom ciklusu vodozemaca postoje tri posebne faze kada je ta os naročito aktivna: 1. gonadna diferencijacija tokom razvoja larvi, 2. razvoj sekundarnih polnih obilježja i gonadno sazrijevanje tokom juvenilne faze te 3. funkcionalno razmnožavanje odraslih jedinki. Sve te tačke u razvoju vjerovatno su osjetljive na endokrine poremećaje koje uzrokuju određene hemikalije kao što su estrogeni i androgeni, što naposljetku dovodi do gubitka reproduktivne sposobnosti organizama.

Gonade se počinju razvijati u 43. stadiju NF-a, kada se prvo razvija bipotencijalni genitalni greben. Diferencijacija gonada počinje u 52. stadiju NF-a, kada primordijalne zametne ćelije migriraju u medularno tkivo (mužjaci) ili ostaju u kortikalnoj regiji (ženke) gonada u razvoju (3.). Prvi je put navedeno da je taj proces polne diferencijacije gonada osjetljiv na hemijske promjene kod roda Xenopus pedesetih godina 20. stoljeća (5. i 6.). Izlaganje punoglavaca estradiolu tokom tog perioda diferencijacije gonada dovodi do promjene pola mužjaka koji postaju potpuno funkcionalne ženke kada dosegnu odraslu dob (7. i 8.). Moguća je i funkcionalna promjena pola ženki u mužjake i navedeno je da do nje dolazi nakon implantacije tkiva testisa kod punoglavaca. Međutim, iako izlaganje inhibitoru aromataze uzrokuje funkcionalnu promjenu pola i kod vrste X. tropicalis, nije dokazano da do toga

dolazi i kod vrste X. laevis. U prošlim su se ispitivanjima efekti toksičnih supstanci tvarna gonadnu diferencijaciju procjenjivali histološkim ispitivanjem gonada pri metamorfozi i promjena pola mogla se utvrditi samo analizom odnosa polova. Donedavno nisu postojala sredstva za direktno utvrđivanje genetskog pola kod roda Xenopus. Međutim, nedavno su kod vrste X. laevis utvrđeni markeri povezani sa polom, što omogućuje utvrđivanje genetskog pola i omogućuje direktnu identifikaciju životinja koje su promijenile pol.

Razvoj mladih mužjaka nastavlja se s povećanjem nivoa testosterona u krvi koje odgovara razvoju sekundarnih polnih obilježja te razvoju testisa. Kod ženki jajnici proizvode estradiol, što dovodi do pojave vitelogenina (VTG) u plazmi, vitelogenih jajnih ćelija u jajniku i razvoja jajovoda (12.). Jajovodi su sekundarno polno obilježje ženki koji djeluju u sazrijevanju jajnih ćelija tokom reprodukcije. Želatinozni omotači prianjaju uz vanjsku površinu jajnih ćelija dok one prolaze kroz jajovod i sakupljaju se u vrećici s jajašcima te su spremne za oplodnju. Čini se da razvojem jajovoda upravljaju estrogeni jer je razvoj u korelaciji s nivoama estradiola u krvi kod vrsta X. laevis (13.) i X. tropicalis (12.). Navedeno je da dolazi do razvoja jajovoda u mužjaka nakon izlaganja jedinjenjima polihloriranih bifenila (14.) i 4-tert-oktilfenolu.

NAČELO ISPITIVANJA

Plan ispitivanja obuhvata izlaganje embrija vrste X. laevis u 8.–10. stadiju NF-a putem vode različitim koncentracijama ispitivane hemikalije te kontrolama do deset nedelja nakon srednjeg vremena do 62. stadija NF-a u kontroli s jednim međuvremenim poduzorkom u 62. stadiju NF-a. Iako je jako hidrofobne hemikalije moguće dozirati u hrani, zasada je iskustvo u upotrebi tog načina izlaganja u ovom testu ograničeno. Svaka se ispitivana koncentracija sastoji od četiri ponavljanja s osam ponavljanja za svaku upotrijebljenu kontrolu. Krajnje tačke koje se ocjenjuju tokom izlaganja uključuju one koje ukazuju na opštu toksičnost (tj. smrtnost, abnormalno ponašanje i utvrđivanja rasta (dužina i masa)) te krajnje tačke koje su osmišljene za opis specifičnih načina djelovanja endokrine toksičnosti koji su usmjereni na fiziološke procese kojima posreduje estrogen, androgen ili hormon štitne žlijezde (tj. histopatologija štitne žlijezde, histopatologija gonada i gonadnih kanala, abnormalan razvoj, vitelogenin u plazmi (neobavezno) i odnosi genotipskog/fenotipskog pola).

KRITERIJUMI VALJANOSTI ISPITIVANJA

Primjenjuju se sljedeći kriterijumi za valjanost ispitivanja:

- tokom cijelog ispitivanja koncentracija otopljenog kiseonika trebala bi iznositi ≥ 40 % vrijednosti zasićenosti kiseonikom,
- temperatura vode treba biti u rasponu od 21 ± 1 °C i razlike između ponavljanja i između tretiranja ne bi trebale biti veće od 1,0 °C,
- pH-vrijednost ispitivane rastvora treba održavati u rasponu od 6,5 do 8,5 i razlike između ponavljanja i između tretiranja ne bi trebale biti veće od 0,5,
- trebali bi postojati dokazi da su se koncentracije ispitivane hemikalije u rastvorini uspješno održavale u rasponu od ±20 % srednjih izmjerenih vrijednosti,
- smrtnost tokom perioda izlaganja treba biti ≤ 20 % u svakom ponavljanju u kontrolama,
- vijabilnost ≥ 70 % u mrijestu koji je odabran za započinjanje studije,
- srednje vrijeme do 62. stadija NF-a kontrola treba biti ≤ 45 dana,
- srednja masa ispitnih organizama u 62. stadiju NF-a i na kraju testa treba dosegnuti 1,0 ± 0,2 g u kontrolama i 11,5 ± 3 g u kontrolama s rastvaračem (ako se upotrebljavaju).

Iako to nije kriterij valjanosti, preporučuje se da za analizu budu dostupne najmanje tri nivoa tretiranja s tri nekompromitirana ponavljanja. Visoka smrtnost, koja kompromitira tretiranje, definiše se kao > 4 smrtna slučaja (> 20 %) u dva ili više ponavljanja koji se ne mogu objasniti tehničkom pogreškom. Za analizu bi trebale biti dostupne najmanje tri nivoa tretiranja bez jasnih znakova očite toksičnosti. Znaci očite toksičnosti mogu uključivati, ali nisu ograničeni na, plutanje na površini, ležanje na dnu rezervoara, obrnuto ili nepravilno plivanje, neizlaženje na površinu i nereagujunje na poticaje, morfološke abnormalnosti (npr. deformacije udova), hemoragijske lezije i abdominalne edeme.

Ako se uoči odstepene od kriterijuma valjanosti ispitivanja, potrebno je razmotriti posljedice u odnosu na pouzdanost rezultata ispitivanja te ta odstepena i razmatranja uključiti u izvještaj o ispitivanju.

OPIS METODA

Oprema
Uobičajena laboratorijska oprema, posebno:

(a) uređaji za sastojcinje temperature (npr. grijači ili hladnjaci podesivi na 21 ± 1 °C);
(b) termometar;
(c) binokularni disekcijski mikroskop i pribor za seciranje;
(d) digitalni fotoaparat s najmanje četiri megapiksela razlučivosti i mikrofunkcijom (ako je potrebno);
(e) analitička vaga s mogućnošću mjerenja do 0,001 mg ili 1 µg;
(f) mjerač otopljenog kiseonika i pH-vrijednosti;
(g) mjerač intenziteta svjetlosti s mogućnošću mjerenja u luksima.

Voda
Izvor i kvaliteta

Može se upotrebljavati bilo koja voda za razrjeđivanje koja je lokalno dostupna (npr. izvorska voda ili voda iz slavine filtrirana ugljem) i omogućuje normalan rast i razvoj vrste X. laevis te trebaju biti dostupni dokazi o normalnom rastu u toj vodi. Budući da se kakvoća lokalne vode može znatno razlikovati od jednog do drugog područja, potrebno je sprovesti analizu kvaliteta vode, pogotovo ako nisu dostupni prošli podaci o korisnosti vode za uzgoj larvi vodozemaca. Mjerenje teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), glavnih aniona i kationa (npr. Ca2+, Mg2+, Na+, K+, Cl-, SO4 2-), pesticida, ukupnog organskog ugljika i suspendujene čvrste supstance treba sprovoditi prije početka ispitivanja i/ili npr. svakih šest mjeseci ako se zna da je voda za razrjeđivanje relativno stalne kvaliteta. Neka hemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje navedena su u Dodatku 2.

Koncentracija jodida u ispitnoj vodi

Kako bi štitna žlijezda sintetizirala hormone štitne žlijezde i podržala normalnu metamorfozu, ličinkama treba biti dostupno dovoljno jodida koji se dobija iz vode i hrane. Trenutno ne postoje empirijski izvedene smjernice za najmanje koncentracije jodida u hrani ili vodi kojima se osigurava pravilan razvoj. Međutim, dostupnost jodida može uticati na reakciju tiroidnog sistema na aktivna sredstva i poznato je da modulira bazalnu aktivnost štitne žlijezde, što zaslužuje pažnju pri tumačenju rezultata histopatologije štitne žlijezde. Na osnovu prethodnog rada, uspješna provedba testa dokazana je kada je raspon koncentracija jodida (I-) u vodi za razrjeđivanje od 0,5 do 10 µg/l. Idealno bi najmanja koncentracija jodida u vodi

za razrjeđivanje tokom cijelog ispitivanja trebala iznositi 0,5 µg/l (dodan u obliku natrijume ili kalijeve soli). Ako se ispitna voda pomiješa s deioniziranom vodom, potrebno je dodati jod u minimalnoj koncentraciji od 0,5 µg/l. Treba izvijestiti o izmjerenim koncentracijama jodida u ispitnoj vodi (tj. vodi za razrjeđivanje) i dodavanju joda ili drugih soli (ako se upotrebljavaju) ispitnoj vodi. Osim u ispitnoj vodi, udio joda može se mjeriti i u hrani.

Sistem izlaganja

Ispitivanje je razvijeno upotrebom protačnog sistema za razrjeđivanje. Sastojci sistema koje dolaze u dodir s vodom trebale bi biti od stakla, nehrđajućeg čelika i/ili drugih hemijski inertnih materijala. Spremnici za izlaganje trebaju biti akvariji od stakla ili nehrđajućeg čelika, a iskoristivi volumen rezervoara trebao bi biti od 4,0 do 10,0 l (najmanja dubina vode od 10 do 15 cm). Sistem bi trebao moći podržati sve koncentracije u izlaganjima, kontrolu i kontrolu s rastvaračem, ako je potrebna, s četiri ponavljanja po tretiranju i osam ponavljanja u kontrolama. Brzina protoka za svaki rezervoar trebala bi biti konstantna s obzirom na održavanje bioloških uslova i izlaganje hemikaliji. Preporučuju se primjerene brzine protoka (npr. najmanje pet izmjena vode u rezervoaru dnevno) kako bi se izbjegla smanjenja koncentracije hemikalija zbog metabolizma ispitnih organizama i vodenih mikroorganizama prisutnih u akvariju ili abiotičkih načina razgradnje (hidroliza, fotoliza) ili gubitka (hlapljenje, sorpcija). Spremnicima za tretiranje treba nasumično dodijeliti položaj u sistemu izlaganja kako bi se izbjegli mogući efekti položaja, uključujući male razlike u temperaturi, intenzitetu svjetlosti itd. Dalje informacije o uspostavi protačnih sistema izlaganja mogu se pronaći u Standardnom vodiču za sprovođenje ispitivanja akutne toksičnosti na ispitivanim materijalima s ribama, makrobeskralježnjacima i vodozemcima Američkog društva za testiranje i materijale (ASTM)

Uvođenje hemikalije: priprema ispitnih RASTVORA

Kako bi se pripremile ispitne rastvora u sistemu izlaganja glavnu rastvor ispitivane hemikalije treba uvesti u sistem izlaganja odgovarajućom crpkom ili drugim uređajima. Brzinu protoka glavne rastvora treba kalibrirati u skladu s analitičkom potvrdom ispitnih RASTVORA prije početka izlaganja i tokom ispitivanja periodično volumetrijski provjeravati. Ispitnu rastvor u svakoj komori treba obnavljati primjenom najmanje pet obnavljanja volumena dnevno.

Metoda koja se upotrebljava za uvođenje ispitivane hemikalije u sistem može varirati u zavisnosti o njenim fizičko-hemijskim svojstvima. Stoga prije ispitivanja treba dobiti početne informacije o hemikaliji koje su relevantne za utvrđivanje mogućnosti njena ispitivanja. Korisne informacije o svojstvima koja su specifična za ispitivanu hemikaliju uključuju strukturnu formulu, molekularnu masu, čistoću, stabilnost u vodi i na svjetlu, pKa i Kow, rastvorljivost u vodi (po mogućnosti u ispitnom medijumu) i tlak pare te rezultate ispitivanja lake biorazgradivosti (ispitna metoda C.4. (17.) ili C.29. (18.)). Rastvorljivost i tlak pare mogu se upotrijebiti za izračunavanje konstante Henryjeva zakona, na osnovu koje se može zaključiti mogu li se očekivati gubitci zbog isparavanja ispitivane hemikalije. Primjenu ovog ispitivanja bez prethodno navedenih informacija treba pozorno razmotriti jer će plan studije zavisiti o fizičko-hemijskim svojstvima ispitivane hemikalije i bez tih podataka rezultate ispitivanja možda će biti teško tumačiti ili neće imati smisla. Potrebna je pouzdana analitička metoda za kvantifikaciju ispitivane hemikalije u ispitnim rastvorima s utvrđenom i dokumentiranom tačnošću i granicom otkrivanja. Ispitivane hemikalije rastvorive u vodi mogu se rastvoriti u alikvotima vode za razrjeđivanje pri koncentraciji pri kojoj je moguća isporuka ciljane ispitivane koncentracije u protačnom sistemu. Za hemikalije koje su na sobnoj temperaturi u tečnom ili čvrstom stanju te su umjereno rastvorive u vodi možda će biti

potrebno miješanje dviju tečnosti do zasićenosti ili miješanje tečnosti i čvrste supstance do zasićenosti (npr. kolona od staklene vune) (19.). Iako će možda biti moguće dozirati vrlo hidrofobne ispitivane hemikalije u hrani, zasada je iskustvo u upotrebi tog načina izlaganja u ovom testu ograničeno.

Ispitne rastvora odabranih koncentracija pripremaju se razrjeđivanjem glavne rastvora. Glavnu rastvor trebalo bi po mogućnosti pripremiti jednostavnim miješanjem ili mućkanjem ispitivane hemikalije u vodi za razrjeđivanje mehaničkim sredstvima (npr. miješanjem i/ili tretiranjem ultrazvukom). Za postizanje odgovarajuće koncentracije glavne rastvora mogu se upotrebljavati kolone/sistemi za zasićivanje ili pasivne metode doziranja (20.). Prednost se daje upotrebi ispitnog sistema bez surastvarača; međutim, različite ispitivane hemikalije sadržit će različita fizičko-hemijska svojstva koja će vjerovatno zahtijevati različite pristupe za pripremu vode za izlaganje hemikaliji. Treba nastojati izbjeći rastvarača ili nosače jer: 1. određena rastvarača sama po sebi mogu dovesti do toksičnosti i/ili nepoželjnih ili neočekivanih odgovora; 2. ispitivanje hemikalija iznad njihove rastvorljivosti u vodi (što se često javlja upotrebom rastvarača) može dovesti do pogrešnih utvrđivanja efektovitih koncentracija; 3. upotreba rastvarača u dugoročnim ispitivanjima može dovesti do znatnog stupnja nastanka „biofilma" povezanog s djelovanjem mikroba, što može uticati na okolišne uslove te sposobnost održavanja koncentracija izlaganja i 4. ako ne postoje prošli podaci koji pokazuju da rastvarač ne utiče na ishod studije, upotreba rastvarača zahtijeva tretiranje kontrola s rastvaračem, što ima znatne posljedice u pogledu dobrobiti životinja jer su potrebne dodatne životinje za primjenu ispitivanja. Za hemikalije koje se teško ispituju, rastvarač se može upotrebljavati kao krajnje sredstvo i potrebno je proučiti Smjernicu OECD-a za ispitivanje toksičnosti teških supstanci i smješa u vodi (21.) kako bi se utvrdila najbolja metoda. Izbor rastvarača zavisit će o hemijskim svojstvima ispitivane hemikalije i dostupnosti prošlih kontrolnih podataka o rastvraču. Ako ne postoje prošli podaci, prije primjene konačne studije treba utvrditi primjerenost rastvarača. Ako se ne može izbjeći upotreba rastvarača i dođe do djelovanja mikroba (nastanak biofilma), preporučuje se evidentiranje/izvještavanje o nastanku biofilma po rezervoaru (najmanje jednom nedeljno) tokom cijelog ispitivanja. U idealnim uslovima koncentraciju rastvarača u kontroli s rastvaračem i svim ispitnim obradama trebalo bi održavati stalnom. Ako se koncentracija rastvarača ne održava stalnom, najvišu koncentraciju rastvarača u ispitnoj obradi treba upotrijebiti u kontroli s rastvaračem. U slučajevima u kojima se upotrebljava rastvarač nosač najviše koncentracije rastvarača ne bi smjele biti veće od 100 µl/l ili 100 mg/l (21.) i preporučuje se da se koncentracija rastvarača održava što nižom (npr.<20 µl/l) kako bi se izbjegli mogući efekti rastvarača na krajnje tačke koje se mjere.

Ispitne životinje
Ispitne vrste

Kao ispitna vrsta upotrebljava se X. laevis iz sljedećih razloga: 1. rutinski se uzgaja u laboratorijima diljem svijeta; 2. može se lako nabaviti kod komercijalnih dobavljača i 3. moguće je utvrditi genetski pol.

Njega i uzgoj odraslih životinja

Primjerena njega i uzgoj vrste X. laevis opisani su u standardiziranoj smjernici. Držanje i njegu vrste X. laevis opisao je i Read (24.). Kako bi se indukujelo razmnožavanje, odraslim ženkama i mužjacima koji čine od tri do pet parova intraperitonealno se ubrizgava humani korionski gonadotropin (hCG). Uzorcima ženki i mužjaka ubrizgava se npr. približno 800–1 000 IU odnosno 500–800 IU hCG-a otopljenog u fiziološkoj rastvorini od 0,6 do 0,9 % (ili

Ringerovoj rastvorini za žabe, izotoničnoj rastvorini za upotrebu na vodozemcima). Volumeni koji se ubrizgavaju trebaju iznositi približno 10 µl/g tjelesne mase (~ 1 000 µl). Nakon toga indukujeni uzgojni parovi drže se u velikim spremnicima, neometano i pod statičkim uslovima radi poticanja ampleksusa (spoljašnje oplodnje). Dno svakog rezervoara za parenje trebalo bi imati lažno dno s mrežom od nehrđajućeg čelika (npr. otvori od 1,25 cm), koja omogućava da jajašca padnu na dno rezervoara. Žabe kojima je hCG ubrizgan u kasnim poslijepodnevnim satima obično će položiti većinu svojih jajašaca do sredine jutra sljedećeg dana. Nakon izbacivanja i oplodnje dovoljne količine jajašaca potrebno je ukloniti odrasle životinje iz rezervoara za uzgoj. Jajašca se zatim prikupljaju i želatinozni omotači uklanjaju se tretiranjem L-cisteinom (23.). Treba pripremiti 2-postotnu rastvor L-cisteina, a pH-vrijednost prilagoditi na 8,1 s 1 M NaOH. Ta RASTVORA temperature od 21 °C dodaje se u Erlenmeyerovu tikvicu od 500 ml koja sadrži jajašca iz jednog mrijesta te se lagano miješa jednu minutu ili dvije minute, a zatim zasnivato ispire 6–8 puta vodom za uzgoj kulture temperature od 21 °C. Jajašca se zatim prenose u posude za kristalizaciju i utvrđuje se je li vijabilnost > 70 %, s minimalnim abnormalnostima kod embrija koji pokazuju diobu ćelija.

PLAN ISPITIVANJA
Ispitne koncentracije

Preporučuje se upotreba najmanje četiri koncentracija hemikalija i odgovarajućih kontrola (uključujući kontrole s rastvaračem, ako su potrebne). Generalno se preporučuje razmak između koncentracija (interval) koji nije veći od 3,2.

Za potrebe ovog ispitivanja treba upotrebljavati rezultate iz postojećih studija na vodozemcima u mjeri u kojoj je to moguće kako bi se utvrdila najviša ispitna koncentracija i izbjegle koncentracije koje su očito toksične. Utvrđivanju te koncentracije mogu pridonijeti informacije iz, na primjer, kvantitativnih odnosa između strukture i aktivnosti, analogija i podaci iz postojećih studija s vodozemcima kao što su analiza metamorfoze vodozemaca, ispitna metoda C.38. (25.) i analiza teratogeneze embrija žabe – Xenopus (23.) i/ili ispitivanja na ribama kao što su ispitne metode C.48., C.41. i C.49. (26., 27. i 28.). Prije primjene testa LAGDA može se sprovesti eksperiment za utvrđivanje raspona. Preporučuje se da se izlaganje za utvrđivanje raspona započne u roku od 24 sata od oplodnje i nastavi od sedam do 14 dana (po potrebi i duže) te da se ispitne koncentracije utvrde tako da intervali između ispitnih koncentracija nisu veći od faktora 10. Rezultati eksperimenta za utvrđivanje raspona trebali bi služiti za utvrđivanje najviše ispitne koncentracije u testu LAGDA. Napominje se da se u slučajevima u kojima se mora upotrijebiti rastvarač primjerenost rastvarača (tj. može li ono uticati na ishod studije) može utvrditi kao dio studije za utvrđivanje raspona.

Ponavljanja unutar ispitnih grupa i kontrola

Treba upotrijebiti najmanje četiri rezervoara s ponavljanjem po ispitnoj koncentraciji i najmanje osam ponavljanja za kontrole (i kontrole s rastvaračem ako su potrebne) (tj. broj ponavljanja u kontroli i kontroli s rastvaračem treba biti dvostruko veći od broja ponavljanja svake ispitne grupe kako bi se osigurala odgovarajuća statistička snaga). Svako ponavljanje treba da sadrži najviše 20 životinja. Minimalni broj životinja koje se tretiraju bio bi 15 (pet za uzorak u 62. stadiju NF-a i deset mladih životinja). Međutim, svakom se ponavljanju dodaju dodatne životinje kako bi se uzela u obzir mogućnost smrtnosti i održao kritični broj od 15 životinja.

POSTUPAK

Pregled testa

Test započinje tek omriješćenim embrijima (8.–10. stadij NF-a) i nastavlja se razvojem mladih životinja. Životinje se svakodnevno pregledavaju kako bi se uočila smrtnost i bilo kakav znak abnormalnog ponašanja. U 62. stadiju NF-a prikuplja se poduzorak larvi (do pet životinja po ponavljanju) i ispituju se različite krajnje tačke (tabela 1.). Nakon što sve životinje dosegnu 66. stadij NF-a, tj. kraj metamorfoze (ili nakon 70 dana od započinjanja testa, u zavisnosti o tome što je kraće), sprovodi se nasumično izdvajanje (ali bez uzimanja poduzoraka) kako bi se smanjio broj životinja (deset po rezervoaru) (vidjeti stav 43.), a preostale životinje nastavljaju se izlagati do deset nedelja nakon srednjeg vremena do 62. stadija NF-a u kontroli. Na kraju ispitivanja (uzorkovanje mladih životinja) obavljaju se dodatna mjerenja (tabela 1.).

Uslovi izloženosti

Potpuni rezime ispitnih parametara dostupan je u Dodatku 3. Tokom perioda izlaganja svakodnevno treba mjeriti rastvoreni kiseonik, temperaturu i pH-vrijednost ispitnih RASTVORA. Vodljivost, lužnatost i tvrdoća mjere se jednom mjesečno. Za temperaturu vode ispitnih RASTVORA razlike između ponavljanja i između tretiranja (u jednom danu) ne bi trebale biti veće od 1,0 °C. Isto tako, za pH-vrijednost ispitnih RASTVORA razlike između ponavljanja i između tretiranja ne bi trebale biti veće od 0,5.

Nepojedena hrana i otpad mogu se svakodnevno uklanjati iz rezervoara za izlaganje s pomoću sifona, pri čemu treba paziti da se izbjegne unakrsna kontaminacija među spremnicima. Treba se paziti da se smanje stres i traume za životinje, naročito tokom kretanja, čišćenja akvarija i rukovanja. Potrebno je izbjegavati stresne uslove/aktivnosti kao što su glasna i/ili neprekidna buka, tapkanje po akvariju, vibracije u akvariju.

Trajanje izlaganja ispitivanoj hemikaliji

Izlaganje započinje s tek omriješćenim embrijima (8.–10. stadij NF-a) i nastavlja se do deset nedelja nakon srednjeg vremena do 62. stadija NF-a (≤ 45 dana od početka testa) u kontrolnoj grupi. Test LAGDA obično traje 16 nedelja (najviše 17 nedelja).

Početak testa

Za roditeljske životinje koje su upotrebljavaju za početak testa prethodno se trebalo dokazati da daju potomke čiji se pol može genetski utvrditi (Dodatak 5.). Nakon mriješćenja odraslih životinja embriji se prikupljaju, tretiraju cisteinom kako bi se uklonio želatinozni omotač te se izboru u pogledu vijabilnosti (23.). Tretiranje cisteinom omogućuje da se embriji ne zalijepe za površinu dok se njima rukuje tokom izbora. Izbor se obavlja disekcijskim mikroskopom tako da se neodrživi embriji uklone pipetom odgovarajuće veličine. Poželjno je da se za ispitivanje upotrijebi jedan mrijest čija je vijabilnost veća od 70 %. Embriji u 8.–10. stadiju NF-a nasumično se raspoređuju u rezervoare za tretiranje izlaganjem koji sadržiju odgovarajući volumen vode za razrjeđivanje sve dok svaki rezervoar ne sadrži 20 embrija. Embrijima treba pažljivo rukovati tokom ovog prijenosa kako bi se smanjio stres zbog rukovanja i kako bi se izbjegle ozljede. Punoglavci bi se trebali pomaknuti prema gore u vodenom stupcu i početi prianjati uz stijenke rezervoara 96 sati nakon oplodnje.

Režim hranjenja

Promjena hrane i količine hrane tokom različitih životnih faza vrste X. laevis vrlo su važan aspekt protokola za test LAGDA. Pretjerano hranjenje tokom faze larvi obično dovodi do učestalije pojave i težeg oblika skolioze (Dodatak 8.) te ga treba izbjegavati. Za razliku od toga, nedovoljno hranjenje tokom faze larvi dovodi do vrlo različitih stopa razvoja među kontrolama, što može ugroziti statističku snagu ili dovesti do zbunjujućih rezultata ispitivanja. U Dodatku 4. navodi se preporučena prehrana za ličinke i mlade životinje te režimi hranjenja za vrstu X. laevis u protačnim uslovima, ali dopuštene su i alternative pod uslovom da je osiguran pravilan rast i razvoj ispitnih organizama. Važno je napomenuti da ako se mjere krajnje tačke koje su specifične za endokrini sistem, u hrani ne smije biti endokrinološki aktivnih supstanci kao što je sojino brašno.

Hranjenje larvi

Preporučena prehrana larvi sastoji se od početne hrane za pastrve, tableta od algi Spirulina i pahuljica za zlatne ribice (npr. hrana u listićima TetraFin®, Tetra, Njemačka) pomiješanih u vodi za uzgoj kulture (ili za razrjeđivanje). Ta se smjesa primjenjuje tri puta dnevno radnim danom i jednom dnevno vikendom. Punoglavci se hrane i živim ličinkama račića Artemia spp. starima 24 sata dvaput dnevno radnim danom i jednom dnevno vikendom, počevši osmog dana nakon oplodnje. Hranjenje larvi, koje treba biti dosljedno u svim ispitnim posudama, treba omogućiti primjereni rast i razvoj ispitnih životinja kako bi se osigurale obnovljivost i prenosivost rezultata testa: 1. srednje vrijeme do 62. stadija NF-a u kontrolama treba biti ≤ 45 dana i 2. preporučuje se srednja masa u rasponu od 1,0 ± 0,2 g u 62. stadiju NF-a u kontrolama.

Hranjenje mladih životinja

Kada metamorfoza završi režim hranjenja sastoji se od vrhunske hrane za žabe koja tone, npr. Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, SAD) (Dodatak 4.). U ranoj fazi mladih žaba peleti se nakratko melju u mlincu za kavu, miješalici ili se gnječe tarionikom i tučkom kako bi se usitnili. Kada mlade žabe narastu dovoljno da bi konzumirale cijele pelete mljevenje ili gnječenje više nije potrebno. Životinje treba hraniti jednom dnevno. Hranjenje mladih žaba treba omogućiti primjereni rast i razvoj organizama: preporučuje se srednja masa u rasponu od 11,5 ± 3 g kod kontrolnih mladih žaba na kraju testa.

Analitička hemija

Prije početka testa treba utvrditi stabilnost ispitivane hemikalije (npr. rastvorljivost, razgradivost i isparljivost) i sve potrebne analitičke metode, npr. upotrebom postojećih informacija ili znanja. Kod doziranja u vodi za razrjeđivanje preporučuje se da se ispitne rastvora iz svakog rezervoara s ponavljanjem analiziraju prije početka ispitivanja kako bi se provjerilo funkcionišenje sistema. Koncentracije ispitivane hemikalije utvrđuju se u primjerenim razmacima tokom perioda izlaganja, po mogućnosti svakog nedelje za najmanje jedno ponavljanje u svakoj ispitnoj grupi, uz rotaciju ponavljanja iz iste ispitne grupe svakog nedelje. Preporučuje se da se rezultati baziraju na izmjerenim koncentracijama. Međutim, ako je tokom ispitivanja koncentracija ispitivane hemikalije u rastvorini uspješno održavana unutar 20 % nominalne koncentracije, rezultati se mogu bazirati na nominalnim ili izmjerenim vrijednostima. Isto tako, koeficijent varijacije (CV) izmjerenih ispitnih koncentracija tokom cijelog ispitnog perioda u tretiranju treba održavati na 20 % ili manje u svakoj koncentraciji. Ako izmjerene koncentracije ne ostanu u rasponu od 80 do 120 % nominalne koncentracije (na primjer, kod ispitivanja vrlo biorazgradivih ili adsorptivnih hemikalija), koncentracije s

efektom treba utvrditi i izraziti u odnosu na aritmetičku sredinu koncentracije za protočna ispitivanja.

Brzine protoka vode za razrjeđivanje i glavne rastvora treba provjeravati u odgovarajućim intervalima (npr. tri puta nedeljno) tokom cijelog izlaganja. U slučaju hemikalija koje se ne mogu otkriti pri nekim ili svim nominalnim koncentracijama (npr. zbog brze razgradnje ili adsorpcije u ispitnim posudama ili vidne akumulacije hemikalije u tijelima izloženih životinja) preporučuje se da se stopa obnove ispitne rastvora u svakoj komori prilagodi tako da se ispitne koncentracije održe što stabilnijima.

Zapažanja I mjerenja krajnjih tačaka

Tokom izlaganja ocjenjuju se krajnje tačke koje ukazuju na toksičnost, uključujući smrtnost, abnormalno ponašanje kao što su klinički znaci bolesti i/ili opšte toksičnosti te utvrđivanja rasta (dužine i mase) te patološke krajnje tačke koje mogu reagujuti i na opštu toksičnost i na endokrine načine djelovanja koji su usmjereni na putove kojima posreduje estrogen, androgen ili hormon štitne žlijezde. Osim toga, po želji se na kraju testa može izmjeriti i koncentracija VTG-a u plazmi. Mjerenje VTG-a može biti korisno u razumijevanju rezultata studije u kontekstu endokrinih mehanizama hemikalija za koje se sumnja da su endokrino disruptivne. Krajnje tačke i vrijeme mjerenja sažeti su z tabeli 1.

Tabela 1. Pregled krajnjih tačaka u ispitivanju LAGDA

Krajnje tačke (*[19])	Svakodnevno	Uzorkovanje u međuvremenu (uzorkovanje larvi)	Kraj ispitivanja (uzorkovanje mladih životinja)
Smrtnost i abnormalnosti	X		
Vrijeme do 62. stadija NF-a		X	
Histo(pato)logija (štitna žlijezda)		X	
Morfometrija (rast u pogledu mase i dužine)		X	X
Somatski indeks jetre (LSI)			X
Odnosi genetskog/fenotipskog pola			X

Histopatologija (gonade, reproduktivni kanali, bubreg i jetra)			X
Vitelogenin (VTG) (neobavezno)			X

Smrtnost i svakodnevna zapažanja

Sve ispitne rezervoare potrebno je provjeriti svakodnevno radi mrtvih životinja i zabilježiti smrtne slučajeve za svaki rezervoar. Mrtve životinje potrebno je ukloniti iz ispitnog rezervoara čim se uoče. Razvojni stadij uginulih životinja treba klasifikovati kao životinje prije 58. stadija NF-a (prije pojave udova), od 58. stadija NF-a do 62. stadija NF-a, od 63. stadija NF-a do 66. stadija NF-a (od 62. stadija NF-a do potpune resorpcije repa) ili nakon 66. stadija NF-a (nakon faze ličinke). Stope smrtnosti veće od 20 % mogu ukazivati na neprimjerene ispitne uslove ili očito toksične efekte ispitivane hemikalije. Životinje su obično najosjetljivije na događaje sa smrtnim ishodom koji nisu indukujeni hemikalijama tokom prvih par dana razvoja nakon mriješćenja i tokom metamorfoznog klimaksa. Takva smrtnost mogla bi biti očita iz kontrolnih podataka.

Osim toga, treba evidentirati sva neobična ponašanja, jako izražene malformacije (npr. skoliozu) ili lezije. Treba prebrojati slučajeve opažene skolioze (učestalost) i klasifikovati s obzirom na ozbiljnost (npr. nije značajna – NR, minimalna – 1, umjerena – 2, teška – 3; Dodatak 8.). Treba nastojati osigurati da se ograniči učestalost pojave umjerene i teške skolioze (npr. manja od 10 % u kontrolama) tokom cijele studije, iako veća učestalost pojave abnormalnosti u kontrolama ne bi nužno bila razlog za prekid ispitivanja. Normalno ponašanje za ličinke karakterizira lebdenje u vodenom stupcu s repom povišenim iznad glave, redovno i ritmičko udaranje repne peraje, redovno izranjanje na površinu, operkulacija i reagujunje na podražaje. Neuobičajena ponašanja uključivala bi npr. plutanje na površini, ležanje na dnu rezervoara, obrnuto ili nepravilno plivanje, neizlaženje na površinu i nereagujunje na poticaje. Uz prethodno navedena abnormalna ponašanja, za životinje nakon metamorfoze treba evidentirati i velike razlike u unosu hrane među tretiranjima. Grube malformacije i lezije mogu na primjer uključivati morfološke anomalije (npr. deformacije udova), hemoragijske lezije, abdominalne edeme te bakterijske ili gljivične infekcije. Pojave lezija na glavi mladih životinja, odmah iza nosnica, mogu biti znak nedovoljne vlažnosti. Ta su određivanja kvalitativna i potrebno ih je smatrati srodnim kliničkim znacima bolesti/stresa i usporediti s kontrolnim životinjama. Ako je stopa učestalosti pojave veća u izloženim spremnicima nego u kontrolnima, tada ih je potrebno smatrati dokazom očite toksičnosti.

Poduzorkovanje larvi

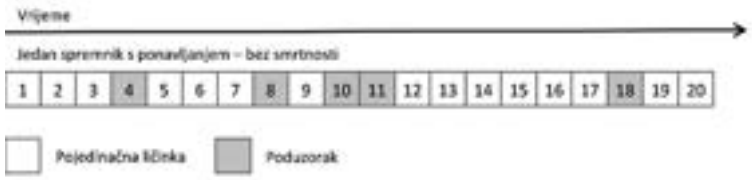
Okvir za poduzorkovanje larvi

Punoglavce koji su dosegnuli 62. stadij NF-a treba ukloniti iz rezervoara te uzorkovati ili prenijeti u sljedeći dio izlaganja u novom rezervoaru ili fizički odvojiti od preostalih

punoglavaca u istom rezervoaru s pomoću pregrade. Punoglavci se svakodnevno pregledavaju i evidentira se dan studije na koji pojedinačni punoglavac dosegne 62. stadij NF-a. U ovoj se procjeni kao odlučujuća karakteristika upotrebljava oblik glave. Kada se glava smanji tako da je vizualno približno jednaka širini trupa i prednjih udova na nivou srednI srca smatra se da je jedinka dosegnula 62. stadij NF-a.

Cilj je uzorkovati ukupno pet punoglavaca u 62. stadiju NF-a po rezervoaru s ponavljanjem. To bi trebalo sprovesti potpuno nasumično, ali odluku treba donijeti a priori. Hipotetski primjer rezervoara s ponavljanjem prikazan je na slici 1. Ako u određenom rezervoaru ima 20 živih punoglavaca kada prva jedinka dosegne 62. stadij NF-a, treba odabrati pet nasumičnih brojeva u rasponu 1–20. Punoglavac br. 1 prva je jedinka koja dosegne 62. stadij NF-a, a punoglavac br. 20 posljednja je jedinka u rezervoaru koja dosegne 62. stadij NF-a. Isto tako, ako u rezervoaru ima 18 živih larvi, treba odabrati pet nasumičnih brojeva u rasponu 1–18. To treba obaviti za svaki rezervoar s ponavljanjem kada prva jedinka u ispitivanju dosegne 62. stadij NF-a. Ako tokom uzorkovanja u 62. stadiju NF-a postoje smrtni slučajevi, preostale uzorke treba ponovno nasumično odabrati na osnovu broja preostalih larvi koje nisu dosegnule 62. stadij NF-a i koliko je uzoraka još potrebno kako bi se dobilo ukupno pet uzoraka iz tog ponavljanja. Na dan na koji punoglavac dosegne 62. stadij NF-a, upućuje se na pripremljenu shemu uzorkovanja kako bi se utvrdilo hoće li se ta jedinka uzorkovati ili fizički odvojiti od ostalih punoglavaca radi daljeg izlaganja. U navedenom primjeru (slika 1.) prva jedinka koja je dosegnula 62. stadij NF-a (tj. okvir br. 1) fizički je odvojena od ostalih larvi i nastavlja se izlagati te se evidentira dan studije na koji je jedinka dosegnula 62. stadij NF-a. Nakon toga jedinke br. 2 i 3 tretiraju se na isti način kao i jedinka br. 1 i zatim se jedinka br. 4 uzorkuje za rast i histologiju štitne žlijezde (prema ovom primjeru). Taj se postupak nastavlja dok se 20. jedinka ne pridruži ostalim jedinkama nakon 62. stadija NF-a ili se uzorkuje. Upotrijebljeni postupak nasumičnog izbora mora pružiti svakom organizmu u ispitivanju jednaku vjerovatnost da bude izabran. To se može postići primjenom bilo koje metode nasumičnog izbora, ali potrebno je da svaki punoglavac bude umrežen u nekom trenutku tokom perioda poduzorkovanja u 62. stadiju NF-a

Slika 1. hipotetički primjer režima uzorkovanja u 62. stadiju NF-a za jedan rezervoar s ponavljanjem



Za poduzorkovanje larvi dobijaju se sljedeće krajnje tačke: 1. vrijeme do 62. stadija NF-a (tj. broj dana od oplodnje do 62. stadija NF-a); 2. spoljašnje abnormalnosti; 3. morfometrijski podaci (npr. masa i dužina) te 4. histologija štitne žlijezde.

Humano usmrćivanje punoglavaca

Poduzorak punoglavaca u 62. stadiju NF-a (pet jedinki po ponavljanju) treba eutanazirati uranjanjem u odgovarajuću količinu (npr. 500 ml) rastvora anestetika (npr.

0,3-postotnu rastvor MS-222, trikain-metansulfonata, CAS.886-86-2) u trajanju od 30 minuta. Rastvor MS-222 treba puferirati natrijumim bikarbonatom kako bi se postigla pH-vrijednost od približno 7,0 jer je nepuferirana RASTVORA MS-222 kisela i nadražuje kožu žabe, što dovodi do slabe apsorpcije i nepotrebnog dodatnog stresa za organizam.

Punoglavac se s pomoću mrežice uklanja iz ispitne komore i prenosi (stavlja) u rastvor za eutanaziju. Životinja se pravilno eutanazira i spremna je za nekropsiju kada ne reaguju na spoljašnje podražaje kao što je štipanje stražnjeg uda pincetom.

Morfometrija (masa i dužina)

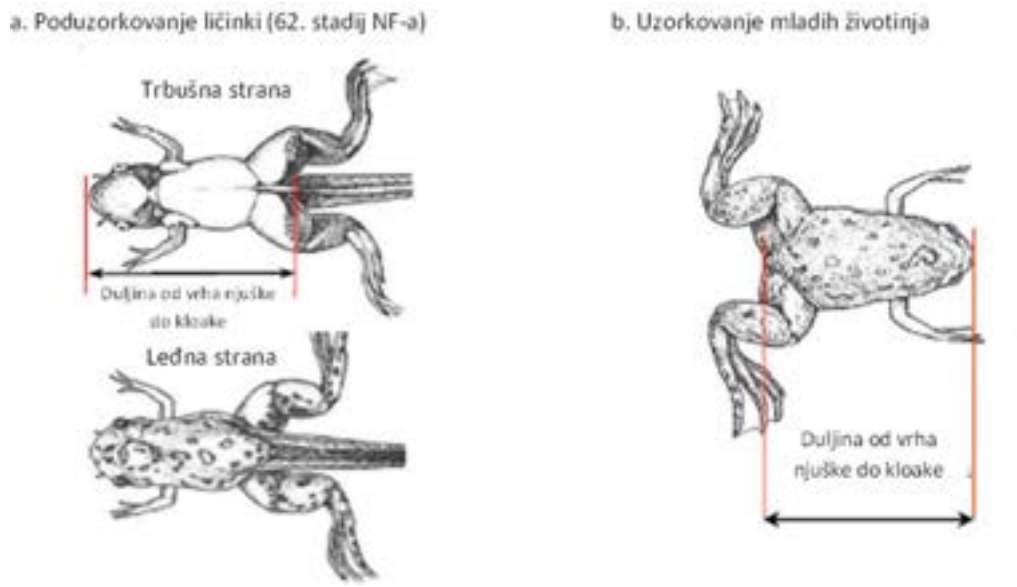
Mjerenje mokre mase (najbliži miligram) i dužine od vrha njuške do kloake (SVL, engl. snout-to-vent length) (najbližih 0,1 mm) svakog punoglavca treba obaviti odmah nakon što prestane reagujuti zbog djelovanja anestezije (slika 2.a). Za mjerenje SVL-a s fotografije može se upotrijebiti softver za analizu slike. Punoglavce prije vaganja treba osušiti upijajućim materijalom kako bi se uklonio višak vode. Nakon mjerenja veličine tijela (masa i SVL) treba evidentirati ili zabilježiti sve makromorfološke abnormalnosti i/ili kliničke znake toksičnosti kao što su skolioza (vidjeti Dodatak 8.), petehije i krvarenje te se preporučuje digitalno dokumentiranje. Napominje se da su petehije mala crvena ili ljubičasta krvarenja kapilara kože.

Prikupljanje i fiksiranje tkiva

Za poduzorak larvi štitne žlijezde se histološki procjenjuju. Donji dio trupa iza prednjih udova uklanja se i odbacuje. Odrezano truplo fiksira se u Davidsonovu fiksativu. Volumen fiksativa u rezervoaru treba biti barem deset puta veći od odgovarajućeg volumena tkiva. Treba postići primjereno protresanje ili cirkulaciju fiksativa kako bi se primjereno fiksirala tkiva od interesa. Sva tkiva ostaju u Davidsonovu fiksativu najmanje 48 sati, ali ne duže od 96 sati, kada se ispiru deioniziranom vodom i pohranjuju u 10-postotnom neutralno puferiranom formalinu.

Histologija štitne žlijezde

Svaki poduzorak larvi (fiksirana tkiva) histološki se procjenjuje u pogledu štitne žlijezde, tj. utvrđuju se dijagnoza i ocjena ozbiljnosti.



Slika 2.: Oznake za mjerenje dužine od vrha njuške do kloake u testu LAGDA u 62. stadiju NF-a (a) i u mladih žaba (b). Odlučujuće karakteristike 62. stadija NF-a (a): glava je jednako široka kao i trup, dužina olfaktornog živca manja je od prodnosa olfaktornog bulbusa (pogled s leđne strane), a prednji udovi u nivou su srca (pogled s trbušne strane). Slike prilagođene iz Nieuwkoop i Faber (1994.).

Kraj izlaganja larvi

S obzirom na početni broj punoglavaca, očekuje se da će vjerovatno doći do malog postotka jedinki koje se nisu normalno razvile i koje neće dovršiti metamorfozu (66. stadij NF-a) u razumnom roku. Dio izlaganja s ličinkama ne bi trebao biti duži od 70 dana. Sve punoglavce koji preostanu na kraju tog perioda treba eutanazirati (vidjeti stav 43.), izmjeriti njihovu mokru masu i SVL, odrediti njihov stadij prema Nieuwkoopu i Faberu, 1994., i zabilježiti sve razvojne abnormalnosti.

Izdvajanje nakon 66. stadija NF-a

Nakon 66. stadija NF-a (potpuna resorpcija repa) treba zadržati deset jedinki po rezervoaru do kraja izlaganja. Stoga treba obaviti izdvajanje nakon što sve životinje dosegnu 66. stadij NF-a ili nakon 70 dana (u zavisnosti o tome što nastupi ranije). Životinje koje su prošle 66. stadij NF-a koje se neće nastaviti izlagati treba nasumično odabrati.

Životinje koje se ne odaberu za nastav izlaganja eutanaziraju se (vidjeti stav 43.). Za svaku se životinju provode mjerenja razvojnog stadija, mokre mase i SVL-a (slika 2.b) te makroskopska nekropsija. Fenotipski pol (na osnovu morfologije gonada) bilježi se kao ženski, muški ili neodređen.

Uzorkovanje mladih životinja

Okvir za uzorkovanje mladih životinja
Preostale životinje nastavljaju se izlagati do deset nedelja nakon srednjeg vremena do 62. stadija NF-a u kontroli s vodom za razrjeđivanje (i/ili kontroli s rastvaračem ako je relevantno). Na kraju perioda izlaganja preostale se životinje (najviše deset žaba po

ponavljanju) eutanaziraju i mjere se različite krajnje tačke ili se ocjenjuju i evidentiraju: 1. morfometrijski podaci (masa i dužina); 2. odnosi fenotipskog/genotipskog pola; 3. masa jetre (somatski indeks jetre); 4. histopatologija (gonade, reproduktivni kanali, jetra i bubreg) te po želji 5. VTG u plazmi.

Humano usmrćivanje žaba

Uzorci mladih životinja, žabe nakon metamorfoze, eutanaziraju se intraperitonealnom injekcijom anestetika, npr. 10-postotnim MS-222 u odgovarajućoj rastvorini puferiranoj fosfatnim puferom. Žabe se mogu uzorkovati nakon što prestanu reagujuti (obično dvije minute nakon injekcije ako se upotrebljava 10-postotni MS-222 u dozi od 0,01 ml po gramu žabe). Iako bi se mlade žabe mogle uroniti u anestetik više koncentracije (MS-222), iz iskustva je poznato da je potrebno više vremena da se anesteziraju tom metodom i to trajanje možda nije primjereno za omogućivanje uzorkovanja. Injekcija pruža efektovitu i brzu eutanaziju prije uzorkovanja. Uzorkovanje ne treba započinjati dok se ne potvrdi da žabe ne reagujuju kako bi se osiguralo da su životinje mrtve. Ako žabe pokazuju znake znatne patnje (vrlo teška patnja i smrt mogu se pouzdano predvidjeti) te se smatra da su na umoru, životinje treba anestezirati i eutanazirati, a u analizi podataka ih tretirati kao smrtnost. Ako se žaba eutanazira zbog morbiditeta, to treba evidentirati i treba izvijestiti o tome. Žaba se može zadržati radi primjene histopatološke analize u zavisnosti o tome u kojoj se fazi studije eutanazira (fiksiranje žabe za moguću histopatološku analizu).

Morfometrija (masa i dužina)

Mjerenja mokre mase i SVL-a (slika 2.b) ista su kao i ona opisana za poduzorkovanje larvi.

VTG u plazmi (neobavezno)

VTG je naširoko prihvaćeni biomarker koji je posljedica izlaganja estrogenim hemikalijama. U testu LAGDA VTG u plazmi može se po želji mjeriti u uzorcima mladih životinja (to može biti naročito relevantno ako se sumnja da je ispitivana hemikalija estrogen).

Režu se stražnji udovi eutanaziranih mladih životinja i uzima se krv s pomoću heparinizirane kapilare (iako mogu biti primjerene i druge metode uzimanja krvi, kao što je punkcija srca). Krv se stavlja u epruvetu za mikrocentrifugu (npr. volumena od 1,5 ml) i centrifugira kako bi se dobila plazma. Uzorke plazme treba čuvati na temperaturi od – 70 °C ili nižoj do utvrđivanja VTG-a. Koncentracija VTG-a u plazmi može se izmjeriti metodom imunoenzimskog testa (ELISA) (Dodatak 6.) ili drugom metodom kao što je masena spektrometrija (31.). Prednost se daje protutijelima specifičnima za vrstu zbog veće osjetljivosti.

Određivanje genetskog pola

Genetski pol svake mlade žabe ocjenjuje se na osnovu markera koje su razvili Yoshimoto i dr.(11.). Kako bi se utvrdio genetski pol, dio jednog stražnjeg uda ili cijeli ud (ili bilo koje drugo tkivo) koji je uklonjen tokom seciranja prikuplja se i pohranjuje u epruveti za mikrocentrifugu (uzorci tkiva žaba mogu se dobiti iz bilo kojeg tkiva). Tkivo se može čuvati na temperaturi od – 20 °C ili nižoj do izoliranja deoksiribonukleinske

kiseline (DNK). Izoliranje DNK-a iz tkiva može se obaviti komercijalno dostupnim priborom za ispitivanje, a analiza u kojoj se utvrđuje prisustvo ili odsustvo markera obavlja se primjenom metode lančane reakcije polimerazom (PCR) (Dodatak 5.). Usklađenost histološkog pola i genotipa kod kontrolnih životinja u trenutku uzorkovanja mladih životinja u kontrolnim grupama Generalno je veća od 95 %.

Prikupljanje i fiksiranje tkiva za histopatologiju

Tokom konačnog uzorkovanja prikupljaju se gonade, reproduktivni kanali, jetra i bubrezi radi histološke analize. Otvara se trbušna šupljina te se disecira i važe jetra. Zatim se probavni organi (npr. želudac, crijeva) pažljivo uklanjaju iz donjeg abdomena kako bi se otkrile gonade, bubrezi i reproduktivni kanali. Treba zabilježiti sve morfološke abnormalnosti gonada. Naposljetku, treba ukloniti stražnje udove ako već nisu prethodno uklonjeni radi uzimanja krvi. Prikupljene jetre i truplo u kojem su gonade ostavljene in situ treba odmah staviti u Davidsonov fiksativ. Volumen fiksativa u rezervoaru treba biti barem deset puta veći od odgovarajućeg volumena tkiva. Sva tkiva ostaju u Davidsonovu fiksativu najmanje 48 sati, ali ne duže od 96 sati, kada se ispiru deioniziranom vodom i pohranjuju u 10-postotnom neutralnom puferiranom formalin.

Histopatologija

Svaki uzorak mladih životinja histološki se ocjenjuje u pogledu patologije u tkivu gonada, reproduktivnih kanala, bubrega i jetre, tj. daje se dijagnoza i ocjena ozbiljnosti (32.). Iz te se ocjene izvodi i fenotip gonada (npr. jajnici, testisi, interseksualne) i, zajedno s pojedinačnim mjerenjima genetskog pola, ta se zapažanja mogu upotrijebiti za izračun odnosa fenotipskog/genotipskog pola.

PODACI I IZVJEŠTAVANJE

Statistička analiza

U testu LAGDA nastaju tri oblika podataka koji se statistički analiziraju: 1. kvantitativni kontinuirani podaci (masa, SVL, LSI, VTG); 2. podaci o vremenu do određenog događaja za stope razvoja (tj. dani od početka testa do 62. stadija NF-a) i 3. ordinalni podaci u obliku ocjena ozbiljnosti ili razvojnih stadija iz histopatoloških ocjena.

Preporučuje se da plan ispitivanja i izbor statističkog testa omoguće odgovarajuću snagu za otkrivanje promjena od biološke važnosti na krajnjim tačkama na kojima se izvješćuje o vrijednosti NOEC ili ECx. Statističke analize podataka (Generalno na osnovu srednje vrijednosti ponavljanja) trebale bi po mogućnosti poštovati postupke opisane u dokumentu Sadašnji pristupi u statističkoj analizi podataka o ekotoksičnosti: Smjernice za primjenu (33.). U Dodatku 7. ovoj ispitnoj metodi navedeni su shema odlučivanja preporučene statističke analize i smjernice za obradu podataka i izbor najprimjerenijeg statističkog testa ili modela za upotrebu u testu LAGDA.

Podatke iz uzorkovanja mladih životinja (npr. rast, LSI) treba analizirati zasebno za svaki genotipski pol jer se genotipski pol utvrđuje za sve žabe.

Razmatranja o analizi podataka
Upotreba kompromitiranih ponavljanja i tretiranja

Ponavljanja mogu postati kompromitirana zbog prevelike smrtnosti uzrokovane očitom toksičnošću, bolešću ili tehničkom pogreškom. Ako je tretiranje kompromitirano zbog bolesti ili tehničke greške, za analizu trebaju biti dostupna tri nekompromitirana tretiranja s tri nekompromitirana ponavljanja. Ako u tretiranjima s visokim koncentracijama dođe do očite toksičnosti, poželjno je da za analizu budu dostupne najmanje tri nivoa tretiranja s tri nekompromitirana ponavljanja (u skladu s pristupom najviše prihvatljive koncentracije za smjernice OECD-a za ispitivanje (34.)). Uz smrtnost, znaci očite toksičnosti mogu uključivati efekte na ponašanje (npr. plutanje na površini, ležanje na dnu rezervoara, obrnuto ili nepravilno plivanje, neizlaženje na površinu), morfološke lezije (npr. hemoragijske lezije, abdominalne edeme) ili inhibiciju normalnih odgovora na hranjenje u kvalitativnoj u poređenju s kontrolnim životinjama.

Kontrola s rastvaračem

Na kraju ispitivanja treba procijeniti moguće utjecaje rastvarača (ako se upotrebljava). To se radi statističkom usporedbom kontrolne grupe s rastvaračem i kontrolne grupe s vodom za razrjeđivanje. Najrelevantnije krajnje tačke koje treba razmotriti u toj analizi determinante su rasta (masa i dužina) jer na njih mogu uticati opšte toksičnosti. Ako se na tim krajnjim tačkama otkriju znatne razlike između kontrolnih grupa s vodom za razrjeđivanje i s rastvaračem, treba primijeniti stručnu prosudbu kako bi se utvrdilo je li narušena valjanost ispitivanja. Ako se dvije kontrole razlikuju, tretiranja izložena hemikaliji treba usporediti s kontrolom s rastvaračem osim ako je poznato da se prednost daje kontroli s vodom za razrjeđivanje. Ako nema statistički značajne razlike između dviju kontrolnih grupa, preporučuje se da se tretiranja izložena ispitivanoj hemikaliji usporede s objedinjenim kontrolama (kontrolne grupe s rastvaračem i s vodom za razrjeđivanje), osim ako je poznato da se prednost daje samo kontroli s vodom za razrjeđivanje ili kontroli s rastvaračem.

Izvještaj o ispitivanju

Izvještaj o ispitivanju trebalo bi da sadrži sljedeće informacije:

Ispitivana hemikalija:

- fizikalno stanje i po potrebi fizičko-hemijska svojstva,
- Supstanca s jednim sastojkom:
- fizički izgled, rastvorljivost u vodi i druga relevantna fizičko-hemijska svojstva,
- hemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, hemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvodivo u praksi itd. (uključujući udio organskog ugljika, prema potrebi).

- Supstance s više sastojaka, UVCB supstance i smješe:
- opis (koliko je to moguće) hemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizičko-hemijskih svojstava sastojaka.

Ispitne vrste:

- naučni naziv, soj ako je dostupno, porijeklo, metoda sakupljanja oplođenih jajašaca i kasnije postepene,
- učestalost pojave skolioze u prošlim kontrolama za matičnu kulturu koja se upotrebljava.

Ispitni uslovi:

- fotoperiodi,
- plan ispitivanja (npr. veličina komore, materijal i volumen vode, broj ispitnih komora i ponavljanja, broj ispitnih organizama po ponavljanju),
- način pripreme glavnih RASTVORA i učestalost obnavljanja (ako se koristi sredstvo za rastvaranje, trebalo bi ga navesti zajedno s koncentracijom),
- metoda doziranja ispitivane hemikalije (npr. crpkama, sistemima za razrjeđivanje),
- iskoristivost metode i nazivnih ispitnih koncentracija, granica kvantifikacije, srednje izmjerene vrijednosti i njihove standardne devijacije u ispitnim posudama te metoda kojom su one dobijene i dokazi da se izmjerene vrijednosti odnose na koncentracije ispitivane hemikalije u stvarnoj rastvorini,
- svojstva vode za razrjeđivanje: pH, tvrdoća, temperatura, koncentracija otopljenog kiseonika, rezidualni hlor (ako se mjeri), ukupni jod, ukupni organski ugljik (ako se mjeri), suspendovana čvrsta supstanca (ako se mjeri), salinitet ispitnog medija (ako se mjeri) i ostala provedena mjerenja,
- nazivne ispitne koncentracije, srednje izmjerene vrijednosti i njihove standardne devijacije,
- kakvoća vode u ispitnim posudama, pH, temperatura (dnevno) i koncentracija otopljenog kiseonika,
- detaljne informacije o hranjenju (npr. vrsta hrane, izvor, količina hrane i učestalost hranjenja).

Rezultati:

- dokazi o usklađenosti kontrola s kriterijumima valjanosti,
- sljedeći podaci za kontrolu (i kontrolu s rastvaračem ako se koristi) i ispitne grupe: uočena smrtnost i abnormalnosti, vrijeme do 62. stadija NF-a, histološka procjena štitne žlijezde (samo kod uzorka larvi), rast (masa i dužina), LSI (samo kod uzorka mladih životinja), odnosi genetskog/fenotipskog pola (samo kod uzorka mladih životinja), rezultati histopatološke procjene za gonade, reproduktivne kanale, bubreg i jetru (samo kod uzorka mladih životinja) te VTG u plazmi (samo kod uzorka mladih životinja ako se sprovodi),
- pristup za statističku analizu i obradu podataka (primijenjeni statistički test ili model),
- najviša koncentracija bez vidljivog efekta (NOEC) za svaki ocijenjeni odgovor,
- najniža koncentracija s vidljivim efektom (LOEC) za svaki ocijenjeni odgovor (pri $\alpha = 0,05$); ECx za svaki ocijenjeni odgovor, ako je primjenjivo, te intervali pouzdanosti (npr. 95 %) i graf prilagođenog modela primijenjenog za izračun vrijednosti ECx, nagib krive koncentracija – odgovor, formula regresijskog modela, procijenjeni parametri modela i njihove standardne greške,
- sva odstepena od ispitne metode i odstepena od kriterijuma prihvatljivosti te razmatranja potencijalnih posljedica na ishod ispitivanja.

Za rezultate mjerenja krajnjih tačaka treba prikazati srednje vrijednosti i njihove

standardne devijacije (ako je moguće i na osnovu ponavljanja i koncentracija).

Srednje vrijeme do 62. stadija NF-a u kontrolama treba izračunati i prikazati kao srednju vrijednost medijana ponavljanja i njihovu standardnu devijaciju. Isto tako, za tretiranja treba izračunati medijan tretiranja i prikazati ga kao srednju vrijednost medijana ponavljanja i njihovu standardnu devijaciju.“